

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

**Einfluss der miRNA-26a Expression auf das  
Ansprechen einer Therapie mit Carmustin-Wafer  
Implantaten bei Patienten mit Glioblastoma  
multiforme**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin der Medizinischen  
Fakultät der Universität des Saarlandes

2020

vorgelegt von

**Luisa Charlotte Braun**

Geb. am: 19.01.1992 in Kirchheimbolanden

Tag der Promotion: 02.12.2020

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Joachim Oertel

Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>4</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>6</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>7</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>8</b>
1.1 Deutsche Fassung.....	8
1.2 Abstract.....	10
<b>2 EINLEITUNG</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Glioblastoma multiforme</b> .....	<b>12</b>
2.1.1 Epidemiologie und Prognose .....	12
2.1.2 Ätiologie.....	12
2.1.3 Klinik und Diagnose .....	13
2.1.4 Therapie .....	14
2.1.4.1 Operation.....	14
2.1.4.2 Strahlentherapie .....	14
2.1.4.3 Chemotherapie .....	15
2.1.5 Molekularbiologie des Glioblastoms .....	17
<b>2.2 Epigenetik</b> .....	<b>18</b>
2.2.1 DNA-Methylierung .....	18
2.2.2 miRNA und miRNA-26a .....	19
<b>2.3 Eigene Fragestellung</b> .....	<b>22</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODIK</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Patientenkollektiv</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2 miRNA-Analyse</b> .....	<b>24</b>
3.2.1 miRNA-Isolation.....	24
3.2.2 Photometrische Konzentrationsmessung.....	25
3.2.3 Theorie der quantitativen Real-Time PCR .....	25
3.2.4 Praktische Durchführung der quantitativen Real-Time PCR.....	28
<b>3.3 DNA-Analyse</b> .....	<b>30</b>
3.3.1 DNA-Isolation .....	30
3.3.2 Bisulfitkonversion und Methylierungsspezifische PCR .....	31
3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	34
3.3.4 IDH1-R132H Immunhistochemie .....	36
<b>3.4 Statistik</b> .....	<b>36</b>

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Patientenkollektiv</b> .....	<b>37</b>
4.1.1	Alters- und Geschlechtsverteilung, KPS .....	37
4.1.2	OS und PFS im Gesamtkollektiv .....	38
4.1.3	Chirurgisches Resektionsausmaß .....	39
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisse der miRNA-Analysen</b> .....	<b>40</b>
4.2.1	miRNA-26a Expression in der Carmustin-Wafer-Gruppe .....	40
4.2.2	miRNA-26a Expression in der Kontroll-Gruppe.....	42
4.2.3	miRNA-26a: Vergleich Carmustin-Wafer-Gruppe versus Kontroll-Gruppe.....	44
4.2.4	TCGA-Validierungsdatensatz .....	45
<b>4.3</b>	<b>Ergebnisse der Methylierungsanalysen von Rb1 und MGMT</b> .....	<b>46</b>
4.3.1	Methylierungsstatus des Promotors von Rb1.....	47
4.3.2	Methylierungsstatus des Promotors von MGMT .....	47
<b>4.4</b>	<b>IDH1-Mutationsstatus</b> .....	<b>48</b>
<b>4.5</b>	<b>Multiple Cox-Regression</b> .....	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>50</b>
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der Methodik</b> .....	<b>51</b>
5.2.1	Patientenkollektiv: Vergleichbarkeit der Untersuchungsgruppen .....	51
5.2.2	miRNA-26a- Expressionsanalyse: Vor- und Nachteile der angewandten Methode .....	52
5.2.3	DNA-Analyse: Vor- und Nachteile der Methylierungsspezifischen PCR .....	53
5.2.4	Diskussion der statistischen Methodik.....	54
<b>5.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>54</b>
5.3.1	Molekulare Marker und die Carmustin-Wafer Therapie .....	55
5.3.2	miRNA-26a als möglicher prädiktiver Marker für Carmustin-Wafer Implantate .....	57
5.3.3	Schlussfolgerungen .....	60
<b>5.4</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>73</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Aqua dest.</b>	Aqua destillata
<b>BCNU</b>	Carmustin
<b>CCNU</b>	Lomustin
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>CpG</b>	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
<b>Ct</b>	Cycle of Threshold (Schwellenwertzyklus)
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>ED</b>	Erstdiagnose
<b>EORTC</b>	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
<b>FC</b>	Fold change
<b>GBM</b>	Glioblastoma multiforme
<b>Glioblastom</b>	Glioblastoma multiforme
<b>IDH</b>	Isozitatdehydrogenase
<b>KM</b>	Kontrastmittel
<b>Kum.</b>	kumulativ
<b>KPS</b>	Karnofsky-Performance-Score
<b>MGMT</b>	O6-Methylguanin-Methyltransferase
<b>miRISC</b>	miRNA-containing RNA-induced Silencing Complex
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MS-PCR</b>	Methylierungsspezifische PCR
<b>OS</b>	overall survival (Gesamtüberleben)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
<b>PFS</b>	progression-free survival (progressionsfreies Überleben)
<b>PTEN</b>	phosphatase and tensin homolog
<b>p15</b>	Protein 15
<b>p16</b>	Protein 16
<b>qRT-PCR</b>	quantitative Real-Time PCR
<b>Rb1</b>	Retinoblastom1-Protein
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Radiotherapie

---

<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TCGA</b>	The Cancer Genome Atlas
<b>TMZ</b>	Temozolomid

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 01:</b> MRT-Aufnahmen eines Glioblastoms	13
<b>Abb. 02:</b> Stupp-Protokoll	16
<b>Abb. 03:</b> Implantation von Carmustin-Wafern in die Resektionshöhle	17
<b>Abb. 04:</b> Bedeutung der miRNAs in der Tumorgenese	20
<b>Abb. 05:</b> Schritte der RNA-Isolation	25
<b>Abb. 06:</b> Schaubild einer PCR-Amplifikationskurve	26
<b>Abb. 07:</b> PCR-Amplifikationskurven der miR-26a und der RNU48	27
<b>Abb. 08:</b> Agarose-Gelelektrophorese zur Detektion des Methylierungsstatus von MGMT	35
<b>Abb. 09:</b> Durchschnittliches Alter der Patienten bei Erstdiagnose	37
<b>Abb. 10:</b> Geschlechtsverteilung des gesamten Patientenkollektivs	38
<b>Abb. 11:</b> Vergleich von OS und PFS beider Untersuchungsgruppen	39
<b>Abb. 12:</b> Lineare Regressionsanalyse des OS und PFS in der Carmustin-Wafer-Gruppe	40
<b>Abb. 13:</b> Kaplan-Meier-Kurven des OS und PFS in der Carmustin-Wafer-Gruppe	42
<b>Abb. 14:</b> Lineare Regressionsanalyse des OS und PFS in der Kontroll-Gruppe	43
<b>Abb. 15:</b> Vergleich beider Untersuchungsgruppen bei hoher miRNA-26a Expression	44
<b>Abb. 16:</b> Kaplan-Meier-Kurven des OS und PFS beider Untersuchungsgruppen	45
<b>Abb. 17:</b> TCGA-Validierungskohorte	46
<b>Abb. 18:</b> MGMT-Methylierungsstatus	47
<b>Abb. 19:</b> IDH1-Mutationsstatus	48



## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 01:</b> Mastermix der Reversen Transkription	28
<b>Tab. 02:</b> Pipettierschema der Reversen Transkription	28
<b>Tab. 03:</b> Reaktionsschritte der Reversen Transkription	29
<b>Tab. 04:</b> Mastermix der qRT-PCR	29
<b>Tab. 05:</b> Pipettierschema der qRT-PCR	30
<b>Tab. 06:</b> Reaktionsschritte der qRT-PCR	30
<b>Tab. 07:</b> MGMT und Rb1 Primersequenzen für die MS-PCR	32
<b>Tab. 08:</b> Reaktionsschritte der Bisulfitkonversion	32
<b>Tab. 09:</b> Mastermixkomponenten der MS-PCR	33
<b>Tab. 10:</b> Reaktionsschritte der Analyse von MGMT	34
<b>Tab. 11:</b> Reaktionsschritte der Analyse von Rb1	34
<b>Tab. 12:</b> Multiple Cox-Regressionsanalyse wichtiger Einflussfaktoren auf das OS	49

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Fassung

### **Einfluss der miRNA-26a Expression auf das Ansprechen einer Therapie mit Carmustin-Wafer Implantaten bei Patienten mit Glioblastoma multiforme**

Das Glioblastom ist der häufigste bösartige Hirntumor des Erwachsenen. Trotz intensiver Forschung ist die Prognose der Patienten infaust. Das infiltrative Wachstum von Glioblastomen erfordert den Einsatz verschiedener Therapiemodalitäten. Die Standardtherapie umfasst neben einer möglichst umfangreichen Tumorresektion die anschließende konkomitante Radio- und Chemotherapie mit Temozolomid.

Mit der Markteinführung von Carmustin-Wafer Implantaten (Gliadel-Wafer®) hoffte man, die Standardtherapie um eine lokal in der Tumorphöhle wirksame Chemotherapie erweitern zu können. Carmustin zählt wie Temozolomid zu den alkylierenden Chemotherapeutika. Nachdem initiale Studien hoffnungsvolle Ergebnisse sowohl bei der Primär- als auch bei der Rezidivtherapie des Glioblastoms lieferten, konnten spätere Studien diese positiven Ergebnisse nicht reproduzieren. Der therapeutische Einsatz von Carmustin-Wafer Implantaten in der Primärtherapie des Glioblastoms wird seither kontrovers diskutiert.

Molekulare Marker gewinnen derzeit bei der Diagnostik und Therapie von Glioblastomen zunehmend an Bedeutung. Insbesondere der miRNA-26a wird aktuell immer mehr Beachtung geschenkt. Unter anderem spricht man ihr eine prädiktive Bedeutung für das klinische Outcome von Glioblastompatienten zu. Außerdem scheint sie Einfluss auf die Progression des Glioblastoms zu haben, da sie durch die Regulation des Tumorsuppressorgens Rb1 den Zellzyklus erheblich beeinflussen kann.

Es wäre von klinischem Interesse einen molekularen Marker zu identifizieren, der den Therapieerfolg einer Carmustin-Wafer Implantation vorherzusagen vermag. Der Erfolg dieser adjuvanten Therapie ist möglicherweise auf eine Patientensubpopulation beschränkt, die besondere molekulare Veränderungen aufweist. Das Ziel der vorliegenden Studie war daher, die miRNA-26a als potentiellen prädiktiven Marker für eine Therapie mit Carmustin-Wafer Implantaten zu evaluieren.

Hierfür wurden Tumorproben von 80 Glioblastompatienten untersucht und in zwei Gruppen à 40 Patienten aufgeteilt. Die Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe erhielten nach der Tumorresektion intraoperativ eine intrakavitäre Applikation von Carmustin-Wafern. Postope-

rativ erfolgte eine konkomitante Radio- und Chemotherapie mit Temozolomid. Die Patienten der Kontroll-Gruppe erhielten nach der Tumorresektion lediglich die konkomitante Radio- und Chemotherapie.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurde das Expressionslevel der miRNA-26a in allen 80 Tumorproben bestimmt. Die Bestimmung des Methylierungsstatus der Promotorregionen von MGMT und Rb1 erfolgte mit Hilfe der Methylierungsspezifischen PCR.

Im Gesamtkollektiv zeigte sich kein Überlebensvorteil der adjuvanten Carmustin-Wafer Implantation gegenüber der alleinigen Standardtherapie. Erst unter Einbeziehung der miRNA-26a Expressionsunterschiede scheint die zusätzliche Therapie mit Carmustin-Wafern der alleinigen Standardtherapie überlegen zu sein. Die Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe mit erhöhter miRNA-26a Expression zeigten ein signifikant längeres OS und PFS als die Patienten der Kontroll-Gruppe. Die Resultate der Kontroll-Gruppe wurden zudem mit einem unabhängigen Datensatz von 149 Patienten aus der „The Cancer Genome Atlas“-Datenbank validiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen erstmals eine prädiktive Bedeutung der miRNA-26a Expression für die Therapie mit Carmustin-Wafern bei Patienten mit Glioblastoma multiforme. Möglicherweise kann sie in Zukunft bei der klinischen Entscheidungsfindung helfen, ob eine Carmustin-Wafer Implantation zusätzlich zur Standardtherapie erfolgen soll oder nicht.

## 1.2 Abstract

### **Influence of miRNA-26a expression on the response to therapy with carmustine wafer implants in patients with glioblastoma multiforme**

Glioblastoma is the most common malignant brain tumor in adults. Despite intensive research, the prognosis of patients is very poor. The infiltrative growth of glioblastomas requires the use of different therapeutic modalities. The standard therapy includes, in addition to the most extensive possible tumor resection, subsequent concomitant radio- and chemotherapy with temozolomide.

With the market launch of carmustine wafer implants (Gliadel-Wafer®), it was hoped to expand the standard therapy with chemotherapy that is effective locally in the tumor cavity. Like temozolomide, carmustine is also an alkylating chemotherapeutic agent. After initial studies reported promising results in both primary and recurrent glioblastoma therapy, later studies could not reproduce these positive results. The therapeutic use of carmustine wafer implants in the primary therapy of glioblastoma has since been the subject of controversial discussion.

Molecular markers are currently gaining increasing importance in the diagnosis and therapy of glioblastomas. In particular, miRNA-26a is currently receiving more and more attention. Among other things, it is believed to have a predictive importance for the clinical outcome of glioblastoma patients. In addition, it seems to have an influence on the progression of glioblastomas, as it can significantly influence the cell cycle by regulating the tumor suppressor gene Rb1.

It would be of clinical interest to identify a molecular marker that could predict the therapeutic success of carmustine wafer implantation. The success of this adjuvant therapy may be limited to a patient subpopulation that exhibits particular molecular changes. The aim of the present study was therefore to evaluate miRNA-26a as a potential predictive marker for a therapy with carmustine wafer implants.

For this purpose, tumor samples from 80 glioblastoma patients were examined and divided into two groups of 40 patients each. The patients of the carmustine wafer group received intraoperative intracavitary application of carmustine wafers after tumor resection. Postoperatively, a concomitant radio- and chemotherapy with temozolomide was administered. The patients in the control group received only concomitant radio- and chemotherapy after tumor resection.

The expression level of miRNA-26a was determined by quantitative real-time PCR in all 80 tumor samples. The methylation status of the promoter regions of MGMT and Rb1 was determined by methylation specific PCR.

In the overall collective, no survival advantage of adjuvant carmustine wafer implantation compared to standard therapy alone was found. Only when taking into account the miRNA-26a expression differences, the additional therapy with carmustine wafers seems to be superior to the sole standard therapy. Patients of the carmustine wafer group with increased

miRNA-26a expression showed significantly longer OS and PFS than patients of the control group. The results of the control group were also validated with an independent data set of 149 patients from The Cancer Genome Atlas database.

The results of this study demonstrate for the first time a predictive significance of miRNA-26a expression for carmustine wafer therapy in patients with glioblastoma multiforme. In the future, it may help in clinical decision making whether or not carmustine wafer implantation should be performed in addition to standard therapy.

## 2 Einleitung

### 2.1 Glioblastoma multiforme

#### 2.1.1 Epidemiologie und Prognose

Das Glioblastoma multiforme (im Weiteren als Glioblastom oder GBM bezeichnet) ist der häufigste bösartige Hirntumor des Erwachsenen <sup>69</sup>. Die Inzidenz beträgt in Europa und Nordamerika 2-3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr <sup>100</sup>. Glioblastome treten bevorzugt bei älteren Menschen auf. Das mediane Erkrankungsalter bei Erstdiagnose liegt bei 64 Jahren <sup>69</sup>. In dieser Altersgruppe beträgt die jährliche Inzidenz sogar 4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner <sup>10</sup>. Männer sind ungefähr 1,5-mal häufiger betroffen als Frauen <sup>10,67</sup>.

Trotz intensiver, multimodaler Therapie ist die Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 3%, infaust <sup>67</sup>. Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt etwa 14,6 Monate <sup>98</sup>. Je älter die Patienten bei der Erstdiagnose sind umso schlechter ist ihre Prognose <sup>36</sup>. Ein geringer präoperativer Karnofsky-Performance-Score (KPS) gilt ebenfalls als Prädiktor für einen weniger günstigen klinischen Verlauf <sup>100</sup>.

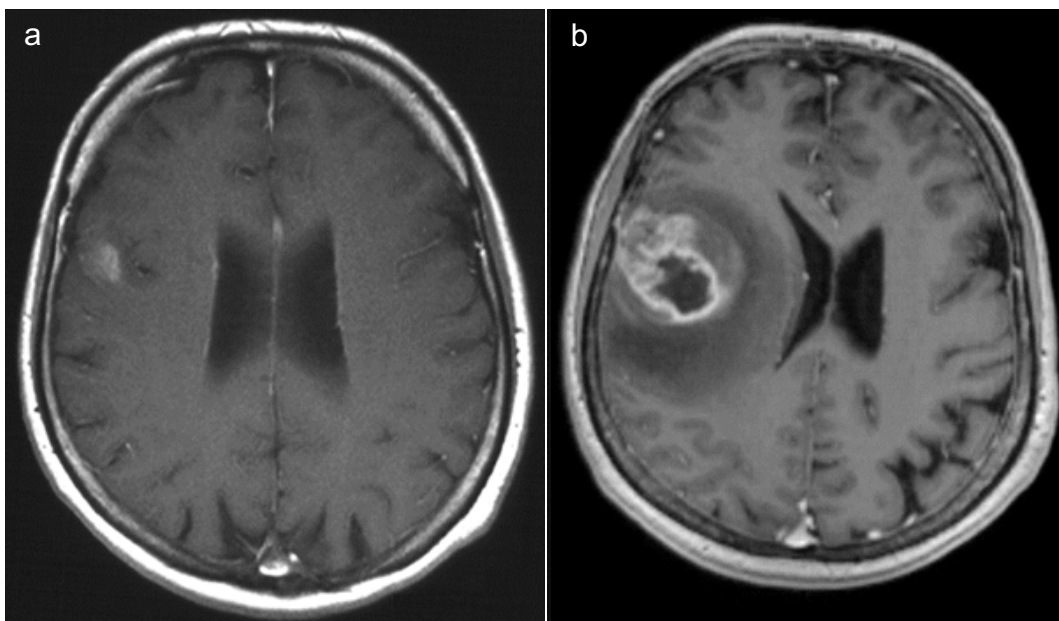
#### 2.1.2 Ätiologie

Bislang sind eindeutige Risikofaktoren, die zu der Entstehung von GBM beitragen, weitgehend unbekannt. In mehreren Studien wurden jedoch Prädispositionen beschrieben, die mit einer erhöhten Inzidenz einhergehen können. Bestimmte hereditäre Tumorsyndrome wie das Li-Fraumeni-Syndrom oder das Turcot-Syndrom prädisponieren beispielsweise für die Entstehung von Hirntumoren <sup>68</sup>. Des Weiteren wird die chronische Exposition gegenüber petrochemischer Stoffe als möglicher Auslöser diskutiert <sup>90</sup>. Ein Zusammenhang zwischen der Benutzung von Mobiltelefonen und der Entstehung von Hirntumoren wird häufig in den Medien thematisiert, konnte jedoch nicht überzeugend belegt werden <sup>1,47,62</sup>. Der einzige, bislang gesicherte Umweltfaktor, dem man einen Einfluss auf die Hirntumorgenese nachweisen konnte, ist die Anwendung ionisierender Strahlung <sup>68</sup>. Dies gilt insbesondere für Bestrahlungen im Kindes- und Jugendalter. Mehrere Studien belegten, dass eine Ganzschädelbestrahlung bei Kindern mit Akuter Lymphatischer Leukämie zu einem signifikant erhöhten GBM Risiko im Erwachsenenalter führte <sup>63,68</sup>.

### 2.1.3 Klinik und Diagnose

Das klinische Bild des GBM wird zu Beginn oftmals durch diffuse Kopfschmerzen oder erstmalige epileptische Anfälle geprägt. Dazu können je nach Lokalisation des Tumors neurologische Herdsymptome (Hemiparese, Aphasie, Ataxie, Wesensänderung) oder Hirnnervenausfälle treten<sup>91</sup>. Als typische Spätsymptome imponieren Hirndruckzeichen wie morgendliches Nüchternbrechen oder Stauungspapillen. Zu beachten ist außerdem die meist sehr kurze Anamnese maligner Tumore aufgrund ihres schnellen Wachstums<sup>91</sup>.

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist aktuell die Methode der 1. Wahl zum Nachweis von Hirntumoren. Auf T1-gewichteten Sequenzen erscheint das GBM hypointens zur weißen Substanz. Das Signal ist oftmals schlecht abgrenzbar und es können Nekrosen sowie Zysten zur Darstellung kommen. Nach der Gabe von Gadolinium-haltigem Kontrastmittel zeigt sich meist das für GBM typische randständige, girlandenförmige Kontrastmittel (KM) - Enhancement als Zeichen der Destruktion der Blut-Hirn-Schranke (siehe Abb. 01). Aufgrund der raumfordernden Wirkung von GBM kann es zu einer Mittellinienverlagerung oder Verlegung der Liquorräume kommen<sup>104</sup>.



**Abb. 01: MRT-Aufnahmen eines Glioblastoms (T1- gewichtet nach KM-Gabe).**

a) Initiale MRT-Aufnahme eines 63-Jährigen Patienten, der mit einem erstmaligen epileptischen Anfall symptomatisch wurde. Es zeigt sich ein leichtes Kontrastmittel-Enhancement rechts fronto-parietal mit dezentem Perifokalödem.

b) 4 Wochen nach Aufnahme a: Nachweis einer großen Raumforderung rechts fronto-parietal mit girlandenförmigem Kontrastmittel-Enhancement, ausgeprägtem Perifokalödem, Pelottierung des rechten Seitenventrikels und Mittellinienverlagerung zur Gegenseite.

## 2.1.4 Therapie

Trotz intensiver Forschung und wissenschaftlicher Fortschritte in den vergangenen Jahren bleibt die Prognose der Patienten mit GBM infaust. Ziel der Behandlung ist die Optimierung der Lebensdauer und Lebensqualität.

Das infiltrative Wachstum des Tumors erfordert den Einsatz verschiedener Therapiemodalitäten. Da einige Tumorzellen bei Diagnosestellung bereits über die makroskopisch sichtbaren Tumorgrenzen hinweg in das umliegende Hirnparenchym eingewandert sind, ist eine vollständige operative Tumoresektion ausgeschlossen. Das aktuelle Therapieprotokoll umfasst daher neben einer Tumoresektion die anschließende konkomitante Radio- und Chemotherapie nach Stupp<sup>98</sup> (siehe Abschnitt „Temozolomid“, Seite 15-16).

Bei jeder Therapieentscheidung sind Risiko und Nutzen abzuwägen und der klinische Zustand des Patienten miteinzubeziehen.

### 2.1.4.1 Operation

Der therapeutische Stellenwert der Operation ist mittlerweile unumstritten. Die möglichst umfangreiche Resektion des GBMs stellt einen tragenden Pfeiler der Therapie dar und gilt als prognostisch günstiger Faktor<sup>97,105</sup>. Stummer et al. belegten, dass das Resektionsausmaß einen entscheidenden Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten hat<sup>77</sup>. Besteht in der Bildgebung der Verdacht auf einen hirneigenen, malignen Tumor, ist eine Operation daher grundsätzlich in Betracht zu ziehen, wenn das Einverständnis des Patienten vorliegt.

Ziele der Operation sind die Reduktion der Tumorzellzahl (Zytoreduktion), die Symptomreduktion sowie die Gewinnung von Tumorgewebe zur histologischen Diagnosesicherung<sup>91</sup>. Die Radikalität der chirurgischen Tumoresektion wird jedoch entscheidend durch die Nähe des Tumors zu funktionell bedeutsamen Hirnregionen limitiert. Der neurologische Zustand des Patienten darf sich in Anbetracht der meist nur wenigen Monate Überlebenszeit durch die Operation nicht weiter verschlechtern.

Intraoperative Zusatzverfahren wie Neuronavigation und fluoreszenzgestützte Resektion bieten zusätzliche Optionen, die Resektion des Tumors zu optimieren<sup>91</sup>.

Spätestens 24 Stunden nach der Operation sollte eine MRT mit und ohne Kontrastmittel angefertigt werden, um das Resektionsausmaß zu beurteilen<sup>103</sup>.

### 2.1.4.2 Strahlentherapie

Die postoperative Bestrahlung der erweiterten Tumorregion ist ein weiterer wichtiger Bestandteil der Therapie des GBMs. Im Vergleich zur alleinigen Operation führt der zusätzliche Einsatz der Strahlentherapie zu einer signifikanten Verlängerung der medianen Überlebenszeit um etwa 6 Monate<sup>53,106</sup>. Das Bestrahlungsvolumen wird anhand der



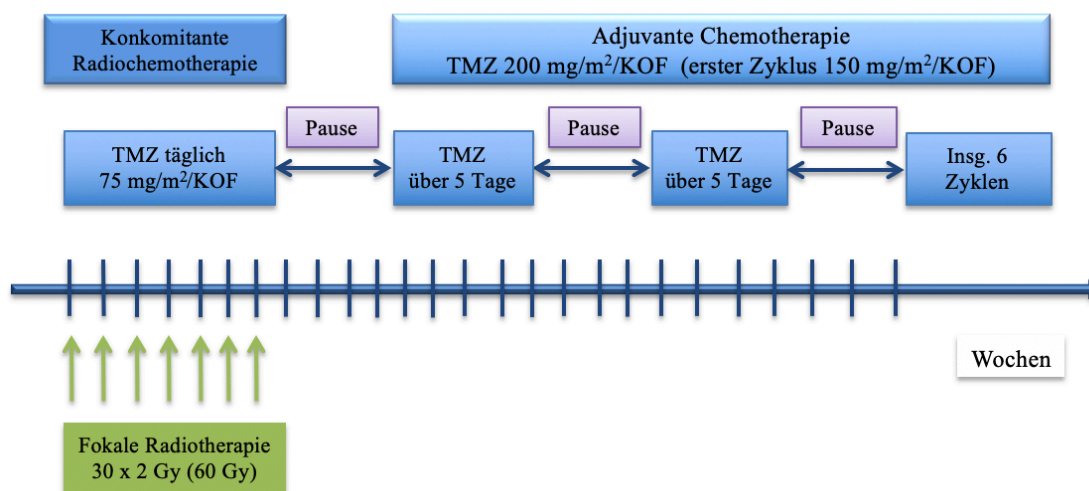
präoperativ kontrastmittelaufnehmenden Tumorzone und der postoperativen Resektionshöhle festgelegt. Es konnte ein klarer Überlebensvorteil für Gesamtdosen zwischen 55 und 60 Gy im Vergleich zu geringeren Gesamtdosen nachgewiesen werden <sup>7,106</sup>. Eine Dosiseskala-tion über 60 Gy hinaus, beispielsweise durch den Einsatz von Brachytherapie, führte hingegen nicht zu einer Verbesserung der Überlebenszeit <sup>54,86</sup>. Die Gesamtstrahlendosis sollte daher 60 Gy betragen und in 30 Dosen zu je 1,8 - 2,0 Gy über einen Zeitraum von 6 Wochen appliziert werden (5 Tage/Woche) <sup>54,91,99</sup>.

### **2.1.4.3 Chemotherapie**

Die Forschung konzentrierte sich bis 2004 hauptsächlich auf Nitrosoharnstoff-basierte Chemotherapeutika wie Carmustin (BCNU) oder Lomustin (CCNU), da sie aufgrund ihrer Lipidlöslichkeit die Blut-Hirn-Schranke überwinden können <sup>96</sup>. Zwar wurde diesen Chemothe-rapeutika eine Wirkung bei GBM zugesprochen, jedoch erzielten sie lediglich moderate Überlebensvorteile bei nicht zu vernachlässigenden Nebenwirkungen wie Myelosuppression und Lungenfibrose <sup>51,82</sup>.

#### **2.1.4.3.1 Temozolomid**

Temozolomid (TMZ, Temodal®), ein orales, alkylierendes Zytostatikum, lieferte in der Rezidivtherapie von Anaplastischen Astrozytomen und GBM vielversprechende Studienergebnisse <sup>113,114</sup>. Dies nahmen die European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) und das National Cancer Institute of Canada (NCIC) 2005 zum Anlass, um unter der Leitung von Roger Stupp eine gemeinsame Studie zur Überprüfung der Wirksamkeit von TMZ in der Primärtherapie des GBMs durchzuführen <sup>98</sup>. Dafür wurden 573 Patienten mit neu diagnostiziertem GBM nach dem Zufallsprinzip zwei unterschiedlichen Therapiegruppen zugeteilt. Die Kontrollgruppe erhielt postoperativ die bis dato praktizierte Standard-Radiotherapie (RT). Die Patienten der Behandlungsgruppe wurden postoperativ einer konkomitanten Radiochemotherapie mit TMZ, gefolgt von einer adjuvanten TMZ-Erhaltungstherapie (TMZ/RT → TMZ), zugeführt (siehe Abb. 02).



**Abb. 02: Stupp-Protokoll.** Postoperativ erhalten die Patienten zunächst eine konkomitante Radiochemotherapie. Die RT besteht aus 30 Fraktionen zu je 2 Gy, die 5 Tage/Woche für 6 Wochen verabreicht werden. Gleichzeitig wird täglich TMZ in niedriger Dosierung ( $75 \text{ mg/m}^2/\text{KOF}$ ) vom ersten bis zum letzten Tag der RT verabreicht. Nach einer 4-wöchigen Pause erhalten die Patienten über 5 Tage  $150\text{-}200 \text{ mg/m}^2/\text{KOF}$  TMZ (insgesamt bis zu 6 Zyklen mit jeweils 4 wöchiger Pause zwischen den einzelnen Zyklen)<sup>98</sup>.

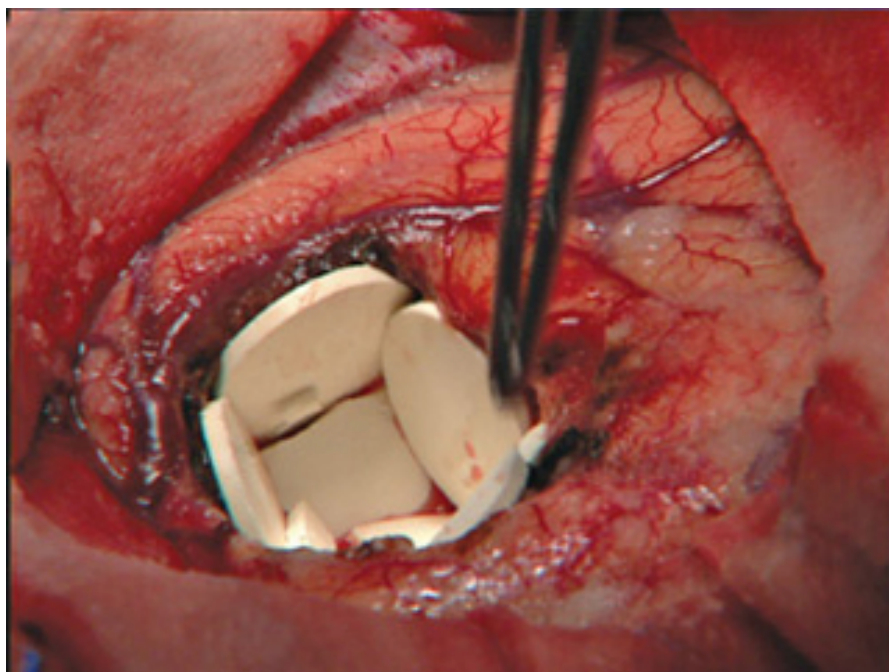
Durch die zusätzliche Therapie mit TMZ verlängerte sich die mediane Überlebenszeit der Patienten von 12,1 Monaten auf 14,6 Monate und die 2-Jahres-Überlebensrate konnte von 10,4% auf 26,5% erhöht werden<sup>98</sup>. Daher dient das von Stupp et al. 2005 etablierte Therapieprotokoll, auch „Stupp-Protokoll“, seither als Standard der Primärtherapie des histologisch gesicherten GBMs. Im klinischen Alltag ist die orale Applikationsmöglichkeit von TMZ von großer Bedeutung, da sie zur Verbesserung der Patienten-Compliance beiträgt. Zudem weist das Medikament ein günstigeres Nebenwirkungsprofil als die Nitrosoharnstoff-basierten Chemotherapeutika auf<sup>22</sup>.

#### 2.1.4.3.2 Carmustin-Wafer

Carmustin-Wafer (Gliadel®-Wafer) bestehen aus biologisch abbaubaren Kopolymeren (Prolifeprosan 20), welche mit dem Nitrosoharnstoff-Derivat Carmustin (1,3-Bis(2-Chlorethyl)-1-Nitrosoharnstoff, BCNU) imprägniert sind<sup>57</sup>. Carmustin ist wie TMZ ein alkylierendes Chemotherapeutikum, das über die Bildung von  $\text{O}^6$ -Methylguanin zu DNA-Doppelstrangbrüchen führt und so die Apoptose der Tumorzellen induziert.

Entwickelt wurden die Wafer von Brem et al. zu Beginn der 1990er Jahre<sup>82</sup>. Zu dieser Zeit war Carmustin das effektivste Chemotherapeutikum zur Behandlung von Hirntumoren<sup>51</sup>. Die lokal implantierbaren Carmustin-Wafer sollten durch Umgehung der Blut-Hirn-Schranke zu

einer Erhöhung der Wirkstoffkonzentration am Zielort führen. Man erhoffte sich dadurch ein besseres Ansprechen auf die lokale Chemotherapie bei gleichzeitiger Reduktion der mit einer systemischen Verabreichung einhergehenden Toxizität der Chemotherapeutika<sup>12</sup>. Im Anschluss an die chirurgische Tumoresektion können je nach Größe der Resektionshöhle bis zu acht Carmustin-Wafer eingebracht werden, wobei jeder Wafer 7,7 mg Carmustin enthält. Über einen Zeitraum von ca. 3 Wochen wird das Chemotherapeutikum kontinuierlich freigesetzt<sup>11,109</sup> (siehe Abb. 03).



**Abb. 03: Implantation von Carmustin-Wafern in die Resektionshöhle.** Intraoperativ können je nach Größe der Tumorphöhle bis zu acht Carmustin-Wafer implantiert werden.

Im Rahmen des Zulassungsverfahrens der Carmustin-Wafer zeigten initial durchgeführte Studien zunächst sehr positive Ergebnisse in Bezug auf ein verlängertes Gesamtüberleben (overall survival, OS) sowie ein verlängertes progressionsfreies Überleben (progression-free survival, PFS) von Glioblastompatienten<sup>11,12,102,109</sup>. Neuere Studien konnten diese positiven Resultate jedoch nicht bestätigen, sodass die Verwendung von Carmustin-Wafern insbesondere in der Primärtherapie des Glioblastoms heute umstritten ist<sup>71</sup>.

### 2.1.5 Molekularbiologie des Glioblastoms

Molekularbiologische Charakteristika haben in den vergangenen Jahren für die Diagnostik und Therapie des Glioblastoms zunehmend an Bedeutung gewonnen. Seit 2016 werden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) etablierte molekulare Parameter zur Definition und Klassifikation der Hirntumore herangezogen<sup>59</sup>. Hierzu zählt unter anderem die Mutation des Isozitatdehydrogenase 1 (IDH1) - Gens. Der Großteil der detektierten IDH1 Mutationen

entstehen durch den Austausch der Aminosäure Arginin gegen die Aminosäure Histidin in Position 132 (R132H). Der IDH1-Mutationsstatus hat sich als prognostischer Marker bei astrozytären Tumoren etabliert und seine Bestimmung spielt insbesondere bei Glioblastomen eine wichtige Rolle<sup>85</sup>. Glioblastome mit mutiertem IDH1-Gen gehen meist sekundär aus einem diffusen oder Anaplastischen Astrozytom hervor und weisen eine bessere Prognose als Glioblastome mit nicht mutiertem IDH1-Gen (IDH1-Wildtyp) auf<sup>39,68</sup>.

Weitere wichtige molekulare Marker sind die Tumorsuppressorproteine Retinoblastom 1-Protein (Rb1), Protein 15 (p15) und Protein 16 (p16). Sie nehmen eine Schlüsselrolle in der Zellzyklus-Kontrolle ein und eine Veränderung ihres Expressionsstatus ist maßgeblich an der Genese von Glioblastomen beteiligt<sup>46,84,92</sup>. In aktuellen Studien wurde der homozygoten Deletion der Gene, die für p15 und p16 kodieren, zudem eine prognostische Relevanz zugesprochen<sup>52,89</sup>.

## 2.2 Epigenetik

Der Begriff „Epigenetik“ wurde ursprünglich von Conrad Waddington 1942 geprägt, um Veränderungen in einem multizellulären Phänotyp zu beschreiben, die unabhängig von der DNA-Sequenz auftraten<sup>20</sup>. Neben reversiblen chemischen Modifikationen einzelner DNA-Basen (z.B. DNA-Methylierung) dienen Modifikationen einzelner Aminosäuren von Histonen (z.B. Acetylierung) und nicht-codierende RNAs (z.B. miRNAs) als epigenetische Informationsträger<sup>65</sup>.

Ein Versagen der ordnungsgemäßen Aufrechterhaltung vererbbarer epigenetischer Marker kann zu einer unangemessenen Aktivierung oder Hemmung verschiedener Signalwege führen und so Krankheitszustände wie Krebs begünstigen<sup>87</sup>. Jüngste Fortschritte auf dem Gebiet der Epigenetik zeigten, dass menschliche Krebszellen neben zahlreichen genetischen Veränderungen auch globale epigenetische Anomalien aufweisen<sup>48,87</sup>.

### 2.2.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung spielt als direkte, mit der Nukleotidsequenz verknüpfte epigenetische Modifikation eine bedeutende Rolle bei der Genrepression. Sie erfolgt postreplikativ an bestimmten Basen in doppelsträngiger DNA und wird von DNA-Methyltransferasen katalysiert<sup>65</sup>. Im Menschen findet die DNA-Methylierung vornehmlich an Cytosinresten in CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin) - Dinukleotiden statt. CpG-Dinukleotide sind nicht gleichmäßig über das menschliche Genom verteilt, sondern konzentrieren sich auf kurze CpG-reiche DNA-Strecken, die als CpG-Inseln bezeichnet werden. Sie finden sich in 70% aller Promotorregionen von Säugetieren<sup>20</sup>. Die Methylierung einer solchen Promotorregion führt zu einem transkriptionellen Silencing des jeweiligen Gens.

Abweichungen vom ursprünglichen DNA-Methylierungsmuster waren die ersten epigenetischen Veränderungen, denen eine Rolle bei der Tumorgenese und –progression zugesprochen wurde <sup>48,87</sup>.

Die Methylierung des O6-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) - Promotors besitzt eine erhebliche prädiktive Bedeutung für Glioblastome <sup>41</sup>. Durch die Repression der Genexpression des gleichnamigen DNA-Reparaturenzyms wird die apoptotische Wirkung alkylierender Chemotherapeutika, wie z.B. TMZ oder BCNU, auf Tumorzellen verbessert <sup>83</sup>. Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor sprechen daher besser auf eine Therapie mit Alkylanzien an als Patienten mit unmethyliertem MGMT-Promotor.

An dem Gewinn dieser Erkenntnisse war eine Studie von Hegi et al. aus dem Jahre 2005 maßgeblich beteiligt. Die Forscher untersuchten den Einfluss des MGMT-Methylierungsstatus auf das Überleben der Patienten der EORTC-NCIC Studie (siehe Abschnitt „Temozolomid“, Seite 15-16) <sup>98</sup>. Die Ergebnisse ihrer Studie deuteten zum einen darauf hin, dass der MGMT-Methylierungsstatus eine prognostische Bedeutung für das Überleben der Glioblastompatienten hat und zum anderen scheint er einen klinisch relevanten Prädiktor für den Nutzen einer Chemotherapie mit Temozolomid darzustellen <sup>41</sup>.

Mit Durchführung der NOA-08 Studie im Jahre 2012 wurde der MGMT-Methylierungsstatus zudem als wichtiger prädiktiver Marker bei älteren Glioblastompatienten (> 65 Jahre) etabliert. In dieser Altersgruppe verzichtete man bis dato oftmals auf eine zusätzliche Chemotherapie, da man bei den häufig multimorbiden Patienten schwere Nebenwirkungen befürchtete. Ältere Patienten erhielten aus diesem Grund postoperativ meist nur eine Bestrahlung. Die NOA-08 Studie zeigte jedoch, dass ältere Patienten insbesondere dann ebenfalls von einer Chemotherapie mit Temozolomid profitieren, wenn sie einen methylierten MGMT-Promotor aufweisen. Seither ist die Bestimmung des MGMT-Methylierungsstatus maßgeblich an der Entscheidungsfindung beteiligt, ob ältere Glioblastompatienten eine Chemotherapie oder eine alleinige hypofraktionierte Radiatio erhalten.

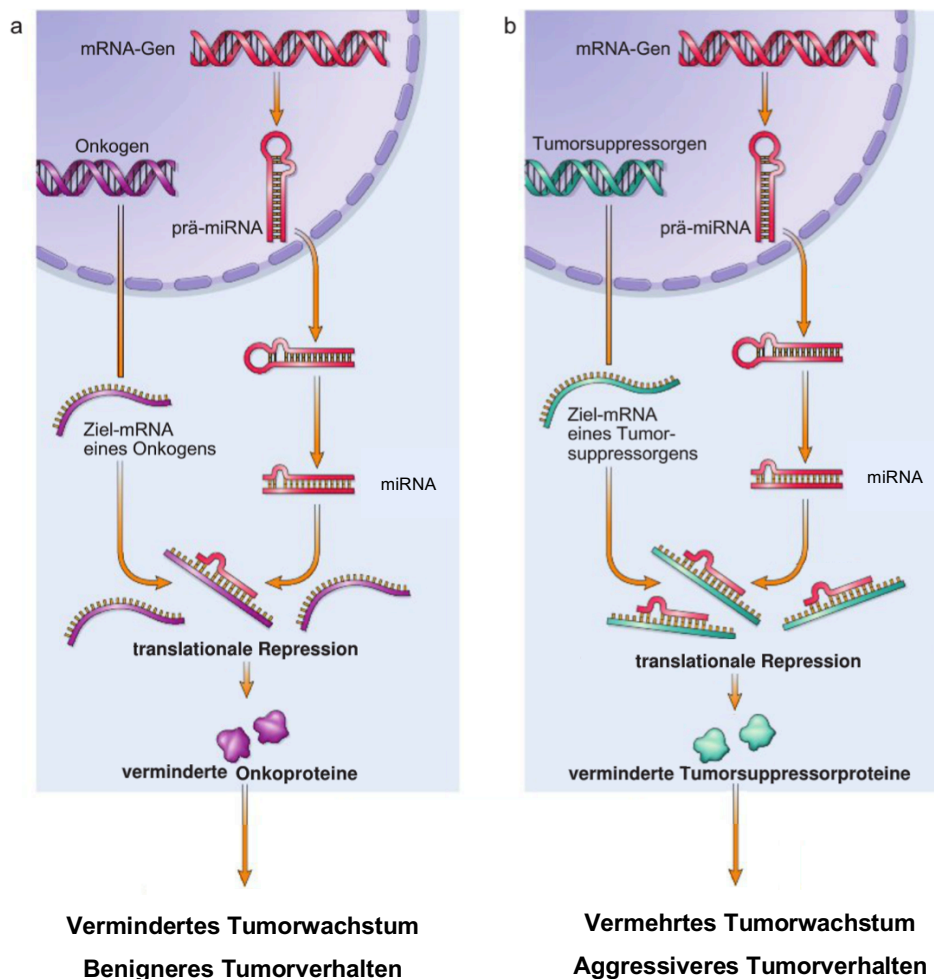
### **2.2.2 miRNA und miRNA-26a**

MiRNAs (microRNAs, miRs) sind ca. 21 bis 25 Nukleotide lange, nicht-kodierende, einzelsträngige RNA-Moleküle, die auf post-transkriptionaler Ebene die Expression proteinkodierender Gene regulieren <sup>23</sup>.

Die reife einzelsträngige miRNA wird in einen Proteinkomplex, den sog. miRISC (miRNA-containing RNA-induced Silencing Complex), eingebaut und steuert ihn zu komplementären Bereichen in Ziel-mRNAs <sup>66</sup>. In Abhängigkeit vom Grad der Komplementarität zwischen der miRNA und der Ziel-mRNA kommt es entweder zu einer Hemmung der Translation (partielle

Komplementarität) oder zu einer vollständigen Degradation der Ziel-mRNA (vollkommene Komplementarität)<sup>24,40,43</sup>.

In gesunden Zellen sind miRNAs an einem komplexen Netzwerk beteiligt, das der Regulation zellbiologisch bedeutsamer Prozesse wie Zellzyklus-Kontrolle<sup>16</sup>, Apoptose<sup>49</sup> sowie Entwicklung und Differenzierung<sup>37</sup> dient. Gerät dieses Netzwerk aus dem Gleichgewicht drohen erhöhte Zellproliferation, fehlende Zellzyklus-Kontrolle sowie verminderte Zelldifferenzierung und Apoptose. Da derartige Veränderungen die Grundlage der Tumorentstehung und -progression zugesprochen<sup>14</sup>. Man unterscheidet tumorsuppressive miRNAs von onkogenen miRNAs in Abhängigkeit der von ihnen regulierten Zielgene (siehe Abb. 04).



**Abb. 04: Bedeutung der miRNAs in der Tumorentstehung (modifiziert nach Böcker et al.<sup>9</sup>).**

a) Tumorsuppressive miRNAs verhindern die Expression von Onkogenen. Ihre Überexpression führt in manchen Tumoren zu einem verminderten Tumorwachstum und einem benigneren Tumorverhalten.

b) Onkogene miRNAs (sog. „oncomirs“) sind in vielen Tumoren überexprimiert und verhindern die Translation wichtiger Tumorsuppressorgene. Infolgedessen kann es zu vermehrtem Tumorwachstum und aggressiverem Tumorverhalten kommen.

Eine Studie aus dem Jahr 2004 belegte, dass mehr als die Hälfte der untersuchten miRNA-Gene in krebsassoziierten genomischen Regionen zu finden sind. Deletionen oder Amplifikationen innerhalb dieser Genabschnitte können zu verminderter oder erhöhter miRNA-Expression führen<sup>15</sup>. Zudem kann ein veränderter Methylierungsstatus der miRNA-Promotoren Expressionsunterschiede hervorrufen und auf diese Weise die Tumorgenese gegebenenfalls begünstigen<sup>81</sup>.

Genom-weite miRNA-Expressionsanalysen belegten, dass eine Dysregulation der miRNA-26a Expression mit der Entstehung von Tumoren assoziiert ist<sup>17</sup>. Dabei nimmt sie je nach Tumor- und Gewebetyp unterschiedliche Rollen ein. In Ösophagusadenkarzinomzellen sowie bei Lungen- oder Mammakarzinomen wirkt sie als Tumorsuppressorgen, während sie in Gliomen hingegen als Onkogen fungiert<sup>28,115,69</sup>. Als wichtige Zielgene der miRNA-26a wurden die Tumorsuppressorgene PTEN (phosphatase and tensin homolog) und Rb1 (Retinoblastom Protein 1) identifiziert<sup>42,115</sup>. In Glioblastomen wird die miRNA-26a häufig vermehrt exprimiert und hemmt die Transkription ihrer Zielgene PTEN und Rb1. Auf diese Weise erhöht sie das Zellwachstum der Glioblastomzellen und fördert die Tumorentstehung<sup>5,30,33,42,50</sup>. Insbesondere Veränderungen der Rb1 Expression werden häufig in glialen Tumoren gefunden und rufen meist aggressive Tumore hervor<sup>5,30</sup>. Durch den Einfluss auf den Rb1-E2F Signalweg kann die miRNA-26a den Zellzyklus steuern. Sie steht somit in direktem Zusammenhang mit der Wirkung alkylierender Chemotherapeutika wie Carmustin, da diese ebenfalls den Zellzyklus ihrer Zielzellen beeinflussen<sup>64</sup>.

## 2.3 Eigene Fragestellung

Die Prognose der Patienten mit Glioblastom ist trotz multimodaler, aggressiver Therapie infaust. Der Therapiestandard besteht seit mehr als zehn Jahren aus der operativen Resektion des Tumorgewebes und der anschließenden konkomitanten Radiochemotherapie nach Stupp<sup>98</sup>. Die zusätzliche intraoperative Implantation von Carmustin-Wafern zur lokalen Chemotherapie lieferte initial hoffnungsvolle Studienergebnisse hinsichtlich eines verbesserten Gesamtüberlebens der Patienten<sup>12,102,109</sup>. Eine kürzlich von Pallud et al. durchgeführte Studie mit 354 Patienten konnte hingegen keinen langfristigen Nutzen hinsichtlich des OS für die Kombination aus Carmustin-Wafer Implantation und Standardtherapie nach Stupp im Vergleich zur Standardtherapie alleine nachweisen<sup>68</sup>.

Aufgrund dieser kontroversen Studienlage wären spezifische und zuverlässige molekulare Marker von großem Nutzen, die präoperativ bei der Entscheidungsfindung für oder gegen eine Carmustin-Wafer Implantation mitwirken. Möglicherweise ist der Benefit dieser Therapie auf eine Patientengruppe beschränkt, deren Tumor ein spezielles Profil an molekularen Veränderungen aufweist. Der miRNA-26a wurde mehrfach in aktuellen Studien eine prognostische Bedeutung bei Glioblastomen zugesprochen<sup>2,75,93,95</sup>. Aus diesem Grund diente die vorliegende Studie der Evaluation einer möglichen prädiktiven Bedeutung der miRNA-26a für eine Therapie mit Carmustin-Wafern.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit lautete daher:

Lässt sich anhand der miRNA-26a Expression eine spezielle Patientensubpopulation charakterisieren, die eine überdurchschnittlich gute Ansprechrate auf eine zusätzlich zur Standardtherapie verabreichte lokale Chemotherapie mit Carmustin-Wafern zeigt? Von besonderem Interesse war hierbei die Mitbeurteilung der molekularen Marker IDH1-Mutationsstatus und MGMT-Methylierungsstatus, da ihnen bereits eine prognostische und prädiktive Bedeutung bei Glioblastomen zugesprochen wurde.



## 3 Material und Methodik

### 3.1 Patientenkollektiv

Die vorliegende retrospektive Matched-Pair-Analyse umfasste insgesamt Daten von 229 Patienten. Hiervon wurden 80 Patienten zwischen 2005 und 2015 in der Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg operiert. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Saarbrücken) genehmigt (Kenn-Nr. 93/16). Alle Gewebeproben wurden sofort nach der Tumorresektion schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Einschlusskriterien waren die neuropathologische Diagnose eines GBM (WHO IV) und eine ausreichende Menge an Tumorgewebe für die weitere Analyse. Vierzig der 80 Patienten wurden entsprechend der Standardtherapie nach Stupp behandelt (Kontroll-Gruppe,  $n = 40$ ). Den restlichen 40 Patienten wurden, zusätzlich zur konkomitanten Radiochemotherapie nach Stupp, intraoperativ Carmustin-Wafer (Gliadel®, Kyowa Kirin GmbN, Düsseldorf, Deutschland) in die Resektionshöhle implantiert (Carmustin-Wafer-Gruppe,  $n = 40$ ).

Da es sich um eine Matched-Pair-Analyse handelt, wurden verschiedene Kriterien vorgegeben, in denen jeweils ein Patient der Carmustin-Wafer-Gruppe mit einem Patienten der Kontroll-Gruppe übereinstimmen musste. Zu diesen Kriterien zählten das Patientenalter bei Erstdiagnose, das Geschlecht und der KPS.

Klinische Daten wie PFS, OS, Ausmaß der Resektion, Alter bei Diagnosestellung, Geschlecht und initialer KPS der eingeschlossenen Patienten standen von allen Patienten zur Verfügung.

Das Ausmaß der Tumorresektion wurde innerhalb von 24 Stunden nach der Operation mittels MRT bestimmt. Als gross total resection wurden die Ergebnisse gewertet, bei denen keine Tumorreste, bzw. keine Kontrastmittel-aufnehmenden Areale im MRT sichtbar waren. Von einer subtotal resection wurde hingegen gesprochen, wenn im MRT noch Tumorreste nachweisbar waren.

Die Ergebnisse der Kontroll-Gruppe wurden mit einem unabhängigen Datensatz von 149 Patienten aus der TCGA (The Cancer Genome Atlas) - Datenbank validiert. Eine entsprechende Validierung der Ergebnisse der Carmustin-Wafer-Gruppe war aufgrund mangelnder Daten nicht möglich.

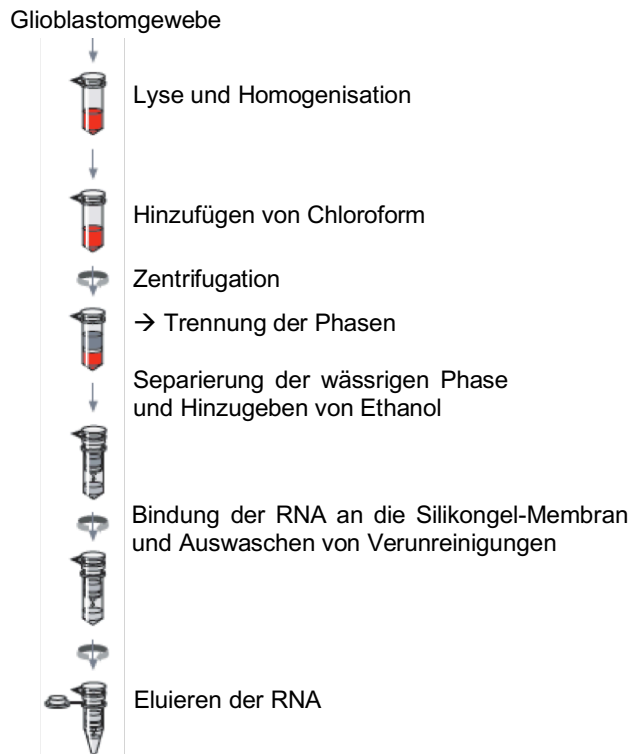
## 3.2 miRNA-Analyse

### 3.2.1 miRNA-Isolation

Die gesamte RNA inklusive miRNA wurde mit Hilfe des miRNeasy Mini Kits von Qiagen (Venlo, Netherlands) isoliert. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben (siehe Abb. 05). Zu Beginn wurden ca. 50 mg des Tumorgewebes direkt in 700 µl TRIzol<sup>®</sup> Reagenz gegeben und für 20-40 s mittels ULTRA-TURRAX<sup>®</sup> (IKA<sup>®</sup>, Staufen, Germany) homogenisiert, um einen Abbau der RNA durch RNAsen zu verhindern. Das Homogenisat wurde nun für 5 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert.

Anschließend wurden 140 µl Chloroform (FisherScientific, Schwerte, Germany) hinzugegeben und das Gemisch für 15 s gevortext. Es folgte eine 3-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Nach diesem Schritt wurde die Probe für 15 min mit 12000 x g bei 4 °C zentrifugiert (Sigma 3-16PK, Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Germany). Hierbei entwickelten sich 3 Phasen. Die oberste, wässrige Phase, welche die RNA enthielt, wurde in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und mit 525 µl 100 %-igem Ethanol durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. 700 µl der Probe wurden in ein RNeasy Mini Column (Filtersäule) gegeben und für 15 s mit > 8000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Minispin, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Dieser Schritt diente der Bindung der RNA an die Silikongel-Membran der RNeasy Mini Column. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgte die Wiederholung dieses Schrittes mit der restlichen Probe.

Nachdem die gesamte RNA an die Membran gebunden war, folgten mehrere Waschschrirte, um Verunreinigungen aus der Membran auszuwaschen. Hierfür wurden zunächst 700 µl RWT-Puffer auf die Silikongel-Membran pipettiert und für 15 s mit > 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. In den folgenden zwei Schritten wurden je 500 µl RPE-Puffer auf die Membran appliziert und bei > 8000 x g zunächst für 15 s und anschließend für 2 min zentrifugiert. Um sicherzustellen, dass die Membran der RNeasy Mini Column von sämtlichen Rückständen befreit war, wurde erneut zentrifugiert (1 min, > 8000 x g). Danach wurde die RNeasy Mini Column in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 50 µl RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben, um die adsorbierte RNA aus der Membran zu lösen. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei > 8000 x g befand sich die eluierte RNA schließlich am Boden des Reaktionsgefäßes. Dieser letzte Schritt wurde noch einmal in identischer Weise wiederholt, um eine höhere RNA-Menge im Eluat zu erzielen. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben bei - 80 °C gelagert.



**Abb. 05: Schritte der RNA-Isolation (modifiziert nach miRNeasy Mini Handbook, Qiagen<sup>60</sup>).** Dargestellt sind die einzelnen Schritte der RNA-Isolation von dem eingesetzten Glioblastomgewebe zu Beginn bis zu dem gewünschten RNA-Eluat.

### 3.2.2 Photometrische Konzentrationsmessung

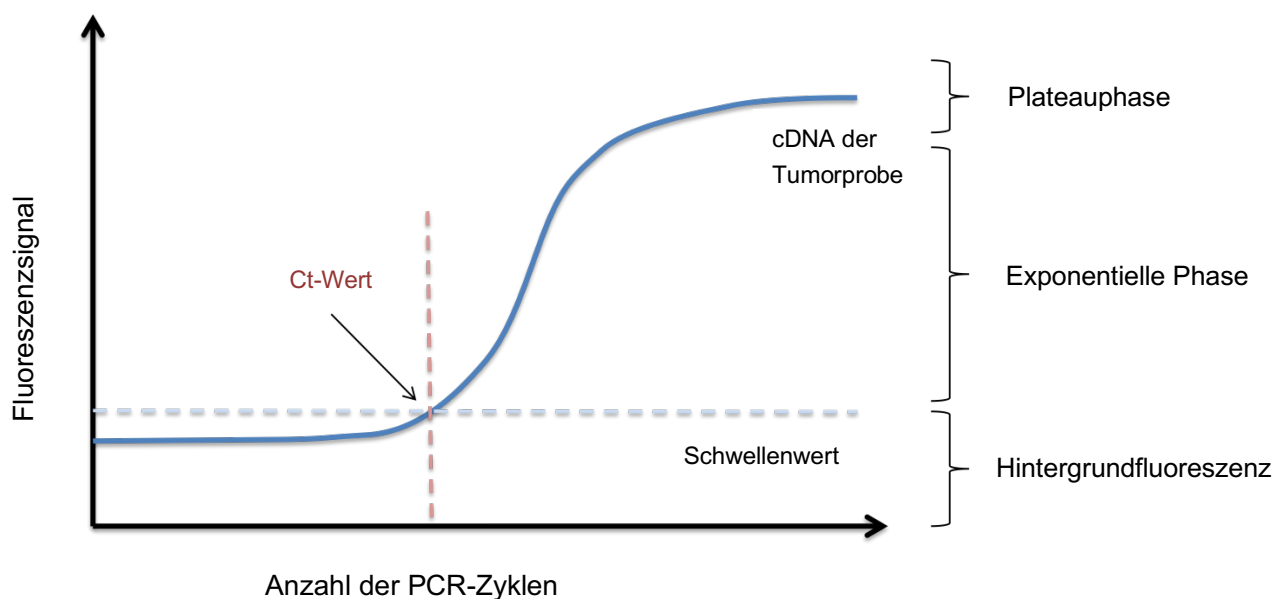
Zur Bestimmung der Konzentration des RNA-Isolates wurde ein NanoDrop-Spektralphotometer (NanoDrop-ND-2000, FisherScientific, Schwerte, Germany) verwendet. Basierend auf dem Absorptionskoeffizienten von 260 nm und dem Standard-Absorptionskoeffizienten von RNA wurde die RNA-Konzentration [ng/μl] bestimmt. Um den Reinheitsgrad und damit die Qualität der RNA zu beurteilen, wurde das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei 260 und 280 nm verwendet. Ein Verhältnis von ~ 2,0 spricht für einen hohen Reinheitsgrad und wurde daher angestrebt<sup>44</sup>. Ist das Verhältnis deutlich niedriger, kann dies auf das Vorhandensein von Protein-, Phenol- oder anderen Verunreinigungen hindeuten<sup>73</sup>. Für die Studie wurden lediglich RNA-Isolate verwendet, bei denen keine Hinweise auf eine Verunreinigung vorlagen.

### 3.2.3 Theorie der quantitativen Real-Time PCR

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt und ermöglicht die Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragmentes aus einem komplexen Pool an DNA<sup>61</sup>.

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ermöglicht es zusätzlich, die DNA-Amplifikation in Echtzeit zu erfassen. Die Methode basiert auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals, welches während der DNA-Amplifikation produziert wird und damit proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt<sup>70</sup>.

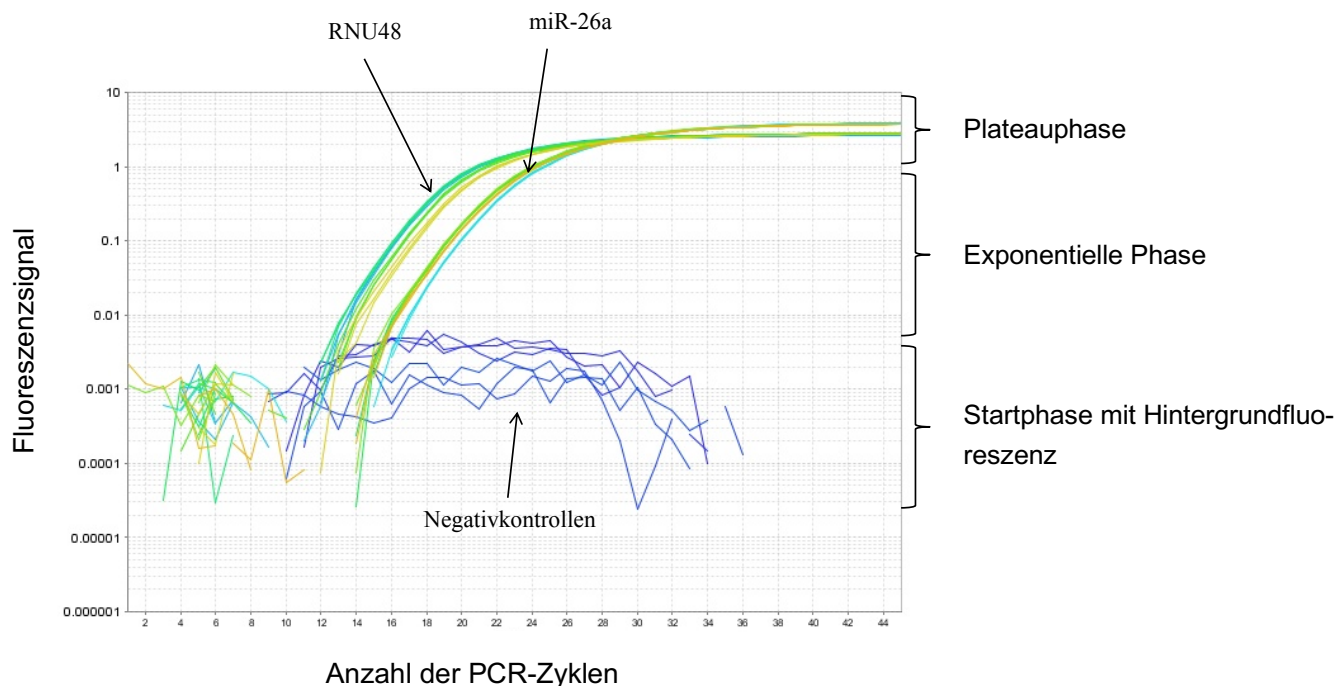
Ein Maß zur Quantifizierung der DNA-Startmenge ist der Ct-Wert (Cycle of Threshold, Schwellenwertzyklus). Er entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau, den sog. Schwellenwert, zu überschreiten<sup>70</sup>. Dies geschieht umso früher, je mehr Template-DNA zu Beginn der Messung eingesetzt wurde. Eine hohe Anfangskonzentration an Template-DNA zeichnet sich daher durch einen niedrigen Ct-Wert aus (siehe Abb. 06).



**Abb. 06: Schaubild einer PCR-Amplifikationskurve.** Dargestellt ist das während einer PCR entstehende Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Anzahl der PCR-Zyklen. Während der ersten PCR-Zyklen entsteht lediglich eine geringe Hintergrundfluoreszenz. Nach dem Überschreiten des Schwellenwertes (Ct-Wert) beginnt die exponentielle Zunahme der Menge an cDNA (exponentielle Phase), welche schlussendlich, u.a. durch den Mangel an Substraten, in der Plateauphase endet. Als quantifizierbares Maß zur Abschätzung der eingesetzten DNA-Startmenge ist der Ct-Wert jeder Probe von Bedeutung.

Im Rahmen der relativen Quantifizierung wird die Expression des zu untersuchenden Gens mit der eines Referenzgens (auch endogene Kontrolle oder „Housekeeping Gen“) normalisiert (siehe Abb. 07). Anforderungen an dieses Referenzgen sind unter anderem ein ubiquitäres Vorkommen, Stabilität während aller Messversuche und eine homogene Expression. Für jede untersuchte Probe wird der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert und ein  $\Delta\text{Ct}$ -Wert bestimmt ( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct-Zielgen} - \text{Ct-}$

Referenzgen). Individuelle Probeneffekte heben sich dadurch in den folgenden Berechnungen wieder auf<sup>76</sup>. In der vorliegenden Studie wurde die RNU48 als endogene Kontrolle verwendet (TaqMan MicroRNA Assay, RNU48, ID 001006, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA), da sie in der Literatur bereits als stabiles Referenzgen für miRNA-Expressionsanalysen beschrieben wurde<sup>93</sup>.



**Abb. 07: PCR-Amplifikationskurven der miR-26a und der RNU48.** Dargestellt ist die Abhängigkeit des PCR-Fluoreszenzsignals von der Anzahl der PCR-Zyklen. Amplifiziert wurden die miRNA-26a und die RNU48 als endogene Kontrolle in allen Tumorproben. Sie überschritten jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten den Schwellenwert (Ct-miR-26a und Ct-RNU48). Im Rahmen der relativen Quantifizierung wurde der Ct-Wert der RNU48 vom Ct-Wert der miR-26a subtrahiert und ein  $\Delta\text{Ct}$ -Wert bestimmt ( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct-miR-26a} - \text{Ct-RNU48}$ ), welcher für die weitere statistische Auswertung von Bedeutung war. Die eingesetzten Negativkontrollen überschritten den Schwellenwert nicht, was wiederum die Aussagekraft dieser experimentellen Methode stärkt.

Für die folgende statistische Auswertung war es notwendig die ermittelten  $\Delta\text{Ct}$ -Werte in den dimensionslosen Fold change (FC) zu transformieren. Er gilt als berechenbares Maß dafür, wie viel miRNA-26a zu Beginn in der jeweiligen Tumorprobe vorhanden war. Ermittelt wurde er mit Hilfe der Formel  $\text{FC} = 2^{-\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\text{CT-miRNA-26a} - \text{CT-RNU48})}$ .

### 3.2.4 Praktische Durchführung der quantitativen Real-Time PCR

#### 3.2.4.1 Herstellung der cDNA

Zu Beginn musste die isolierte RNA mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür kam das TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems (Waltham, Massachusetts, USA) zum Einsatz.

Die zuvor isolierte und bei  $-80\text{ °C}$  gelagerte RNA wurde zunächst über mehrere Stunden auf Eis aufgetaut und anschließend auf  $20\text{ ng}/\mu\text{l}$  verdünnt. Zudem erfolgte die Herstellung eines Mastermix, welcher alle notwendigen Reagenzien für die folgende Reaktion enthielt (siehe Tab. 01). Alle Schritte erfolgten auf Eis.

Tab. 01: Mastermix der Reversen Transkription

Reagenzien	Volumen [ $\mu\text{l}$ ] pro Reaktion
dNTP Mix (100 mM)	0,15
MultiScribe RT Enzym (50U/ $\mu\text{l}$ )	1,00
10x RT-Puffer	1,50
RNase Inhibitor (20U/ $\mu\text{l}$ )	0,19
RNase-freies Wasser	4,16
Gesamtvolumen	7,00

Für die Reverse Transkription galt je Reaktion folgendes Pipettierschema (siehe Tab. 02):

Tab. 02: Pipettierschema der Reversen Transkription

Reagenzien	Volumen [ $\mu\text{l}$ ] pro Reaktion
RT-Mastermix	7,00
RNA-Probe (20 ng/ $\mu\text{l}$ )	5,00
5x RT-Primer	3,00
Gesamtvolumen	15,00

Nach vorsichtigem Mischen und Zentrifugieren des Reaktionsansatzes folgte eine 5-minütige Inkubationszeit auf Eis. Danach wurden die Proben in den Thermocycler (PTC-200, MJ Research, Watertown, USA) gegeben und die Reaktion mit dem in Tab. 03 aufgeführten Programm gestartet. Anschließend wurde die dabei entstandene cDNA bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

Tab. 03: Reaktionsschritte der Reversen Transkription

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

### 3.2.4.2 Durchführung der qRT-PCR

Die qRT-PCR wurde mithilfe des TaqMan® Gene Expression Mastermix für quantitative Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) und des TaqMan® MicroRNA Assays (TaqMan MicroRNA Assay, miRNA-26a, ID 000404; Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt. Dabei diente die zuvor hergestellte cDNA als Ausgangsmaterial. Jede Probe wurde als Triplikat jeweils dreimal gemessen. In gleicher Weise erfolgte die Messung von RNase-freiem Wasser als Negativkontrolle und der RNU48 (TaqMan MicroRNA Assay, RNU48, ID 001006; Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) als Referenzgen. Zunächst musste für die qRT-PCR ein Mastermix hergestellt werden, welcher aus den in Tab. 04 aufgeführten Komponenten bestand.

Tab. 04: Mastermix der qRT-PCR

Reagenzien	Volumen [µl] pro Reaktion
TaqMan® Gene Expression Mastermix	5,00
RNase-freies Wasser	3,50
TaqMan® MicroRNA Assay Primer (20x)	0,50
Gesamtvolumen	9,00

Je Reaktion galt folgendes Pipettierschema (siehe Tab. 05):

Tab. 05: Pipettierschema der qRT-PCR

Reagenzien	Volumen [ $\mu$ l] pro Reaktion
qRT-PCR Mastermix	9,00
cDNA/ RNU48/ Negativkontrolle	1,00
Gesamtvolumen	10,00

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis direkt in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (MicroAmp® Fast 96-well Reaction Plate (0,1 ml), Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt) pipettiert. Diese wurde anschließend mit einer Folie (MicroAmp® Optical Adhesive Film, Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt) verschlossen und für 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5805 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Die Messung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems und der StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems®, USA). Die in Tab. 06 aufgeführten Reaktionsschritte wurden chronologisch durchlaufen.

Tab. 06: Reaktionsschritte der qRT-PCR

Schritt	Zeit	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Anzahl der PCR- Zyklen
Enzymaktivierung	10 min	95	1
Denaturierung	15 s	95	40
Annealing und Extension	60 s	60	

### 3.3 DNA-Analyse

#### 3.3.1 DNA-Isolation

Zur Bestimmung des MGMT-Methylierungsstatus der untersuchten Proben musste die DNA aus den Tumorproben isoliert werden. Hierfür wurde das zu untersuchende Glioblastomgewebe in eine sterile Petrischale überführt und mit einer Schere mechanisch zerkleinert. Der mechanischen Zerstörung schloss sich die alkalische Zellyse an. Dazu wurde das zerkleinerte Gewebe zunächst in einen 50 ml Falcon pipettiert und anschließend 4,5 ml SE-Puffer (75 mM NaCl; 25 mM Na<sub>2</sub> EDTA; pH 8.0), 0,5 ml 10 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate;



pH 8) und eine Spatelspitze Proteinase K hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 1-3 Nächte bei 55 °C im Schüttelbad inkubiert. Während der Inkubation kam es zur Destruktion der Zellen und Freisetzung der Zellbestandteile (inkl. DNA), wobei die hinzugegebene Proteinase K die dabei freiwerdenden Proteine abbaute. Es musste täglich kontrolliert werden, ob noch Gewebereste in der Probe vorhanden waren und dementsprechend musste gegebenenfalls erneut eine Spatelspitze Proteinase K hinzugegeben werden. Die weitere Verarbeitung erfolgte erst, nachdem eine klare durchscheinende Lösung ohne sichtbare Gewebereste entstanden war.

Die folgenden Schritte dienen der Aufarbeitung der DNA. Dazu wurden 2 ml 6 molare NaCl-Lösung und 7 ml Chloroform der Probe hinzugegeben. Sie wurde daraufhin eine Stunde über Kopf geschüttelt und anschließend für eine weitere Stunde bei 2500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation hatten sich drei verschiedene Phasen gebildet, wobei die oberste, welche die DNA enthielt, vorsichtig in einen weiteren 50 ml Falcon überführt wurde. Die beiden anderen Phasen wurden verworfen. Im nächsten Schritt wurden 7 ml Chloroform zur Probe hinzugegeben und diese 30 min lang über Kopf geschüttelt. Anschließend folgte eine 30-minütige Zentrifugation (4000 rpm; 4 °C).

Hierauf folgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 5-7 ml Isopropanol 100%. Das entstandene DNA-Knäuel wurde in ein neues Eppendorfgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) mit 1 ml 70 %-igem Ethanol überführt und für 30 min bei 4 °C gewaschen, um alle alkohollöslichen Salze zu entfernen. Die DNA wurde anschließend in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und für maximal 30 min bei 37 °C auf der Heizplatte getrocknet. Über Nacht wurde sie in 300-500 µl Aqua destillata (Aqua dest.) gelöst und am nächsten Tag photometrisch die DNA-Konzentration bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.2).

### **3.3.2 Bisulfitkonversion und Methylierungsspezifische PCR**

#### **3.3.2.1 Theorie**

Die Kombination aus Bisulfitkonversion und anschließender Methylierungsspezifischer PCR (MS-PCR) ermöglicht die basengenaue Bestimmung der DNA-Methylierung. Im Rahmen der Bisulfitkonversion kommt es zur Umwandlung der unmethylierten Base Cytosin in die Base Uracil. Ist Cytosin im DNA-Strang hingegen methyliert (5-Methylcytosin) findet keine Umwandlung zu Uracil statt<sup>27</sup>. Die DNA-Stränge sind infolgedessen nicht mehr komplementär zueinander. Für die anschließende Amplifikation mittels MS-PCR sind daher spezielle Primer erforderlich, die an methylierte und unmethylierte Bereiche, sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung binden. Es waren daher für jedes zu untersuchende Gen (MGMT und Rb1) vier verschiedene Primersequenzen notwendig (siehe Tab. 07).

Tab. 07: MGMT und RB1 Primersequenzen für die MS-PCR

	MGMT	Rb1
methyliert	forward: 5'-GTTTTTAGAACGTTTTGCGTTTCGAC-3'	forward: 5'-GGGAGTTTCGCGGACGTGAC-3'
	reverse: 5'-CACCGTCCCAGAAAAAACTCCG-3'	reverse: 5'-ACGTCGAAACACGCCCCG-3'
unmethyliert	forward: 5'-TGTGTTTTTAGAATGTTTTGTGTTTTGAT-3'	forward: 5'-GGGAGTTTTGTGGATGTGAT-3'
	reverse: 5'-CTACCACCATCCCAGAAAAAACTCCA-3'	reverse: 5'-ACATCAAAACACACCCCA-3'

### 3.3.2.2 Praktische Durchführung der Bisulfitkonversion

Für die Bisulfitkonversion wurde das EZ DNA Methylation Gold TM-Kit (ZymoResearch, Freiburg, Germany) verwendet. Zunächst musste aus 900 µl Aqua dest., 300 µl M-Dilutions Puffer und 50 µl M-Dissolving Puffer ein Konversionsreagenz angesetzt werden. Nach 10-minütigem Vortexen aller Komponenten folgte eine Ruhepause für weitere 10 Minuten. Von diesem Konversionsreagenz wurden je 130 µl in ein Eppendorfgefäß gegeben und mit je 20 µl der zuvor auf 25 ng/µl verdünnten DNA-Probe vermischt. Das Gemisch wurde daraufhin im Thermocycler (PTC-200, MJ Research, Watertown, USA) inkubiert (siehe Tab. 08).

Tab. 08: Reaktionsschritte der Bisulfitkonversion

Schritt	Zeit	Temperatur [°C]
1	10 min	98
2	2,5 h	64
3	mind. 20 min (bis zu 20 h)	4

Im Anschluss wurden 600 µl M-Binding Puffer auf eine Zymo-Spin-Filtersäule mit Auffangbehälter pipettiert und die zuvor inkubierte Probe hinzugegeben. Durch mehrfaches Invertieren wurde die Probe gemischt und anschließend für 30 s bei > 10.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nach diesem Schritt und nach allen folgenden Waschschritten verworfen. Daraufhin wurden 100 µl M-Wasch-Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 30 s bei

>10.000 x g zentrifugiert. Es folgte eine 20-minütige Inkubation mit 200 µl M-Desulphonations-Puffer bei Raumtemperatur. Danach wurde der Puffer mithilfe der Zentrifugalkraft (> 10.000 x g; 30 s) ausgewaschen. Die beiden letzten Waschschrte liefen in identischer Weise ab. Es wurden jeweils 200 µl M-Wasch-Puffer auf die Filtersäule gegeben und bei > 10.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Im letzten Schritt folgte das Eluieren der DNA. Dazu wurde die Filtersäule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für eine Minute mit 10 µl M-Elutions-Puffer inkubiert. Durch die darauffolgende Zentrifugation (> 10.000 x g; 30 s) löste sich die DNA aus dem Filter und konnte am Boden des Eppendorfgefäß` aufgefangen werden.

### 3.3.2.3 Praktische Durchführung der Methylierungsspezifischen PCR

Für die methylierungsspezifische PCR musste zu Beginn je ein Mastermix für den Nachweis methylierter DNA-Abschnitte und ein Mastermix für den Nachweis nicht-methylierter DNA-Abschnitte hergestellt werden (siehe Tab. 09).

Tab. 09: Mastermixkomponenten der MS-PCR

Mastermix methyliert		Mastermix unmethyliert	
Reagenzien	Volumen [µl]	Reagenzien	Volumen [µl]
H <sub>2</sub> O	17,80	H <sub>2</sub> O	17,80
TaqPuffer 10x	2,50	TaqPuffer 10x	2,50
dNTP 0,2 mM	0,50	dNTP 0,2 mM	0,50
Primer forward methyliert	1,00	Primer forward unmethyliert	1,00
Primer reverse methyliert	1,00	Primer reverse unmethyliert	1,00
Polymerase	0,20	Polymerase	0,20
Gesamtvolumen	23,00	Gesamtvolumen	23,00

Im Anschluss wurden zu 23 µl des jeweiligen Mastermix 2 µl der bisulfitmarkierten DNA pipettiert. Außerdem benötigte man eine Positivkontrolle (industriell hergestellte bisulfitmarkierte, methylierte DNA), eine Negativkontrolle (unmethylierte DNA eines Dura mater Resektates) und eine Kontrolle, die weder methyliert noch unmethyliert war (Aqua dest.). Von diesen drei Kontrollen wurden ebenfalls je 2 µl zu 23 µl des jeweiligen Mastermix

pipettiert. Anschließend folgte die Inkubation der Reaktionsansätze im Thermocycler (PTC-100, MJ Research, Watertown, USA). Hierzu waren je nach Primer unterschiedliche Programmeinstellungen erforderlich (siehe Tab. 10 und 11).

Tab. 10: Reaktionsschritte der Analyse von MGMT

MGMT methyliert			MGMT unmethyliert		
Schritt	Dauer	Temperatur [°C]	Dauer	Temperatur [°C]	
1	15 min	95	15 min	95	
2	30 s	95	30 s	95	
3	30 s	54	30 s	56	
4	30 s	72	30 s	72	
5	5 min	72	5 min	72	
6	∞	4	∞	4	

*Note: In the original image, steps 2-4 for both methylyated and unmethylyated samples are grouped with brackets and labeled '36x' and '38x' respectively.*

Tab. 11: Reaktionsschritte der Analyse von Rb1

Rb1 methyliert			Rb1 unmethyliert		
Schritt	Dauer	Temperatur [°C]	Dauer	Temperatur [°C]	
1	15 min	95	15 min	95	
2	45 s	95	45 s	95	
3	45 s	55	45 s	55	
4	45 s	72	45 s	72	
5	5 min	72	5 min	72	
6	∞	4	∞	4	

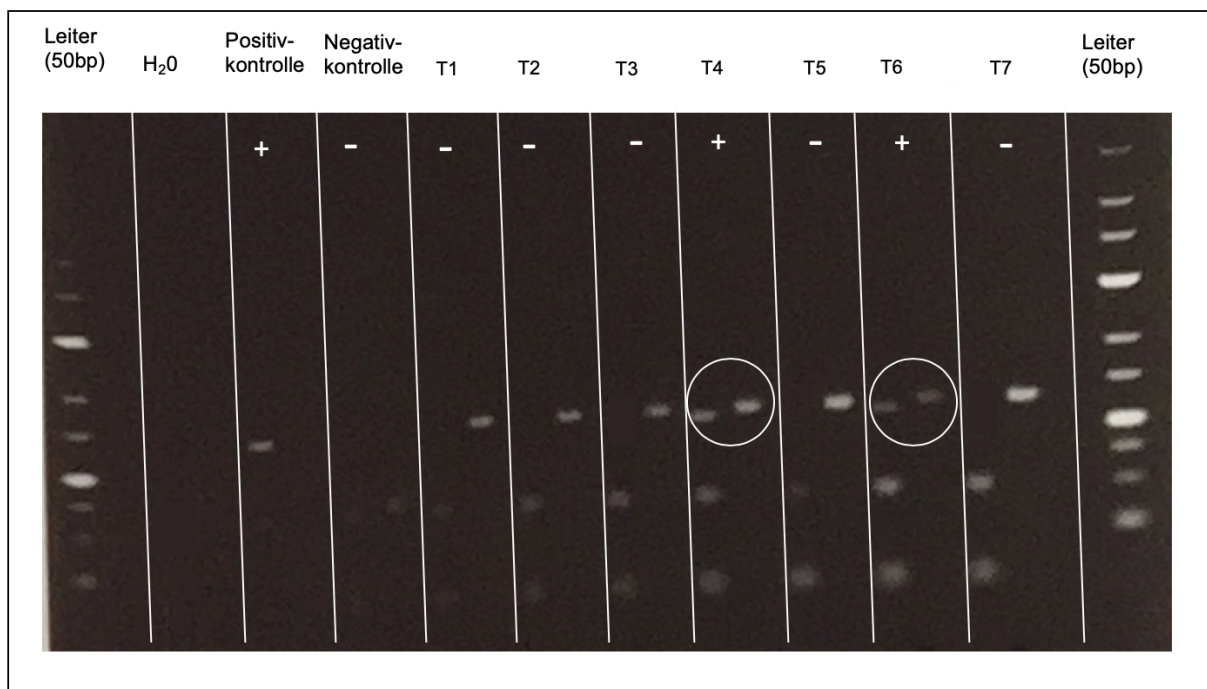
*Note: In the original image, steps 2-4 for both methylyated and unmethylyated samples are grouped with brackets and labeled '35x'.*

### 3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe dieses Verfahrens erfolgte die Auftrennung der amplifizierten PCR-Produkte entsprechend ihrer Größe durch Anlage eines elektrischen Feldes. Hierfür musste ein Agarosegel bestehend aus TBE-Puffer und Agarose angesetzt werden. Für die Herstellung von einem Liter TBE-Puffer wurden 10,78 g (89 mM) TRIS, 5,50 g (89 mM) Borsäure und

0,58 g (2 mM) EDTA mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 150 ml 1 x TBE-Puffer und 2 g Agarose (peq-GOLD Universal-Agarose, PeqLab) zunächst aufgeköcht und anschließend abgekühlt. Danach wurden 8 µl Ethidiumbromid (1%ige Lösung in Wasser, Merck KGaA, Darmstadt) hinzugegeben und das gesamte Gemisch in eine Gelelektrophoresekammer (Owl™ Buffer Puffer B3, ThermoFisher) überführt. Nach Auspolymerisierung des Gels wurde die Kammer mit TBE-Puffer als Leitsubstanz aufgefüllt.

Ca. 10 µl der bei der MS-PCR entstandenen Produkte wurden mit je 2 µl Loading Dye (Ladepuffer; VWR, Darmstadt) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Gleichermaßen wurde auch mit der Positivkontrolle, der Negativkontrolle und dem Aqua dest. verfahren. Zudem wurden 4 µl Leiter (50bp DNA Ladder, New England BioLabs, Frankfurt a.M.) und 16 µl Aqua dest. mit 4 µl Loading-Dye versetzt und rechts und links der Proben in je eine Geltasche pipettiert, um die PCR-Produkte nach der gelelektrophoretischen Auftrennung anhand eines Längenstandards beurteilen zu können. Die Laufzeit betrug ca. 2h bei einer Spannung von 120V und 260mA (siehe Abb. 08).



**Abb. 08: Agarose-Gelelektrophorese zur Detektion des Methylierungsstatus von MGMT.** Die gelelektrophoretische Auftrennung der eingesetzten methylierten und unmethylierten DNA-Moleküle erfolgte entsprechend ihrer molekularen Masse. Mithilfe von Ethidiumbromid und UV-Licht wurden die DNA-Banden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung sichtbar gemacht. Die aufgetragene Leiter diente als Längenstandard zur Bestimmung der molekularen Masse der eingesetzten Moleküle. Das Bandenmuster der Positiv- und Negativkontrollen diente als Referenzmuster für die Banden der eingesetzten Tumorproben

(exemplarisch T1 bis T7). Die Tumorproben T4 und T6 zeigten das identische Bandenmuster wie die Positivkontrolle und sind daher als „methyliert“ zu werten. Zur Kontrolle möglicher Verunreinigungen wurde H<sub>2</sub>O aufgetragen, welches keinerlei Bandenmuster aufweisen sollte.

### **3.3.4 IDH1- R132H Immunhistochemie**

Die Bestimmung des IDH1-Mutationsstatus mittels Immunhistochemie erfolgte freundlicherweise in Zusammenarbeit mit Louisa Schöneberger und dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer. An dieser Stelle ein herzliches Dankeschön dafür.

## **3.4 Statistik**

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Programms SPSS v.25 (IBM, Armonk, USA) durchgeführt. Die Korrelation zwischen der miRNA26a-Expression und den klinischen Parametern OS und PFS wurde anhand linearer Regressionsmodelle analysiert. Die Tumorprogression wurde radiologisch durch erneutes Kontrastmittel-Enhancement und/oder offensichtliches Tumorwachstum sowie durch den Tod des Patienten definiert.

Anschließend erfolgte eine zeitabhängige Auswertung mittels Cox-Regression und Kaplan-Meier-Regression. Hierfür wurden die erhobenen Daten zunächst anhand des mittleren Fold Change der miRNA-26a Expression (FC miRNA-26a = 0,47) dichotomisiert.

Mit Hilfe des Log-Rank-Tests wurden die miRNA26a-Expressionsunterschiede zwischen der Carmustin-Wafer-Gruppe und der Kontroll-Gruppe verglichen. Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

Zudem erfolgte eine multiple Cox-Regressionsanalyse, um den Einfluss der miRNA-26a Expression auf das Überleben der Patienten in Abhängigkeit anderer wichtiger Einflussfaktoren wie MGMT-Methylierungsstatus, IDH1-Mutationsstatus und operativem Resektionsausmaß zu bewerten.

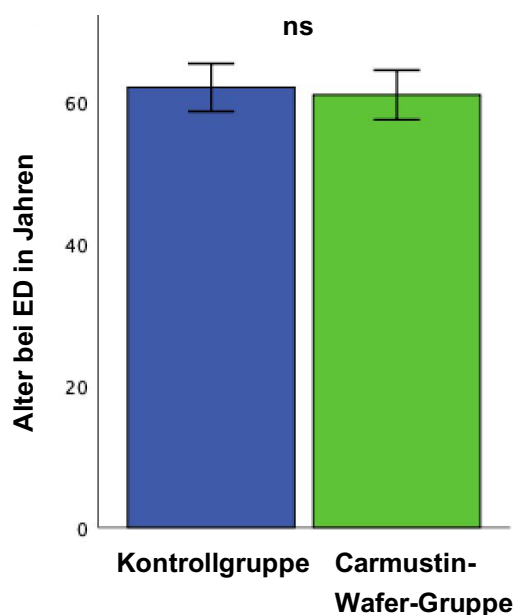
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientenkollektiv

#### 4.1.1 Alters- und Geschlechtsverteilung, KPS

In der vorliegenden Arbeit wurde Tumorgewebe von insgesamt 80 Patienten mit einem neu diagnostizierten Glioblastom untersucht. 40 Proben stammten dabei von Patienten, die entsprechend der Standard-Radiochemotherapie nach Stupp behandelt wurden (Kontroll-Gruppe). Die 40 weiteren Proben stammten hingegen von Patienten, denen zusätzlich zum Behandlungsschema nach Stupp intraoperativ Carmustin-Wafer in die Resektionshöhle implantiert wurden (Carmustin-Wafer-Gruppe). Die vorliegende Matched-Pair-Analyse zeichnete sich dadurch aus, dass jeweils ein Patientenpaar aus beiden Therapiearmen in vorgegebenen Matched-Pair-Kriterien übereinstimmte.

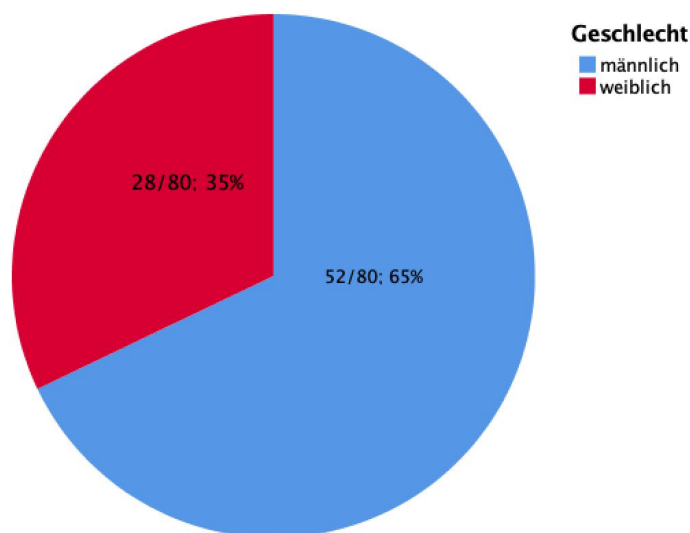
Das Gesamtkollektiv ( $n = 80$ ) wies bei Erstdiagnose (ED) ein durchschnittliches Alter von  $61,5 \pm 10,7$  Jahren [39,5 - 83,1 Jahren] auf. In der Carmustin-Wafer-Gruppe ( $n = 40$ ) lag dieses bei  $60,9 \pm 10,9$  Jahren [39,5 - 80,1 Jahren]. Die Patienten der Kontroll-Gruppe ( $n = 40$ ) zeigten bei ED ein durchschnittliches Alter von  $62,1 \pm 10,6$  Jahren [42,9-83,1 Jahren]. Zwischen der Kontroll- und der Carmustin-Wafer-Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,91$ ) in Bezug auf das Alter bei ED (siehe Abb. 09).



**Abb. 09: Durchschnittliches Alter der Patienten bei Erstdiagnose.** Dargestellt ist ein Säulendiagramm der Altersverteilung des gesamten Patientenkollektivs, welches gemäß

beider Untersuchungsgruppen aufgeteilt wurde. Zwischen beiden Untersuchungsgruppen bestand in Bezug auf die Altersverteilung bei Erstdiagnose kein signifikanter Unterschied.

Das Geschlechterverhältnis Männer zu Frauen betrug im gesamten Patientenkollektiv 1,8 : 1 (52 Männer: 28 Frauen; siehe Abb. 10). Zudem lag der mediane KPS bei 80.



**Abb. 10: Geschlechtsverteilung des gesamten Patientenkollektivs.** Der Anteil der Männer (n = 52; blau hinterlegt) am Gesamtkollektiv (n = 80) betrug 65% und der Anteil der Frauen (n = 28; rot hinterlegt) 35%.

#### 4.1.2 OS und PFS im Gesamtkollektiv

Das Gesamtkollektiv (n = 80) zeigte ein OS von  $13,5 \pm 13,1$  Monaten [0,6 – 69,8 Monate] und ein durchschnittliches PFS von  $9,0 \pm 9,6$  Monaten [0,6 – 50,1 Monate].

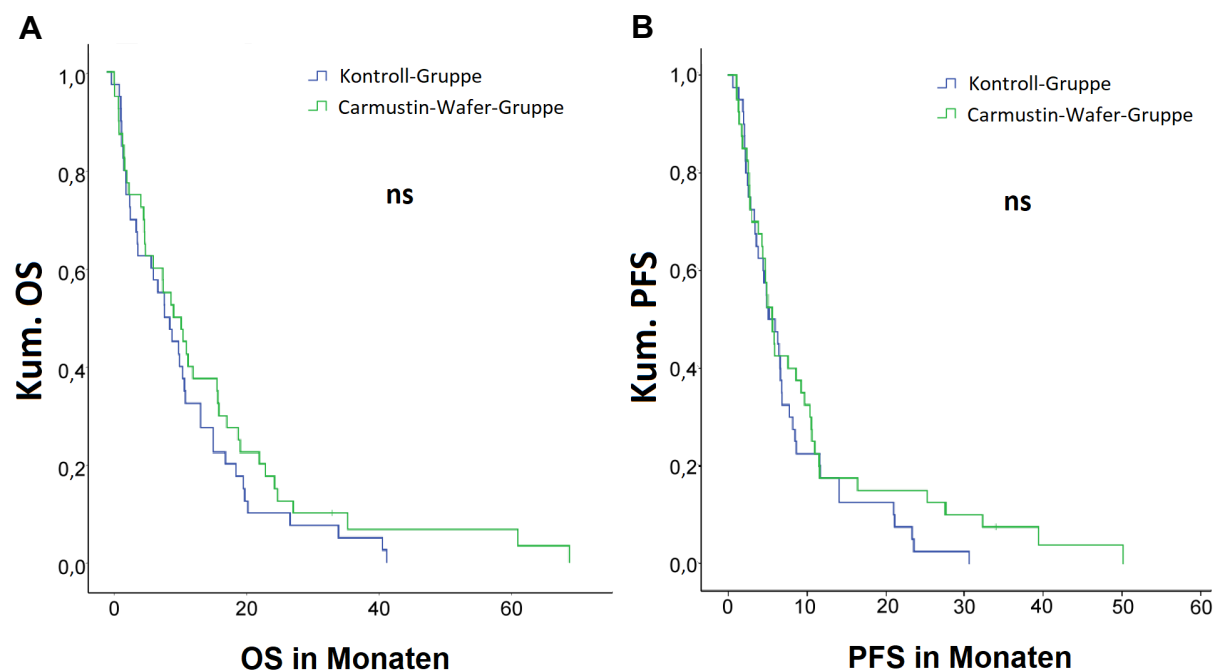
In der Carmustin-Wafer-Gruppe (n = 40) lag das OS bei  $14,7 \pm 15,1$  Monaten [1,0–69,8 Monaten] und das PFS bei  $10,1 \pm 11,5$  Monaten [1,0–50,1 Monate].

Die Patienten der Kontroll-Gruppe (n = 40) zeigten ein durchschnittliches OS von  $12,5 \pm 10,5$  Monaten [0,6–30,6 Monate] und ein durchschnittliches PFS von  $7,8 \pm 7,1$  Monaten [0,6–30,6 Monate].

Der Vergleich beider Untersuchungsgruppen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Carmustin-Wafer-Gruppe und der Kontroll-Gruppe in Bezug auf das OS ( $p = 0,273$ ) und das PFS ( $p = 0,286$ ).



Im Folgenden wurden das OS und PFS der Kontroll-Gruppe mit dem der Carmustin-Wafer-Gruppe verglichen und mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse graphisch dargestellt.



**Abb. 11: Vergleich von OS und PFS beider Untersuchungsgruppen.** Dargestellt sind zwei Kaplan-Meier-Analysen. Abb. A zeigt das OS und Abb. B das PFS der einzelnen Patienten der Kontroll-Gruppe (blaue Kurve) und der Carmustin-Wafer-Gruppe (grüne Kurve) in Monaten. Deutlich wird, dass zwischen beiden Untersuchungsgruppen in Bezug auf das OS und PFS kein signifikanter Unterschied bestand.

#### 4.1.3 Chirurgisches Resektionsausmaß

Die operative Tumorsektion erfolgte bei jedem Patienten individuell. Im gesamten Patientenkollektiv ( $n = 80$ ) wurde bei 26 von 80 Patienten (32,5%) eine gross total resection und bei 51 von 80 Patienten (63,75%) eine subtotal resection erzielt. Bei 3 von 80 Patienten (3,75%) war eine Bestimmung des Resektionsausmaßes mangels postoperativer MRT-Aufnahmen nicht möglich („nicht näher definiert“). In der Carmustin-Wafer-Gruppe wiesen 15 der 40 Patienten (37,5 %) eine gross total resection auf und 23 der 40 Patienten (57,5%) eine subtotal resection. Zwei der 40 Patienten (5%) wurden der Kategorie nicht näher definiert zugeordnet. In der Kontroll-Gruppe wiesen 11 der 40 Patienten (27,5 %) eine gross total resection auf und 28 der 40 Patienten (70%) eine subtotal resection. Einer der 40 (2,5%) Patienten wurden der Kategorie nicht näher definiert zugeordnet.

Das Ausmaß der operativen Tumorsektion hatte einen signifikanten Einfluss auf das OS ( $p = 0,004$ ) und das PFS ( $p = 0,023$ ). Die Patienten, bei denen eine gross total resection erzielt werden konnte, zeigten ein durchschnittliches OS von  $21,1 \pm 20,1$  Monaten [2,2 – 69,8 Monate] und ein PFS von  $14 \pm 15,1$  Monaten [1,3 – 50,1 Monate]. Eine subtotal resection

ging hingegen mit einem durchschnittlichen OS von  $10,7 \pm 8,9$  Monaten [0,6 – 41,5 Monate] und einem PFS von  $7,6 \pm 6,7$  Monaten [0,6 – 27,5 Monate] einher.

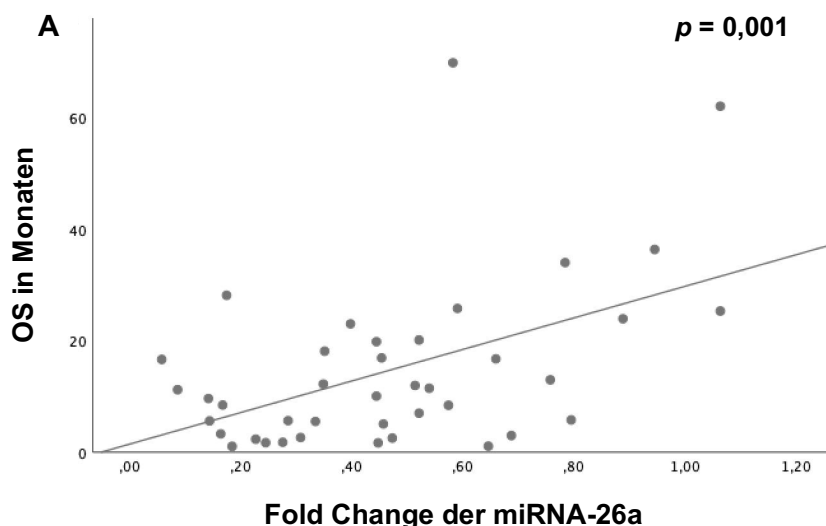
## 4.2 Ergebnisse der miRNA-Analysen

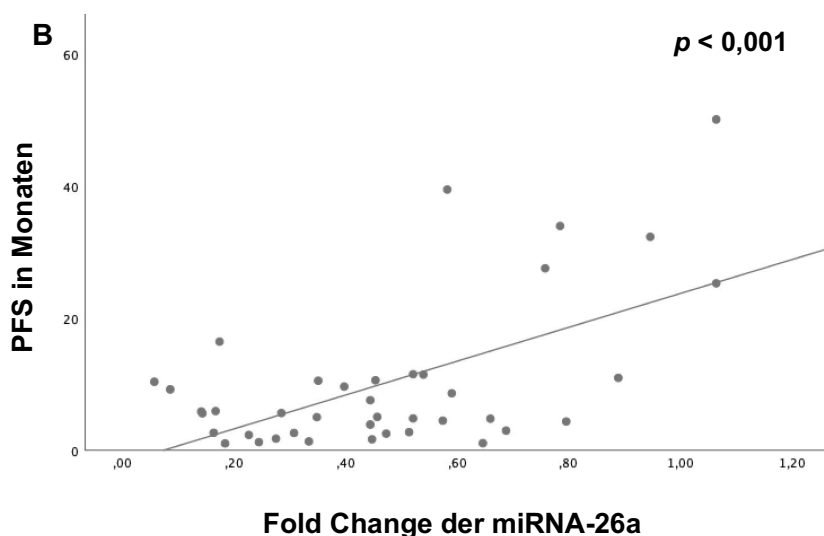
Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, den Einfluss der miRNA-26a auf das OS und das PFS von Patienten mit GBM zu untersuchen, die zusätzlich zur Standardtherapie nach Stupp eine lokale Chemotherapie mittels intraoperativer Carmustin-Wafer erhielten.

Hierzu wurde die Expression der miRNA-26a in allen Tumorproben ( $n = 80$ ) analysiert. Um in der klinischen Anwendung einen messbaren Parameter als Anhaltspunkt für das miRNA-Expressionsniveau bestimmen zu können, wurde der dimensionslose FC der miRNA-26a Expression ausgewertet (siehe Abschnitt 3.2.3, Seite 27), welcher  $0,47 \pm 0,26$  [0,06-1,06] betrug. Das gesamte Patientenkollektiv wurde im weiteren Verlauf der statistischen Auswertung zur besseren graphischen Darstellung auf der Grundlage des durchschnittlichen FC von 0,47 in diejenigen Patienten mit hoher ( $FC \geq 0,47$ ) und diejenigen Patienten mit niedriger ( $FC < 0,47$ ) miRNA-26a Expression unterteilt. Zwischen der Kontroll- und der Carmustin-Wafer-Gruppe bestand in Bezug auf die miRNA-26a Expression kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,254$ ).

### 4.2.1 miRNA-26a Expression in der Carmustin-Wafer-Gruppe

Um den Zusammenhang zwischen der miRNA-26a Expression und dem OS bzw. dem PFS zu ermitteln, wurde zunächst eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Auf diese Weise konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der miRNA-26a Expression und dem OS ermittelt werden ( $p = 0,001$ ; Abb. 12/A). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei der Korrelation der miRNA-26a Expression und dem PFS ( $p < 0,001$ ; Abb. 12/B).





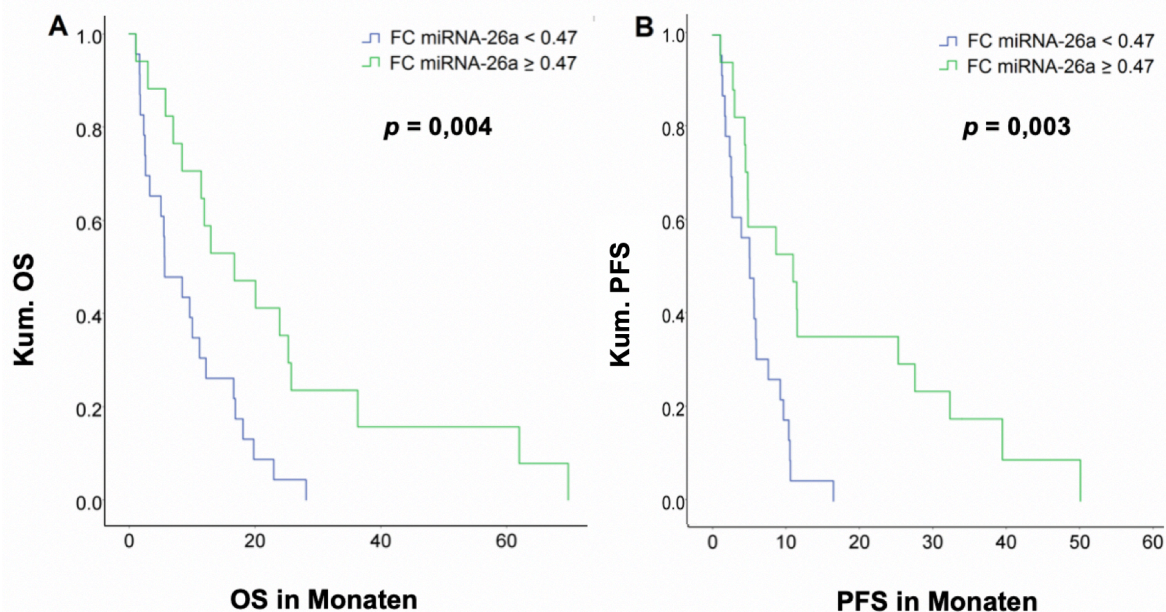
**Abb. 12: Lineare Regressionsanalyse des OS und PFS in der Carmustin-Wafer-Gruppe.** In Abb. A ist die Abhängigkeit des OS der Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe von dem Fold Change der miRNA-26a dargestellt und in Abb. B die Abhängigkeit des PFS von dem Fold Change der miRNA-26a. Sowohl für das OS als auch für das PFS der Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe konnte ein signifikanter Zusammenhang mit der miRNA-26a Expression dargestellt werden.

Die Cox-Regressionsanalyse bestätigte, dass eine hohe miRNA-26a Expression signifikant mit einem verbesserten PFS (HR 3.091 [95%-KI: 1.436-6.657];  $p = 0.003$ ) und einem verbesserten OS (HR 2.750 [95%-KI: 1.352-5.593];  $p = 0.004$ ) korreliert ist.

Um die Auswirkungen einer erhöhten miRNA-26a Expression auf das OS und PFS der Patienten untersuchen zu können, erfolgte im Weiteren eine Dichotomisierung der Daten anhand des errechneten durchschnittlichen FC von 0,47. Die 40 Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe wurden so in 23 Patienten mit niedriger miRNA-26a Expression und 17 Patienten mit hoher miRNA-26a Expression eingeteilt.

Die 23 Patienten in der Carmustin-Wafer-Gruppe mit niedriger miRNA-26a Expression zeigten ein PFS von  $5,6 \pm 4,0$  Monaten und ein OS von  $9,26 \pm 7,77$  Monaten. Die 17 Patienten mit hoher miRNA-26a Expression zeigten hingegen ein PFS von  $16,27 \pm 15,26$  Monaten und ein OS von  $22,01 \pm 19,45$  Monaten.

Nachfolgend wurden die dichotomisierten Daten der Carmustin-Wafer-Gruppe mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse graphisch dargestellt (siehe Abb. 13).

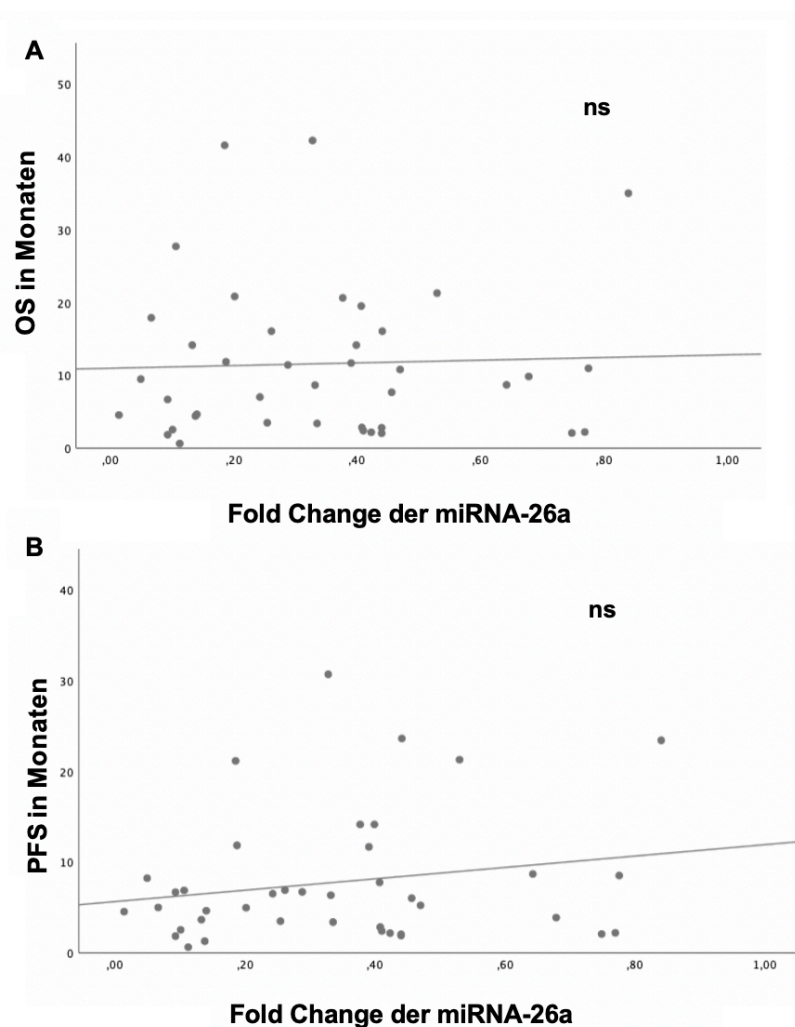


**Abb. 13: Kaplan-Meier-Kurven des OS und PFS der Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe.** Abb. A zeigt das OS der Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe in Abhängigkeit von der miRNA-26a Expression. Patienten mit hoher miRNA-26a Expression (FC  $\geq 0,47$ ; grüne Kurve) zeigen ein signifikant längeres OS als Patienten mit niedriger miRNA-26a Expression (FC  $< 0,47$ ; blaue Kurve). Abb. B zeigt das PFS der Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe in Abhängigkeit von der miRNA-26a Expression. Auch hier zeigen Patienten mit hoher miRNA-26a Expression (FC  $\geq 0,47$ ; grüne Kurve) ein signifikant längeres PFS als Patienten mit niedriger miRNA-26a Expression (FC  $< 0,47$ ; blaue Kurve).

Der Log-Rank-Test zeigte ein ähnliches Ergebnis wie die Cox-Regression. Sowohl das OS ( $p = 0,004$ ) als auch das PFS ( $p = 0,003$ ) waren bei denjenigen Patienten mit hoher miRNA-26a Expression signifikant länger als bei denjenigen Patienten mit niedriger miRNA-26a Expression.

#### 4.2.2 miRNA-26a Expression in der Kontroll-Gruppe

Auch in der Kontroll-Gruppe wurde zunächst der Zusammenhang zwischen der miRNA-26a Expression und dem OS bzw. dem PFS mittels linearer Regressionsanalyse untersucht. Hier konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der miRNA-26a Expression und dem OS ( $p = 0,813$ ; Abb. 14, Abschnitt A) bzw. dem PFS ( $p = 0,232$ ; Abb. 14, Abschnitt B) ermittelt werden.



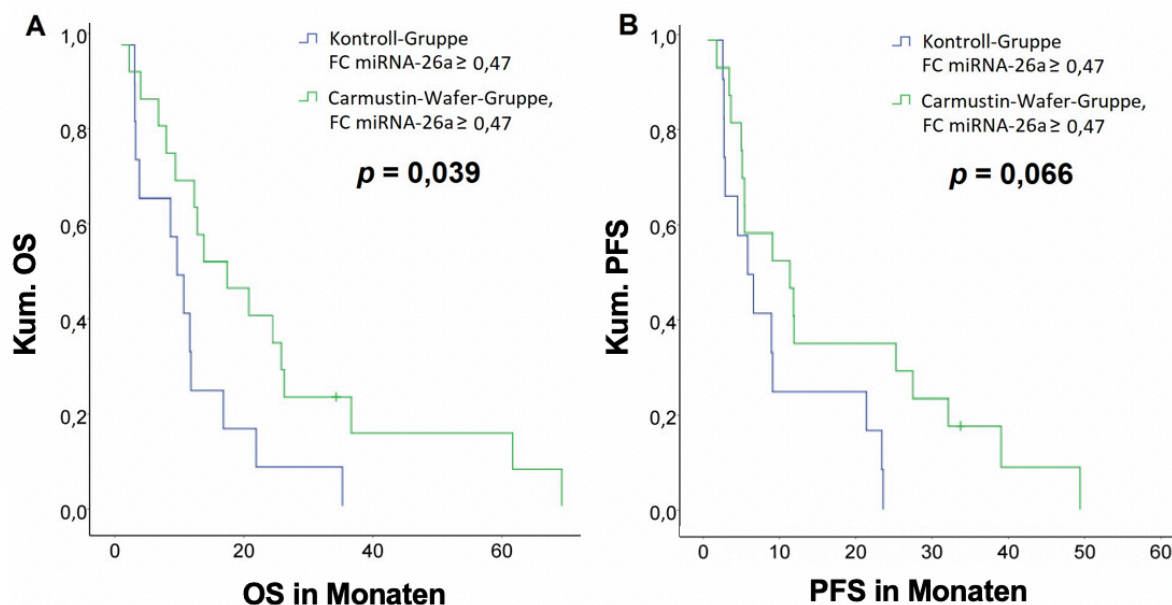
**Abb.14: Lineare Regressionsanalyse des OS und PFS in der Kontroll-Gruppe.** In Abb. A ist die Abhängigkeit des OS der Patienten der Kontroll-Gruppe von dem Fold Change der miRNA-26a dargestellt und in Abb. B die Abhängigkeit des PFS von dem Fold Change der miRNA-26a. Sowohl für das OS als auch für das PFS der Patienten der Kontroll-Gruppe konnte kein signifikanter Zusammenhang mit der miRNA-26a Expression nachgewiesen werden.

Die Cox-Regressionsanalyse zeigte ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der miRNA-26a Expression und dem OS (HR 1.170 [95%-KI: 0.589-2.327];  $p = 0.657$ ), bzw. dem PFS (HR 1.170 [95%-KI: 0.402-1.629];  $p = 0.55$ ) in der Kontroll-Gruppe.

Zur weiteren Analyse erfolgte in der Kontroll-Gruppe ebenfalls eine Dichotomisierung der Daten anhand des mittleren FC-Wertes. Während 28 Patienten eine niedrige miRNA-26a Expression zeigten, wiesen 12 Patienten eine hohe Expression auf. In der Kontroll-Gruppe konnte weder für das OS noch für das PFS ein signifikanter Zusammenhang mit der miRNA-26a Expression nachgewiesen. Der Log-Rank-Test zeigte auch hier ein ähnliches Ergebnis wie die Cox-Regressionsanalyse. Sowohl das OS ( $p = 0,652$ ) als auch das PFS ( $p = 0,551$ ) waren bei denjenigen Patienten mit hoher miRNA-26a Expression nicht signifikant länger.

### 4.2.3 miRNA-26a: Vergleich Carmustin-Wafer-Gruppe versus Kontroll-Gruppe

Um den Einfluß der miRNA-26a auf das Ansprechen der Therapie mit Carmustin-Wafern zu evaluieren, wurden zunächst die 17 Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe mit hoher miRNA-26a Expression mit den 12 Patienten der Kontroll-Gruppe verglichen, die ebenfalls eine hohe miRNA-26a Expression aufwiesen (siehe Abb. 15).

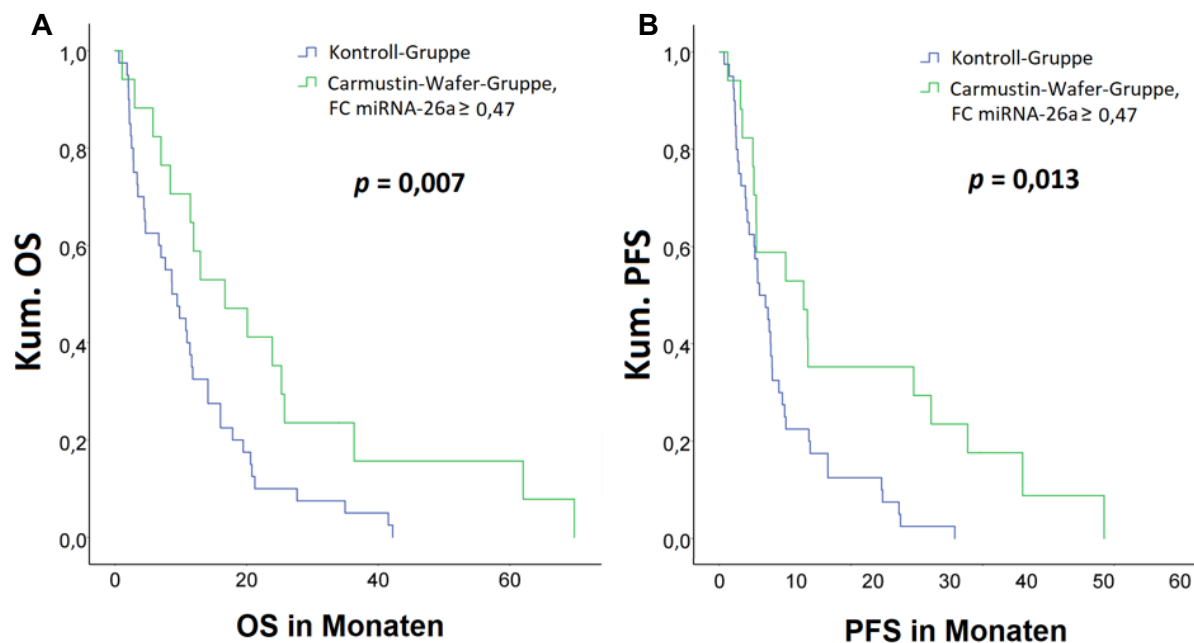


**Abb.15: Vergleich beider Untersuchungsgruppen bei hoher miRNA-26a Expression.**

Abb. A zeigt das OS und Abb. B das PFS der Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe mit hoher miRNA-26a Expression (grüne Kurve) im Vergleich zu dem OS und PFS der Patienten der Kontroll-Gruppe mit hoher miRNA-26a Expression (blaue Kurve). In Abb. A wird ersichtlich, dass Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe mit erhöhter miRNA-26a Expression ein signifikant längeres OS aufweisen als Patienten der Kontroll-Gruppe. Abb. B zeigt einen Trend zu einem verbesserten PFS in der Carmustin-Wafer-Gruppe bei Patienten mit erhöhter miRNA-26a Expression im Vergleich zu Patienten der Kontroll-Gruppe.

Das OS der Patienten mit hoher miRNA-26a Expression und zusätzlicher Carmustin-Wafer Implantation war signifikant länger ( $p = 0,039$ ) im Vergleich zu den Patienten der Kontroll-Gruppe. Darüber hinaus zeigte sich ein Trend zu einem verlängerten PFS in der Carmustin-Wafer-Gruppe ( $p = 0,066$ ).

Anschließend wurden die 17 Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe mit hoher miRNA-26a Expression ( $n = 17$ ) mit allen Patienten der Kontroll-Gruppe ( $n = 40$ ) verglichen. Hierbei zeigten die 17 Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe ein signifikant längeres OS ( $p = 0,007$ ) und PFS ( $p = 0,013$ ) als die Patienten der Kontroll-Gruppe.



**Abb. 16: Kaplan-Meier-Kurven des OS und PFS beider Untersuchungsgruppen.** Abb. A zeigt das OS und Abb. B das PFS der Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe mit hoher miRNA-26a Expression (grüne Kurve) im Vergleich zu dem OS und PFS der Patienten der Kontroll-Gruppe (blaue Kurve). Die Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe mit hoher miRNA-26a Expression zeigten ein signifikant längeres OS und PFS als die Patienten der Kontroll-Gruppe.

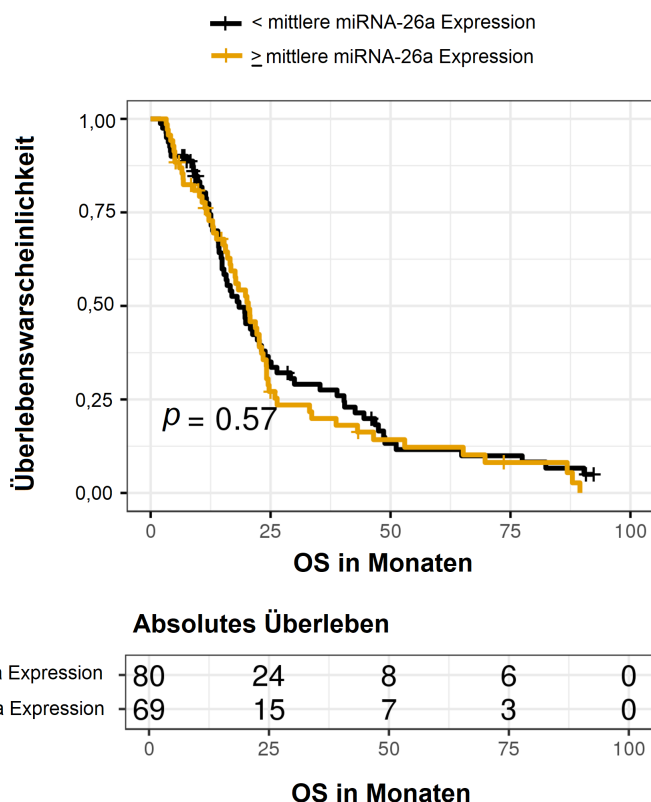
#### 4.2.4 TCGA-Validierungsdatensatz

Um die Ergebnisse der Kontroll-Gruppe anhand einer unabhängigen Kontrollkohorte zu validieren, wurde eine Referenzgruppe aus der TCGA-Datenbank extrahiert.

Der „The Cancer Genome Atlas“ ist ein Projekt zur Katalogisierung von für Krebs verantwortlichen molekularen Aberrationen auf DNA-, RNA-, Protein- und epigenetischer Ebene. Er soll dazu dienen, durch ein besseres Verständnis der genetischen Grundlagen die Diagnostik und Therapie der untersuchten Tumore zu optimieren <sup>108</sup>.

In der TCGA-Datenbank wurden 149 GBM-Patienten selektiert, die mittels Standard-Radiochemotherapie nach Stupp behandelt wurden und von denen Daten im Hinblick auf ihre miRNA-26a Expression vorlagen.

Ein vergleichbares Ergebnis wie in der Kontroll-Gruppe der vorliegenden Studie wurde auch im TCGA-Validierungsdatensatz gefunden. Die 149 selektierten Patienten wurden ebenfalls anhand des mittleren FC der miRNA-26a in 69 Patienten mit hoher und 80 Patienten mit niedriger miRNA-26a Expression unterteilt. Abb. 18 zeigt die Ergebnisse dieser Validierungskohorte. Es gab keine signifikanten Auswirkungen der miRNA-26a Expression auf das OS der Patienten des TCGA-Datensatzes ( $p = 0,57$ ).



**Abb. 17: TCGA-Validierungskohorte.** Dargestellt ist das OS der Patienten der TCGA-Validierungskohorte in Abhängigkeit von der mittleren miRNA-26a Expression. Es wurde in der Validierungskohorte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der miRNA-26a Expression und dem OS der Patienten gefunden.

Es wurde ebenfalls versucht, für die Carmustin-Wafer-Gruppe eine ähnliche Validierung durchzuführen. Dies war jedoch nicht möglich, da in der TCGA-Datenbank keine Glioblastompatienten erfasst wurden, die sowohl Carmustin-Wafer Implantate als auch das Standardtherapieschema nach Stupp erhielten und von denen zusätzlich Daten zur miRNA-26a Expression vorlagen.

Ich bedanke mich für die Erstellung des Datensatzes mittels R-Software durch Dr. Markus List vom Max-Planck-Institut für Informatik, Campus E14, Saarbrücken.

### 4.3 Ergebnisse der Methylierungsanalysen von Rb1 und MGMT

Die Methylierungsanalyse der Promotor-Regionen von MGMT und Rb1 diente der Überprüfung eines möglichen Einflusses dieser epigenetischen Veränderungen auf die Überlebenszeit des untersuchten Patientenkollektivs.

Die Bestimmung des Promotor-Methylierungsstatus von MGMT und Rb1 bei allen 80 Tumorproben erfolgte freundlicherweise in Zusammenarbeit mit Gerrit Breitfelder. An dieser Stelle ein ganz herzliches Dankeschön dafür.



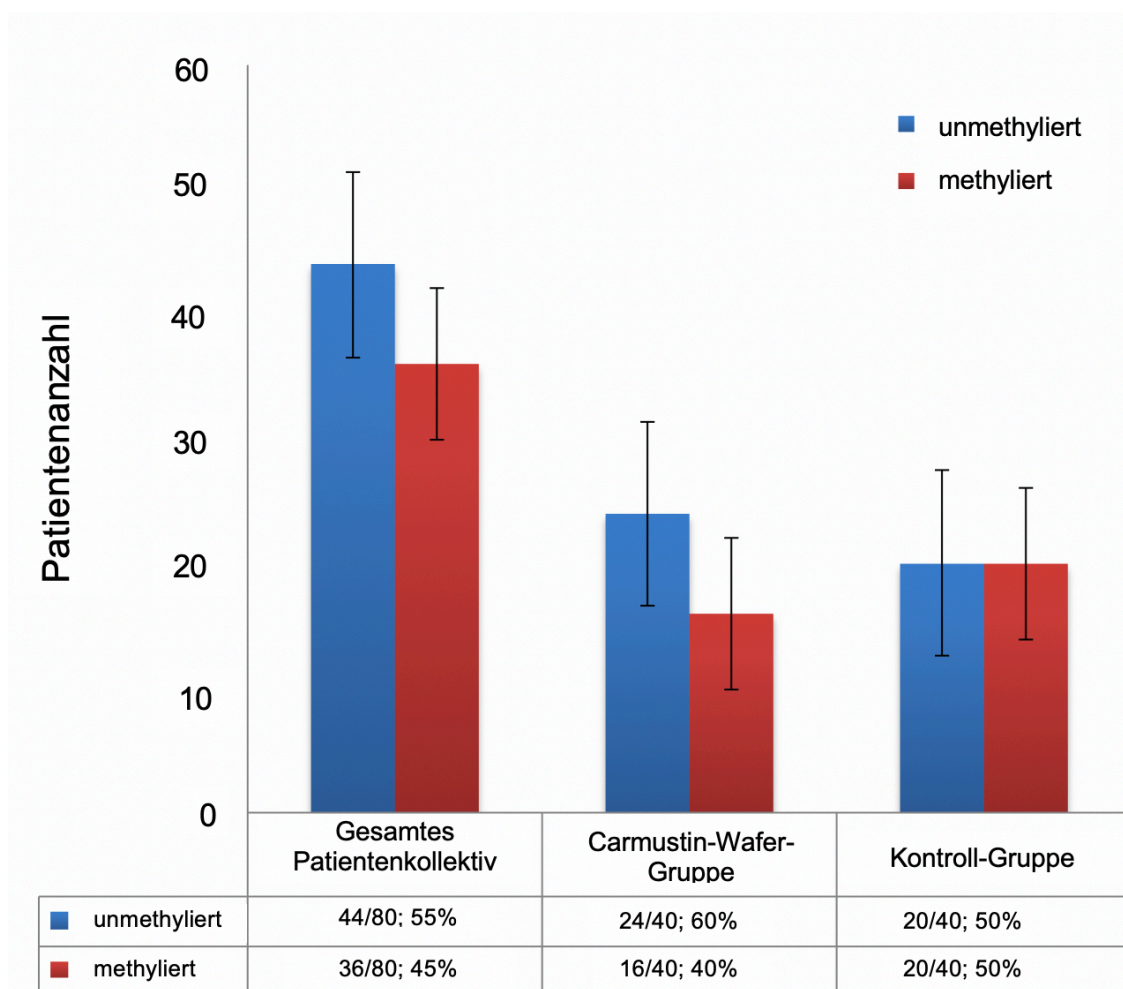
### 4.3.1 Methylierungsstatus des Promotors von Rb1

Bei keiner der 80 untersuchten Tumorproben wurde eine Methylierung des Rb1-Promotors gefunden. Eine weitere statistische Auswertung entfiel daher.

### 4.3.2 Methylierungsstatus des Promotors von MGMT

In der Carmustin-Wafer-Gruppe besaßen 40% der untersuchten Patienten (16/40) einen methylierten MGMT-Promotor. In der Kontroll-Gruppe wiesen 50% der Patienten (20/40) einen methylierten MGMT-Promotor auf (siehe Abb. 18).

Sowohl in der Carmustin-Wafer-Gruppe als auch in der Kontroll-Gruppe hatte der MGMT-Methylierungsstatus keinen Einfluss auf das OS ( $p = 0,988$ ) und das PFS ( $p = 0,405$ ) der Patienten.

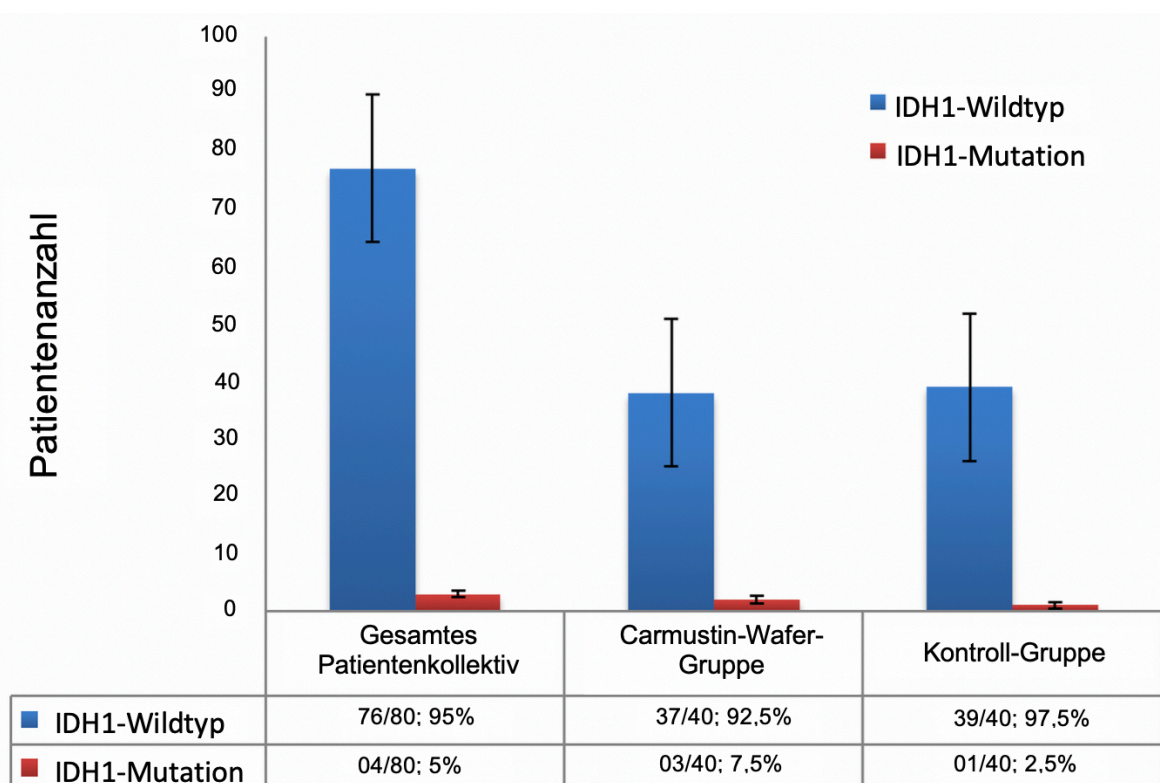


**Abb. 18: MGMT-Methylierungsstatus.** Dargestellt ist ein Säulendiagramm der Verteilung des MGMT-Methylierungsstatus im gesamten Patientenkollektiv, in der Carmustin-Wafer-Gruppe und in der Kontroll-Gruppe. Blau hinterlegt sind alle Patienten mit unmethyliertem MGMT-Promotor und rot hinterlegt alle Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor.

#### 4.4 IDH1-Mutationsstaus

Im gesamten Patientenkollektiv wiesen lediglich 5% (4/80) der Patienten eine IDH1-Mutation auf. Drei der vier Patienten gehörten der Carmustin-Wafer-Gruppe an und einer der Kontroll-Gruppe. Die Mehrheit aller 80 Patienten (95%) exprimiert den IDH1-Wildtyp.

Bei der nachfolgenden Überlebenszeitanalyse zeigte die IDH1-Mutation keinen Einfluss auf das PFS ( $p = 0,604$ ) oder das OS ( $p = 0,533$ ) der Patienten.



**Abb. 19: IDH1-Mutationsstatus.** Dargestellt ist die Verteilung des IDH1-Mutationsstatus des gesamten Patientenkollektivs, der Carmustin-Wafer-Gruppe und der Kontroll-Gruppe mithilfe eines Säulendiagramms. Die blauen Säulen stehen für alle Patienten, die einen IDH1-Wildtyp aufweisen. Die roten Säulen stehen hingegen für alle Patienten, die eine IDH1-Mutation aufweisen.

#### 4.5 Multiple Cox-Regression

Abschließend wurde in der Carmustin-Wafer-Gruppe ( $n = 40$ ) eine multiple Cox-Reggressionsanalyse angewandt, um den wechselseitigen Einfluss mehrerer, potenziell interagierender Variablen auf das Überleben zu ermitteln. Untersucht wurden die Parameter, welchen bereits in den oben genannten Einzelrechnungen eine signifikante Bedeutung für

das Überleben der Patienten nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse dieser Analyse fasst Tabelle 12 zusammen.

**Tabelle 12: Multiple Cox-Regressionsanalyse wichtiger Einflussfaktoren auf das OS**

	Regressionskoeffizient	Standardfehler	Signifikanz	95%- Konfidenzintervall	
FC miRNA-26a	0,022	0,785	0,046 *	0,048	1,042
MGMT- Methylierungsstatus	1,071	0,360	0,849	0,529	2,171
IDH1- Mutationsstatus	1,494	0,683	0,557	0,392	5,699
Alter bei ED	1,071	0,020	0,001 *	1,030	1,113
operatives Resekti- onsausmaß	0,156	0,456	0,032 *	0,640	3,825

\*  $p \leq 0,05$

In der Cox-Regressionsanalyse zeigte sich, dass sowohl das Alter bei Erstdiagnose und das Resektionsausmaß, als auch die Expression der miRNA-26a voneinander unabhängige Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben der Glioblastompatienten darstellen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Fragestellung

Die Diagnose eines Glioblastoms impliziert per se eine sehr schlechte Prognose der betroffenen Patienten <sup>67</sup>. Trotz intensiver Standardtherapie, bestehend aus operativer Tumorresektion und anschließender konkomitanter Radiochemotherapie, überleben die meisten Patienten nur etwas mehr als ein Jahr <sup>73</sup>. Die zusätzliche intraoperative Implantation von Carmustin-Wafern stellt eine Möglichkeit dar, das Standardtherapieschema um eine lokal in der Tumorphöhle wirksame Chemotherapie zu erweitern. Mit Einführung der Carmustin-Wafer Therapie hoffte man daher, einen großen Schritt in der Bekämpfung des Glioblastoms voranzukommen. Die initialen klinischen Zulassungsstudien belegten einen Überlebensvorteil durch den Einsatz von Carmustin-Wafern sowohl bei der Rezidivtherapie als auch bei der Primärtherapie des Glioblastoms <sup>12,102,109</sup>.

Westphal et al. belegten 2003 in einer prospektiven, randomisierten Phase-III-Studie mit 240 Patienten einen signifikanten medianen Überlebensvorteil von 2,3 Monaten für die Kombination aus Carmustin-Wafern und anschließender Strahlentherapie im Vergleich zu Placebo-Wafern und anschließender Strahlentherapie <sup>57,109</sup>. Eine Reihe prospektiver und retrospektiver Studien wiesen zudem darauf hin, dass die Kombination aus Carmustin-Wafern und Stupp-Protokoll das Überleben der Patienten mit Glioblastom im Vergleich zur Standardtherapie um mehrere Monate verbessern kann, ohne dass die Toxizität signifikant zunimmt <sup>3</sup>. Zwei Metaanalysen von Chowdhary et al. und Xing et al. bestätigten diesen Überlebensvorteil ebenfalls <sup>18,110</sup>.

Nach einigen Jahren der Anwendung konnten Pallud et al. hingegen 2015 in einer Kohorte von 354 Patienten keinen langfristigen Nutzen hinsichtlich des OS für die Kombination aus Standardtherapie nach Stupp und Carmustin-Wafer Implantation im Vergleich zur Standardtherapie alleine nachweisen. Die Forscher verzeichneten jedoch eine signifikante Zunahme der postoperativen Infektionsrate und der Ödem-bedingten intrakraniellen Drucksteigerung <sup>71</sup>. Auch eine Reihe weiterer Studien konnten durch die zusätzliche Therapie mit Carmustin-Wafern keinen signifikanten Überlebensvorteil beweisen, wohingegen die Toxizität der Chemotherapie zunahm <sup>21,107</sup>.

Die aktuelle Studienlage verdeutlicht, dass der therapeutische Einsatz von Carmustin-Wafer Implantaten in der Primärtherapie des Glioblastoms kontrovers diskutiert wird und ihr Nutzen umstritten ist. Im gegenwärtigen Zeitalter der molekularen Medizin gilt es jedoch, die Bedeutung der Carmustin-Wafer unter neuen Gesichtspunkten zu evaluieren. Möglicher-

weise ist der Benefit dieser Therapie auf eine Patientensubpopulation beschränkt, die ein spezifisches molekulares Profil aufweist. Insbesondere für die Diagnostik und Therapie des Glioblastoms gewannen molekulare Marker in den vergangenen Jahren immer mehr an Bedeutung. Daher wäre es von klinischem Interesse, einen oder mehrere solcher molekularer Marker zu identifizieren, die den Therapieerfolg einer Carmustin-Wafer Implantation vorherzusagen vermögen.

Der miRNA-26a wurde mehrfach in aktuellen Studien eine Bedeutung bei der Progression des Glioblastoms zugesprochen<sup>28,42,75</sup>. Zudem scheint das miRNA-26a Expressionslevel eine prädiktive Bedeutung für das klinische Outcome der Glioblastompatienten zu haben<sup>93</sup>. Ziel dieser Studie war es daher, die miRNA-26a als potentiellen molekularen Marker zu evaluieren, anhand dessen Expression eine Subpopulation von Glioblastompatienten identifiziert werden kann, die in besonderem Maße von der Carmustin-Wafer Implantation profitiert.

Um auf Grundlage dieser experimentellen Arbeit eine belastbare Aussage treffen zu können, war es notwendig, valide und reliable Methoden zu verwenden.

## 5.2 Diskussion der Methodik

### 5.2.1 Patientenkollektiv: Vergleichbarkeit der Untersuchungsgruppen

Um eine valide Vergleichbarkeit beider Untersuchungsgruppen zu ermöglichen und um ein repräsentatives Patientenkollektiv zu akquirieren, wurde das Studiendesign einer Matched-Pair-Analyse gewählt. Als Matched-Pair-Kriterien wurden das Alter der Patienten bei Erstdiagnose, das Geschlecht und der KPS herangezogen.

Das Patientenalter bei Erstdiagnose wurde als Kriterium ausgewählt, da zahlreiche Studien belegten, dass ein hohes Alter bei Erstdiagnose mit einem schlechteren Outcome der Patienten mit Glioblastom einhergeht. Jüngere Patienten weisen hingegen eine bessere Prognose auf<sup>10,36,68</sup>. Dies bestätigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. Ältere Patienten zeigten ein signifikant kürzeres OS als jüngere Patienten. Um altersbedingte Ergebnisverzerrungen zu verhindern, war es daher wichtig, dass keine signifikanten Altersunterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen vorlagen. Durch das Studiendesign der Matched-Pair-Analyse wurde gewährleistet, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Carmustin-Wafer-Gruppe und der Kontroll-Gruppe in Bezug auf das Erkrankungsalter bestand.

Auch der KPS der Patienten wurde als entscheidender prognostischer Faktor bei Glioblastomen identifiziert. Patienten mit einem hohen Score ( $\geq 70$ ) weisen eine bessere Prognose auf als Patienten mit einem niedrigeren Score<sup>100</sup>. Es wurde daher bei der Auswahl

der Patienten darauf geachtet, Patienten mit möglichst identischem KPS zu akquirieren. Der mediane KPS beider Untersuchungsgruppen betrug 80.

In der gängigen Literatur sind Männer ungefähr 1,5-mal häufiger von Glioblastomen betroffen als Frauen<sup>10,67</sup>. Mit einer Geschlechtsverteilung von 1,8 Männern zu einer Frau zeigte sich dies auch in der vorliegenden Studie.

Die Vergleichbarkeit beider Untersuchungsgruppen ist in Bezug auf das Alter bei Erstdiagnose, das Geschlecht und den KPS als valide anzusehen. Zudem ermöglichte die Matched-Pair-Analyse die Akquise eines Patientenkollektivs, welches aufgrund der Konkordanz mit der Literatur als repräsentativ zu betrachten ist<sup>8,72</sup>.

Abschließend ist anzumerken, dass eine Einschränkung in Bezug auf das ausgewählte Patientenkollektiv darin bestand, dass weder das chirurgische Resektionsausmaß noch der MGMT-Methylierungsstatus und der IDH1-Mutationsstatus als Matched-Pair-Kriterien herangezogen wurden. Die Hinzunahme dieser, in der Literatur als relevant betrachteter Kriterien, hätte zu einer massiven Reduktion der Patientenfallzahl geführt, da dann nicht ausreichend adäquate Matched-Pair-Partner zur Verfügung gestanden hätten.

Mit Hilfe der multiplen Cox-Regressionsanalyse konnte jedoch gezeigt werden, dass der Einfluss der miRNA-26a auf das Überleben der Patienten unabhängig dieser Kriterien zu beobachten war.

### **5.2.2 miRNA-26a- Expressionsanalyse: Vor- und Nachteile der angewandten Methode**

Als die gängigsten Methoden zur Expressionsanalyse von miRNAs gelten die qRT-PCR<sup>17,88</sup>, next generation sequencing<sup>13,35</sup> und microarrays<sup>11156</sup>. Welche Technik am besten geeignet ist, hängt unter anderem von dem jeweiligen Anwendungsgebiet ab.

Ein Vorteil von Analysen mittels next generation sequencing und microarray ist die Möglichkeit, die gesamte RNA bzw. miRNA untersuchen zu können und nicht nur einzelne RNAs/miRNAs. Auf diese Weise kann innerhalb eines Untersuchungsassays das Expressionsniveau von Hunderten bis Tausenden Genen analysiert werden<sup>111</sup>. Dadurch wird es beispielsweise möglich, neue miRNAs zu identifizieren. Nachteile im Vergleich zu anderen Methoden sind jedoch der höhere Kosten- und Zeitaufwand. Zudem wird für die Durchführung eine relativ große Menge an Probenmaterial benötigt<sup>6</sup>.

Die qRT-PCR wird aufgrund ihrer guten Reproduzierbarkeit und hohen Sensitivität oft als Goldstandard für die Quantifizierung der Genexpression angesehen<sup>29</sup>. Zudem ist sie besonders dann zur Quantifizierung der miRNA-Expression geeignet, wenn wenig Probenmaterial vorhanden ist<sup>6</sup>. Zur Normalisierung der qRT-PCR-Ergebnisse ist der Einsatz eines

Referenzgens („Housekeeping-Gen“) von großer Bedeutung. Das für die vorliegende Arbeit ausgewählte Referenzgen RNU48 wurde bereits in mehreren miRNA-Studien als stabiles Referenzgen etabliert <sup>4,93</sup>.

Die Wahl der qRT-PCR als Methode zur Bestimmung der miRNA-26a Expression in der vorliegenden Studie erfolgte aus mehreren Gründen. Zum einen war das zu untersuchende Zielgen bereits zu Beginn der Studie klar definiert und der Einsatz spezieller Primer-Sonden ermöglichte so eine gezielte Analyse. Zum anderen waren ökonomische Aspekte und die limitierte Menge an Probenmaterial für die Auswahl dieses Verfahrens mitverantwortlich.

### 5.2.3 DNA-Analyse: Vor- und Nachteile der Methylierungsspezifischen PCR

Die Bestimmung der DNA-Methylierung erfolgte nach dem Prinzip der von Clark und Frommer entwickelten Bisulfitkonversion und anschließender Methylierungsspezifischer PCR (MS-PCR) <sup>27</sup>. Durch die Behandlung der DNA mit Bisulfit werden unmethylierte Cytosin-Nukleotide zu Uracil desaminiert, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt. Auf diese Weise kommt es zu einer vom Methylierungsstatus abhängigen DNA-Sequenzänderung, die mit PCR-basierten Verfahren nachgewiesen werden kann <sup>32</sup>.

Vorteile dieser Methode sind u.a. eine hohe Sensitivität und die Möglichkeit, den Methylierungsstatus eines spezifischen Genlocus sowohl für die gesamte Zellpopulation als auch für einzelne DNA-Moleküle bestimmen zu können. Zudem ist zur Analyse nur eine geringe Menge genomischer DNA erforderlich, was für die Durchführung der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse war. Die größte Einschränkung der Bisulfit-Methode besteht darin, dass sie anfällig für Reaktionsartefakte ist, die ihre Zuverlässigkeit beeinträchtigen können. Das am häufigsten vorkommende Artefakt ist die unvollständige Umwandlung von Cytosin in Uracil. Da Bisulfit nur mit Cytosinen reagiert, die nicht an der Basenpaarung beteiligt sind, ist die offensichtlichste Erklärung für eine unvollständige Umwandlung von Cytosin die unvollständige Denaturierung der DNA-Vorlage oder deren teilweise Renaturierung während der Bisulfitbehandlung <sup>19</sup>. Die unvollständige Bisulfitkonversion der unmethylierten Cytosine kann in der nachfolgenden MS-PCR zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Eine weitere Methode zur Bestimmung des MGMT-Methylierungsstatus ist die Pyrosequenzierung. Sie beruht auf dem Prinzip „sequencing by synthesis“. Hierbei beobachtet man die DNA-Synthese in Echtzeit mittels abgegebenen Pyrophosphats, welches ein Fluoreszenzsignal auslöst, das gleichzeitig detektiert werden kann <sup>38</sup>. Sie ist jedoch wesentlich kosten- und arbeitsintensiver als die MS-PCR und daher für die breite klinische Anwendung nicht praktikabel <sup>112</sup>.

### 5.2.4 Diskussion der statistischen Methodik

Zunächst war es von besonderem Interesse die Überlebenszeiten der Patienten beider Behandlungsgruppen in Abhängigkeit der miRNA-26a Expression zu analysieren. Hierfür erfolgte eine lineare Regressionsanalyse. Bei dieser Methode werden die untersuchten Variablen in ihrer kontinuierlichen Form verarbeitet und können als Streudiagramm dargestellt werden. Eine Dichotomisierung von Daten ist nicht notwendig. Hierdurch kann ein akkurates statistisches Modell generiert werden <sup>116</sup>.

Nachdem sich ein Zusammenhang zwischen den Überlebenszeiten der Patienten und der miRNA-26a Expression darstellte, erfolgte eine zeitabhängige Auswertung mittels Cox-Regression und Kaplan-Meier-Regression. Der Vorteil der Cox-Regression besteht darin, dass auch hier mit kontinuierlichen Variablen gerechnet werden kann. Die anschauliche graphische Darstellung der Cox-Regression gestaltete sich jedoch schwierig. Entsprechend erfolgte eine Kaplan-Meier-Regression mit Dichotomisierung der Daten anhand der mittleren Expression der miRNA-26a (FC miRNA-26a = 0,47). Die graphische Darstellung erfolgte für die Gruppen mit hoher und geringer miRNA-26a Expression als separate Kurve im Kaplan-Meier Blot <sup>116</sup>. Neben der besseren graphischen Darstellbarkeit ermöglicht die Einteilung mittels Cut-Off Wertes auch eine klinische Anwendbarkeit. Im klinischen Alltag muss eine dichotomisierte Einteilung erfolgen, um eine Empfehlung für oder gegen die Carmustin-Wafer Implantation geben zu können.

## 5.3 Diskussion der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die miRNA-26a als möglichen prädiktiven Marker für eine Therapie mit Carmustin-Wafern zu evaluieren. Hierzu wurde die Expression der miRNA-26a in allen Tumorproben bestimmt und der Einfluss auf das OS und PFS der Patienten beider Untersuchungsgruppen analysiert.

Mittels linearer Regressionsanalyse wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der miRNA-26a Expression und dem OS sowie dem PFS der Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe ermittelt. In der Kontroll-Gruppe zeigte sich hingegen kein signifikanter Zusammenhang zwischen der miRNA-26a Expression und dem OS bzw. PFS.

Die miRNA-26a abhängigen Überlebenszeitanalysen erfolgten zunächst in beiden Untersuchungsgruppen getrennt. In der Carmustin-Wafer-Gruppe zeigten die Patienten mit hoher miRNA-26a Expression ein signifikant längeres OS und PFS als die Patienten mit niedriger miRNA-26a Expression.



Dieser Zusammenhang wurde in der multiplen Cox-Regressionsanalyse unabhängig der wichtigen Einflussfaktoren IDH1-Mutationsstatus, MGMT-Methylierungsstatus und operativem Resektionsausmaß beobachtet.

In der Kontroll-Gruppe zeigte sich dieser Überlebensvorteil von Patienten mit hoher miRNA-26a Expression nicht. Mithilfe des TCGA-Validierungsdatensatzes wurden die Ergebnisse der Kontroll-Gruppe validiert. Auch hier zeigte die Expression der miRNA-26a keine signifikante Auswirkung auf das OS und PFS der selektierten Patienten. Eine vergleichbare Validierung der Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe war aufgrund mangelnder Datensätze nicht möglich.

In Übereinstimmung mit Pallud et al. konnte bei einem Vergleich beider Therapieansätze (Carmustin-Wafer-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe) ohne Berücksichtigung der miRNA-26a Expressionsergebnisse kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das OS und das PFS gefunden werden. Die sequentielle Therapie aus Carmustin-Wafer Implantation und Standardtherapie nach Stupp war der alleinigen Standardtherapie nicht überlegen. Erst unter Einbeziehung der miRNA-26a Expressionsunterschiede wurde ein Überlebensvorteil der Carmustin-Wafer-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe beobachtet. Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe mit erhöhter miRNA-26a Expression zeigten ein signifikant längeres OS und PFS als die Patienten der Kontroll-Gruppe.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen erstmals eine prädiktive Bedeutung der miRNA-26a für das Ansprechen einer Carmustin-Wafer Therapie bei Patienten mit GBM<sup>94</sup>.

### **5.3.1 Molekulare Marker und die Carmustin-Wafer Therapie**

Bislang haben nur wenige Forschergruppen versucht, neue epigenetische Marker zu identifizieren, die eine prädiktive Bedeutung für eine Carmustin-Wafer Therapie besitzen. Das Hauptaugenmerk der bisherigen Untersuchungen lag auf dem Methylierungsstatus des MGMT-Promotors, da dieser bereits in zahlreichen Studien als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine Therapie mit alkylierenden Chemotherapeutika evaluiert wurde<sup>41</sup>.

Grossmann et al. und Lechapt-Zalcman et al. konstatieren, dass die Methylierung des MGMT-Promotors bei Patienten mit neu diagnostiziertem GBM, die mit Carmustin-Wafern und anschließend Standard-Stupp-Schema therapiert wurden, mit einem signifikant verbesserten OS einherging<sup>31,55</sup>. Andere Forschergruppen konnten der MGMT-Promotormethylierung hingegen keinen Einfluss auf das Ansprechen einer Carmustin-Wafer Therapie nachweisen<sup>34</sup>. Auch in der vorliegenden Arbeit bestand zwischen der MGMT-Promotormethylierung und dem OS bzw. PFS der Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe, aber auch der Patienten der Kontroll-Gruppe, kein signifikanter Zusammenhang. Die Diskrepanz, dass in einigen Studien ein Zusammenhang zwischen niedriger MGMT

Expression und dem Ansprechen auf eine alkylierende Chemotherapie beobachtet wurde und andere Autoren einen solchen Zusammenhang nicht bestätigen konnten, ist bereits hinreichend bekannt <sup>26,78</sup>. Auch, dass die verschiedenen Methoden zur Bestimmung des MGMT-Methylierungsstatus und unterschiedlichen Primer zu unterschiedlichen Methylierungsergebnissen führen können, wird bereits in der gängigen Literatur diskutiert <sup>25</sup>. Zudem sollte bedacht werden, dass die starre Einteilung in methyliert und unmethyliert gegebenenfalls nicht die biologische Realität in Gänze widerspiegelt, in der möglicherweise Zwischenzustände existieren können <sup>95</sup>. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichen somit keine Aussage über eine prädiktive Bedeutung des MGMT-Methylierungsstatus für eine Therapie mit Carmustin-Wafern.

Gleiches gilt für den IDH1-Mutationsstatus. In der vorliegenden Studie zeigte die IDH1-R132H-Mutation weder einen Einfluss auf das OS noch auf das PFS. Der IDH1-Mutationsstatus wurde jedoch als wichtiger prognostischer Marker bei Glioblastomen beschrieben, der einen entscheidenden positiven Einfluss auf das Überleben der Patienten hat <sup>39,85</sup>. Diese Diskrepanz ist vermutlich auf die geringe Anzahl an Patienten mit IDH1-R132H-Mutation in der vorliegenden Studie zurückzuführen. Daher sollte auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse keine Schlussfolgerung über die Auswirkungen der IDH1-R132H-Mutation auf das Therapieansprechen einer Carmustin-Wafer Therapie gezogen werden.

Weitere Biomarker, die möglicherweise einen Einfluss auf die Carmustin-Wafer Therapie haben, sind die Verluste der Chromosomen 10 und 13. In einer Studie von Urbschat et al. zeigten Patienten, die einen Verlust dieser Chromosomen aufwiesen und zusätzlich zur Standardtherapie nach Stupp Carmustin-Wafer implantiert bekamen, ein signifikant längeres OS als Patienten ohne diesen Chromosomenverlust. In derselben Studie wurde zudem belegt, dass ein Expressionsverlust des Tumorsuppressorproteins p15 aufgrund der Methylierung des p15-Promotors insbesondere bei Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe mit einem signifikant kürzeren OS einherging <sup>101</sup>.

Auf epigenetischer Ebene konnte unsere Forschungsgruppe bereits mit der miRNA-181d einen Biomarker identifizieren, der Einfluss auf das Ansprechen einer Therapie mit Carmustin-Wafern zu haben scheint. Eine verminderte miRNA-181d Expression geht hier mit einem besseren OS und PFS einher <sup>93</sup>.

Die aktuellen Ergebnisse molekularbiologischer Arbeiten geben Anlass zu der Hoffnung, dass mithilfe der Identifikation weiterer molekularer Biomarker eine genauere Stratifizierung der Glioblastompatienten möglich ist, welche den Therapieerfolg durch einen gezielteren Therapieeinsatz verbessert.

### 5.3.2 miRNA-26a als möglicher prädiktiver Marker für Carmustin-Wafer Implantate

Die miRNA-26a ist in gesunden Zellen an der Regulation bedeutender zellulärer Prozesse wie Zellzyklus-Kontrolle, Proliferation, Apoptose und Invasion beteiligt. Genom-weite miRNA-Expressionsanalysen belegten, dass die Dysregulation der miRNA-26a Expression mit der Entstehung zahlreicher Tumoren assoziiert ist<sup>17</sup>. Mehrere Studien zeigten zudem, dass die miRNA-26a je nach Tumor- und Gewebetyp unterschiedliche Funktionen einnimmt. In Ösophagusadenokarzinomzellen sowie in Lungen- und Mammakarzinomzellen scheint eine tumorsuppressive Wirkung zu überwiegen, während sie in Gliomen primär als Onkogen fungiert<sup>28,115</sup>.

Die miRNA-26a befindet sich innerhalb eines Genlocus auf Chromosom 12q, der häufig in Gliomen amplifiziert ist, wodurch es zu einem Anstieg des miRNA-26a Expressionslevels kommt<sup>42,50</sup>. Dies führt zu einem signifikant erhöhten Tumorwachstum und geht mit einer gesteigerten Angiogenese einher<sup>79</sup>. Glioblastompatienten mit erhöhtem miRNA-26a Expressionslevel zeigen zudem ein schlechteres klinisches Outcome<sup>28</sup>. Aus diesem Grund gewann die miRNA-26a in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung.

Es werden verschiedene Zielgene diskutiert, durch deren post-transkriptionelles Silencing die miRNA-26a vermittelten Effekte hervorgerufen werden. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf den Tumorsuppressorgenen PTEN (phosphatase and tensin homolog) und Rb1 (Retinoblastoma 1)<sup>42,50,58,95,115</sup>.

Eine Mutation oder Deletion von PTEN, oft bedingt durch den vollständigen Verlust seines Locus auf Chromosom 10q, findet sich bei einem großen Prozentsatz der Glioblastome und korreliert mit einer schlechten Prognose<sup>42,45,74</sup>. Huse et al. wiesen nach, dass die Überexpression der miRNA-26a in Gliomen hauptsächlich auf die Amplifikation des miRNA-26a-2-Locus zurückzuführen ist, ein genomisches Ereignis, das stark mit dem Verlust des monoallelen PTEN assoziiert ist. Dies deutet darauf hin, dass die Amplifikation der miRNA-26a in Glioblastomzellen dazu dient, das restliche PTEN-Transkript zu supprimieren<sup>42</sup>. Die miRNA-26a vermittelte PTEN-Repression hat eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges zur Folge, wodurch die Proliferation der Glioblastomzellen zunimmt. In Folge der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges kommt es außerdem zu einer Hemmung der Apoptose, die ein aggressiveres Tumorverhalten hervorruft. Interessanterweise belegte eine Studie von Urbschat et al. bereits, dass der Verlust von Chromosom 10 und insbesondere von Chromosom 10q mit einem verbesserten OS bei Patienten mit zusätzlicher Carmustin-Wafer Therapie einhergeht. Es ist denkbar, dass insbesondere die Patienten von einer zusätzlichen lokalen Chemotherapie mit Carmustin-Wafeln profitieren, die aufgrund des PTEN Verlustes und der erhöhten miRNA-26a Expression ein besonders schnelles Tumorwachstum

erwarten. Möglicherweise reicht in diesen Fällen eine alleinige systemische Chemotherapie mit Temozolomid nicht aus.

Ein weiteres Zielgen der miRNA-26a ist das Tumorsuppressorgen Rb1. Durch seine Repression wird die Kontrolle der G1/S-Transition im Zellzyklus gestört. Infolgedessen kommt es zu einer Zunahme der DNA-Synthese der Tumorzellen<sup>50</sup>. Veränderungen der Rb1-Expression werden häufig in glialen Tumoren gefunden und rufen meist ein aggressives Tumorverhalten hervor<sup>5,30</sup>. Bäcklund et al. konstatieren, dass ein vollständiger Verlust des Tumorsuppressorgens Rb1 mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit Anaplastischem Astrozytom einhergeht<sup>5</sup>. Neben einer miRNA-26a vermittelten post-transkriptionellen Stilllegung der Rb1 Expression kann unter anderem auch die Methylierung des Rb1-Promotors einen solchen Effekt hervorrufen. In der vorliegenden Studie konnte ausgeschlossen werden, dass eine Methylierung des Rb1-Promotors die Stilllegung des Rb1-Gens verursachte, da bei keinem der Patienten eine Methylierung nachweisbar war.

Der Einfluss des Rb1-Proteins auf den Zellzyklus steht in direktem Zusammenhang mit der Wirkung alkylierender Chemotherapeutika wie Temozolomid und Carmustin, da diese ebenfalls in den Zellzyklus eingreifen und ihn in sich schnell teilenden Tumorzellen zum Erliegen bringen<sup>64</sup>. Glioblastomzellen, die aufgrund einer miRNA-26a vermittelten Repression weniger Rb1-Tumorsuppressorprotein exprimieren, weisen einen gesteigerten Zellzyklus auf. Womöglich profitieren Glioblastompatienten mit dieser molekulargenetischen Veränderung von einer zusätzlichen intrakavitären Carmustinapplikation, da neben einer systemischen Chemotherapie mit Temozolomid durch eine lokale Boosterung mittels Carmustin der Zellzyklus der Glioblastomzellen gezielt supprimiert werden kann.

Welches der miRNA-26a Zielgene konkret für die Ergebnisse der vorliegenden Studie von Bedeutung ist, kann nicht abschließend geklärt werden. Es ist durchaus in Betracht zu ziehen, dass die miRNA-26a ihren Einfluss auf die Tumorgenese nicht einzig über die Regulation eines Zielgens ausübt, sondern über das Zusammenspiel der Repression verschiedener Proteine.

Eine aktuelle Studie von Ge et al. ermittelte zudem, dass eine erhöhte miRNA-26a Expression mit einer erhöhten Chemoresistenz gegenüber TMZ einhergeht<sup>28</sup>. Dies könnte einen weiteren Erklärungsansatz dafür liefern, warum die Auswirkungen der miRNA-26a Expression auf das Therapieansprechen der Patienten der Carmustin-Wafer-Gruppe beschränkt ist. Es ist denkbar, dass die erhöhte miRNA-26a Expression in Glioblastomen die Chemosensibilität der Tumorzellen für TMZ reduziert und besonders die Patienten profitieren, die aufgrund der Carmustin-Wafer Implantate intrakavitär eine wesentlich höhere zytostatische Konzentration aufweisen als solche Patienten, die nur systemisch mittels TMZ chemotherapiert wurden.

An dieser Stelle ist außerdem zu erwähnen, dass es bei der Therapie entsprechend des von Stupp et al. etablierten Protokolls zwischen der Tumoresektion und dem Beginn der konkomitanten Radiochemotherapie mit TMZ zu einer kritischen Pause von 3-6 Wochen kommen kann, in der keine chemotherapeutische Behandlung stattfindet<sup>98</sup>. Durch die intraoperative Implantation von Carmustin-Wafern könnte diese Lücke theoretisch geschlossen werden, da die Wafer unmittelbar postoperativ ihre antineoplastische Wirkung entfalten<sup>3</sup>.

Welcher Mechanismus konkret für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verantwortlich ist, bleibt offen. Um dies abschließend zu klären, bedarf es weiterer Untersuchungen. Es wird jedoch erneut deutlich, dass mithilfe molekulargenetischer Forschung der genetische Code von Glioblastomen weiter entschlüsselt werden kann und die gewonnen Erkenntnisse zur Optimierung der Therapie beitragen können.

### 5.3.3 Schlussfolgerungen

- 1) Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen in Übereinstimmung mit der gängigen Literatur erneut, dass der uneingeschränkte Einsatz von Carmustin-Wafern per se bei allen Glioblastompatienten nicht zu empfehlen ist, da ungeachtet jeglicher genetischer oder epigenetischer Biomarker die zusätzliche Carmustin-Wafer Therapie der alleinigen Standardtherapie nach Stupp hinsichtlich OS und PFS nicht überlegen ist.
- 2) Ziel dieser Studie war es, die miRNA-26a als potentiellen molekularen Marker zu evaluieren, anhand dessen Expression eine Subpopulation von Glioblastompatienten identifiziert werden kann, die in besonderem Maße von der Carmustin-Wafer Implantation profitiert. Tatsächlich zeigten Patienten mit erhöhter miRNA-26a Expression, die zusätzlich zur Standardtherapie nach Stupp intraoperativ Carmustin-Wafern implantiert bekamen, ein signifikant längeres OS und PFS als die Patienten der Kontroll-Gruppe, welche ausschließlich nach dem Standardtherapieschema behandelt wurden.
- 3) Die miRNA-26a Expression wurde somit erstmals als prädiktiver Marker für eine Carmustin-Wafer Therapie identifiziert und kann möglicherweise in Zukunft bei der Entscheidungsfindung helfen, ob eine Carmustin-Wafer Implantation zusätzlich zur Standardtherapie nach Stupp erfolgen soll oder nicht.

## 5.4 Ausblick

Die vorliegende Studie ergänzt die aktuelle Kontroverse um den Einsatz von Carmustin-Wafer Implantaten in der Primärtherapie des Glioblastoms. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Glioblastompatienten mit hoher miRNA-26a Expression in höherem Maße von der sequentiellen Kombination aus möglichst umfangreicher chirurgischer Tumorresektion mit intraoperativer Carmustin-Wafer Implantation und anschließender Standard-Radiochemotherapie profitieren als von der postoperativen Standard-Radiochemotherapie alleine. Eine weitere Evaluierung der miRNA-26a Expression in einer prospektiven Studie mit höherer Fallzahl wird daher empfohlen.

Für den klinischen Einsatz der gewonnenen Erkenntnisse wäre es zudem reizvoll, die Expression der miRNA-26a im Tumor vor der ersten Operation beurteilen zu können. Den Neurochirurgen könnte dadurch geholfen werden, präoperativ eine Entscheidung für oder gegen eine Carmustin-Wafer Implantation zu treffen. Die präoperative Flüssigkeitsbiopsie aus Blut- oder Liquorproben könnte ein Mittel sein, um den miRNA-26a-Status vor der Operation zu ermitteln. Dass die Bestimmung der miRNA-26a im Serum des Patienten durchaus praktikabel ist, bestätigte eine aktuelle Studie von Parviz-Hamidi et al.<sup>75</sup>.

Die vorliegenden Studienergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer genauen Stratifizierung von Glioblastompatienten anhand molekularer Marker, um auf der Grundlage einer personalisierten Medizin den maximalen Therapieerfolg für jeden einzelnen Patienten erzielen zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ahlbom A, Feychting M, Green A, et al. Epidemiologic evidence on mobile phones and tumor risk: a review. *Epidemiol Camb Mass*. 2009;20(5):639-652.
2. Areeb Z, Stylli SS, Koldej R, et al. MicroRNA as potential biomarkers in Glioblastoma. *J Neurooncol*. 2015;125(2):237-248.
3. Ashby LS, Smith KA, Stea B. Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review. *World J Surg Oncol*. 2016;14(1).
4. Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. A MicroRNA Expression Ratio is Predictive of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009;15(8):2850-2855.
5. Bäcklund LM, Nilsson BR, Liu L, Ichimura K, Collins VP. Mutations in Rb1 pathway-related genes are associated with poor prognosis in Anaplastic Astrocytomas. *Br J Cancer*. 2005;93(1):124-130.
6. Baker M. MicroRNA profiling: separating signal from noise. *Nat Methods*. 2010;7:687-692.
7. Bleehen NM, Stenning SP. 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*. 1991;64(4):769-774.
8. Bock HC, Puchner MJA, Lohmann F, et al. First-line treatment of malignant glioma with carmustine implants followed by concomitant radiochemotherapy: a multicenter experience. *Neurosurg Rev*. 2010;33(4):441-449.
9. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe HH, Moch H, eds. *Pathologie: mit rund 150 Tabellen; [Plus im Web, mediscript]*. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Elsevier, Urban & Fischer; 2012.
10. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C. Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;67(2):139-152.
11. Brem H, Mahaley MS, Vick NA, et al. Interstitial chemotherapy with drug polymer implants for the treatment of recurrent gliomas. *J Neurosurg*. 1991;74(3):441-446.
12. Brem H, Piantadosi S, Burger PC, et al. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. *The Lancet*. 1995;345(8956):1008-1012.
13. Buermans HP, Ariyurek Y, van Ommen G, den Dunnen JT, 't Hoen PA. New methods



for next generation sequencing based microRNA expression profiling. *BMC Genomics*. 2010;11(1):716.

**14.** Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-15529.

**15.** Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):2999-3004.

**16.** Carleton M, Cleary MA, Linsley PS. MicroRNAs and Cell Cycle Regulation. *Cell Cycle*. 2007;6(17):2127-2132.

**17.** Chen J, Zhang K, Xu Y, et al. The role of microRNA-26a in human cancer progression and clinical application. *Tumor Biol*. 2016;37(6):7095-7108.

**18.** Chowdhary SA, Ryken T, Newton HB. Survival outcomes and safety of carmustine wafers in the treatment of high-grade gliomas: a meta-analysis. *J Neurooncol*. 2015;122(2):367-382.

**19.** Dahl C, Guldborg P. DNA methylation analysis techniques. *Biogerontology*. 2003;4(4):233-250.

**20.** Dawson MA, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell*. 2012;150(1):12-27.

**21.** De Bonis P, Anile C, Pompucci A, et al. Safety and efficacy of Gliadel wafers for newly diagnosed and recurrent glioblastoma. *Acta Neurochir (Wien)*. 2012;154(8):1371-1378.

**22.** DeAngelis LM. Brain Tumors. *N Engl J Med*. 2001;344(2):114-123.

**23.** Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231-235.

**24.** Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259-269.

**25.** Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-Repair Gene MGMT and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents. *N Engl J Med* 2000; 343:1350-1354

**26.** Felsberg J, Rapp M, Loeser S, et al. Prognostic Significance of Molecular Markers and Extent of Resection in Primary Glioblastoma Patients. *Clin Cancer Res*. 2009;15(21):6683-6693.

**27.** Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(5):1827-1831.

**28.** Ge X, Pan M-H, Wang L, et al. Hypoxia-mediated mitochondria apoptosis inhibition induces temozolomide treatment resistance through miR-26a/Bad/Bax axis. *Cell Death Dis*. 2018;9(11).

29. Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, et al. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA*. 2010;16(5):991-1006.
30. Goldhoff P, Clarke J, Smirnov I, et al. Clinical Stratification of Glioblastoma Based on Alterations in Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein (RB1) and Association with the Proneural Subtype. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012;71(1):83-89.
31. Grossman R, Burger P, Soudry E, et al. MGMT inactivation and clinical response in newly diagnosed GBM patients treated with Gliadel. *J Clin Neurosci*. 2015;22(12):1938-1942.
32. Grote HJ, Schmiemann V, Kazimirek M, Böcking A. Quantitative methylierungsspezifische PCR zur Lungenkarzinomdiagnostik. *Pathol*. 2007;28(5):377-383.
33. Guo P, Nie Q, Lan J, Ge J, Qiu Y, Mao Q. C-Myc negatively controls the tumor suppressor PTEN by upregulating miR-26a in glioblastoma multiforme cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;441(1):186-190.
34. Gutenberg A, Bock HC, Brück W, et al. MGMT promoter methylation status and prognosis of patients with primary or recurrent glioblastoma treated with carmustine wafers. *Br J Neurosurg*. 2013;27(6):772-778.
35. Hafner M, Landgraf P, Ludwig J, et al. Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods San Diego Calif*. 2008;44(1):3-12.
36. Halani SH, Babu R, Adamson DC. Management of Glioblastoma Multiforme in Elderly Patients: A Review of the Literature. *World Neurosurg*. 2017;105:53-62.
37. Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(4):410-415.
38. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of Pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(9):1296-1303.
39. Hartmann C, Meyer J, Balss J, et al. 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)*. 2009;118(4):469-474.
40. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522-531.
41. Hegi ME, Diserens A-C. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med*. Published online 2005:7.
42. Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, et al. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev*. 2009;23(11):1327-1337.
43. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex. *Science*. 2002;297(5589):2056-2060.
44. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces.

Nucleic Acids Res. 2005;33(6):e56.

45. James CD. Molecular Genetics of Tumors of the CNS 19 19 From: Contemporary Cancer Research : Brain Tumors. In: ; 2017.

46. Jen J, Harper JW, Bigner SH, et al. Deletion of p16 and p15 Genes in Brain Tumors. Cancer Res. 1994;54(24):6353-6358.

47. Johansen C, Boice J, McLaughlin J, Olsen J. Cellular telephones and cancer--a nationwide cohort study in Denmark. J Natl Cancer Inst. 2001;93(3):203-207.

48. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet. 2002;3(6):415-428.

49. Jovanovic M, Hengartner MO. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. Oncogene. 2006;25(46):6176-6187.

50. Kim H, Huang W, Jiang X, Pennicooke B, Park PJ, Johnson MD. Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(5):2183-2188.

51. Kornblith PL, Walker M. Chemotherapy for malignant gliomas. J Neurosurg. 1988;68(1):1-17.

52. Korshunov A, Casalini B, Chavez L, et al. Integrated molecular characterization of IDH-mutant glioblastomas. Neuropathol Appl Neurobiol. 0(0).

53. Kortmann R-D, Jeremic B, Weller M, Plasswilm L, Bamberg M. Radiochemotherapy of Malignant Glioma in Adults. Strahlenther Onkol. 2003;179(4):219-232.

54. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. Radiother Oncol. 2002;64(3):259-273.

55. Lechapt-Zalcman E, Levallet G, Dugué AE, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation and low MGMT-encoded protein expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with biodegradable carmustine wafer implants after initial surgery followed by radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide. Cancer. 2012;118(18):4545-4554.

56. Li W, Ruan K. MicroRNA detection by microarray. Anal Bioanal Chem. 2009;394(4):1117-1124.

57. Lillehei KO, Kalkanis SN, Liau LM, et al. Rationale and design of the 500-patient, 3-year, and prospective Vigilant Observation of Glioblastoma Wafer Implant registry. CNS Oncol. 2017;7(2).

58. López-Urrutia E, Coronel-Hernández J, García-Castillo V, et al. MiR-26a downregulates retinoblastoma in colorectal cancer. Tumor Biol. 2017;39(4):1010428317695945.

59. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol (Berl). 2016;131(6):803-820.

60. miRNA Isolation Kit: miRNeasy Mini Kit - QIAGEN Online Shop. Accessed November 26, 2018.
61. Mullis KB, Faloona FA. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods in Enzymology*. Vol 155. Recombinant DNA Part F. Academic Press; 1987:335-350.
62. Muscat JE, Malkin MG, Thompson S, et al. Handheld Cellular Telephone Use and Risk of Brain Cancer. *JAMA*. 2000;284(23):3001-3007.
63. Neglia JP, Meadows AT, Robison LL, et al. Second Neoplasms after Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199111073251902>.
64. Nikolova T, Roos WP, Krämer OH, Strik HM, Kaina B. Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2017;1868(1):29-39.
65. Nordheim A, Knippers R, Dröge P, et al., eds. *Molekulare Genetik*. 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Thieme; 2015.
66. Nykänen A, Haley B, Zamore PD. ATP Requirements and Small Interfering RNA Structure in the RNA Interference Pathway. *Cell*. 2001;107(3):309-321.
67. Ohgaki H. Epidemiology of Brain Tumors. In: *Cancer Epidemiology*. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2009:323-342.
68. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2005;109(1):93-108.
69. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncol*. 2013;15(Suppl 2):ii1-ii56.
70. Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. The Use of Real-Time Reverse Transcriptase PCR for the Quantification of Cytokine Gene Expression. *J Biomol Tech JBT*. 2003;14(1):33-43.
71. Pallud J, Audureau E, Noel G, et al. Long-term results of carmustine wafer implantation for newly diagnosed glioblastomas: a controlled propensity-matched analysis of a French multicenter cohort. *Neuro-Oncol*. 2015;17(12):1609-1619.
72. Pan E, Mitchell SB, Tsai JS. A retrospective study of the safety of BCNU wafers with concurrent temozolomide and radiotherapy and adjuvant temozolomide for newly diagnosed glioblastoma patients. *J Neurooncol*. 2008;88(3):353-357.
73. Paravati AJ, Heron DE, Landsittel D, et al. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma and anaplastic astrocytoma: validation of Radiation Therapy Oncology Group-Recursive Partitioning Analysis in the IMRT and temozolomide era. *J Neurooncol*. 2011;104(1):339-349.
74. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807.

75. ParvizHamidi M, Haddad G, Ostadrahimi S, et al. Circulating miR-26a and miR-21 as biomarkers for Glioblastoma multiform. *Biotechnol Appl Biochem*. 0(ja).
76. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. :4.
77. Pichlmeier U, Bink A, Schackert G, Stummer W. Resection and survival in glioblastoma multiforme: An RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients. *Neuro-Oncol*. 2008;10(6):1025-1034.
78. Preusser M, Janzer RC, Felsberg J. Anti- O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multi- forme: observer variability and lack of asso- ciation with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol*. 18(03 September 2008):520-532.
79. Qian X, Zhao P, Li W, et al. MicroRNA-26a Promotes Tumor Growth and Angiogenesis in Glioma by Directly Targeting Prohibitin. *CNS Neurosci Ther*. 2013;19(10):804-812.
80. Sabel M, Giese A. Safety profile of carmustine wafers in malignant glioma: a review of controlled trials and a decade of clinical experience. *Curr Med Res Opin*. 2008;24(11):3239-3257.
81. Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 2006;9(6):435-443.
82. Sampath P, Brem H. Implantable Slow-Release Chemotherapeutic Polymers for the Treatment of Malignant Brain Tumors. *Cancer Control*. 1998;5(2):130-137.
83. Schlegel U. Neue WHO-Klassi kation der Hirntumoren. *Im Focus Onkol*.:8.
84. Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP. CDKN2 (p16/MTS1) Gene Deletion or CDK4 Amplification Occurs in the Majority of Glioblastomas. *Cancer Res*. 1994;54(24):6321-6324.
85. Schulz-Schaeffer WJ. Neuerungen der WHO-Klassifikation der Hirntumore von 2016. *Radiol*. 2017;57(9):701-706.
86. Selker RG, Shapiro WR, Burger P, et al. 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*. 2002;51(2):343-357.
87. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):27-36.
88. Shi R, Chiang VLC. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *BioTechniques*. 2005;39(4):519-525.
89. Shirahata M, Ono T, Stichel D, et al. Novel, improved grading system(s) for IDH-mutant astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2018;136(1):153-166.
90. Siemiatycki J, Richardson L, Straif K, et al. Listing Occupational Carcinogens. *Environ Health Perspect*. 2004;112(15):1447-1459.

91. Simon M, ed. Gliomchirurgie: mit 230 Abbildungen. Springer; 2018.
92. Simon M, Köster G, Menon AG, Schramm J. Functional evidence for a role of combined CDKN2A (p16-p14ARF)/CDKN2B (p15) gene inactivation in malignant gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1999;98(5):444-452.
93. Sippl C, Ketter R, Bohr L, et al. MiRNA-181d Expression Significantly Affects Treatment Responses to Carmustine Wafer Implantation. *Neurosurgery*. Published online May 26, 2018.
94. Sippl C, Ketter R, Braun L, et al. miRNA-26a expression influences the therapy response to carmustine wafer implantation in patients with glioblastoma multiforme. *Acta Neurochir (Wien)*. Published online September 2, 2019.
95. Sippl C, Teping F, Ketter R, et al. The Influence of Distinct Regulatory miRNAs of the p15/p16/RB1/E2F Pathway on the Clinical Progression of Glioblastoma Multiforme. *World Neurosurg*. 2019;132:e900-e908.
96. Stewart. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *The Lancet*. 2002;359(9311):1011-1018.
97. Stummer W, Reulen H-J, Meinel T, et al. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*. 2008;62(3):564-576; discussion 564-576.
98. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-996.
99. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, et al. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015;314(23):2535-2543.
100. Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. Glioblastoma multiforme – an overview. *Contemp Oncol*. 2014;18(5):307-312.
101. Urbschat S, Sippl C, Engelhardt J, Kammers K, Oertel J, Ketter R. Importance of biomarkers in glioblastomas patients receiving local BCNU wafer chemotherapy. *Mol Cytogenet*. 2017;10.
102. Valtonen S, Timonen U la, Toivanen P, et al. Interstitial Chemotherapy with Carmustine-loaded Polymers for High-grade Gliomas: A Randomized Double-blind Study. *Neurosurgery*. 1997;41(1):44-49.
103. Vogelbaum MA, Jost S, Aghi MK, et al. Application of Novel Response/Progression Measures for Surgically Delivered Therapies for Gliomas Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) Working Group. *Neurosurgery*. 2012;70(1):234-244.
104. Vogl TJ, Reith W, Rummeny EJ. Diagnostische und Interventionelle Radiologie. Published online 2011.
105. Vuorinen V, Hinkka S, Färkkilä M, Jääskeläinen J. Debulking or biopsy of malignant

glioma in elderly people – a randomised study. *Acta Neurochir (Wien)*. 2003;145(1):5-10.

**106.** Walker MD, Strike TA, Sheline GE. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol*. 1979;5(10):1725-1731.

**107.** Weber EL, Goebel EA. Cerebral edema associated with Gliadel wafers: Two case studies. *Neuro-Oncol*. 2005;7(1):84-89.

**108.** Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer Analysis Project. *Nat Genet*. 2013;45(10):1113-1120.

**109.** Westphal M, Hilt DC, Bortey E, et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncol*. 2003;5(2):79-88.

**110.** Xing W, Shao C, Qi Z, Yang C, Wang Z. The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:3341-3348.

**111.** Yin JQ, Zhao RC, Morris KV. Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends Biotechnol*. 2008;26(2):70-76.

**112.** Yoshioka M, Matsutani T, Hara A, et al. Real-time methylation-specific PCR for the evaluation of methylation status of MGMT gene in glioblastoma. *Oncotarget*. 2018;9(45):27728-27735.

**113.** Yung WKA, Albright RE, Olson J, et al. A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer*. 2000;83(5):588-593.

**114.** Yung WKA, Prados MD, Yaya-Tur R, et al. Multicenter Phase II Trial of Temozolomide in Patients With Anaplastic Astrocytoma or Anaplastic Oligoastrocytoma at First Relapse. *J Clin Oncol*. 1999;17(9):2762-2762.

**115.** Zhang Y-F, Zhang A-R, Zhang B-C, et al. MiR-26a regulates cell cycle and anoikis of human esophageal adenocarcinoma cells through Rb1-E2F1 signaling pathway. *Mol Biol Rep*. 2013;40(2):1711-1720.

**116.** Zwiener I, Blettner M, Hommel G. Survival Analysis. *Dtsch Arztebl Int*. 2011;108(10):163-169.

## 7 Publikationen

Sippl C, Ketter R, Braun L, Teping F, Schoeneberger L, Kim YJ, List M, Nakhoda A, Wemmert S, Oertel J, Urbschat S

**miRNA-26 expression influences the therapy response to carmustine wafer implantation in patients with glioblastoma multiforme.**

Acta Neurochir (Wien). 2019 Nov;161(11):2299-2309. doi: 10.1007/s00701-019-04051-8.

Sippl C, Teping F, Ketter R, Braun L, Tremmel L, Schulz-Schaeffer W, Oertel J, Urbschat S

**The Influence of Distinct Regulatory miRNAs of the p15/p16/RB1/E2F Pathway on the Clinical Progression of Glioblastoma Multiforme.**

World Neurosurg. 2019; 132: e900-e908. doi:10.1016/j.wneu.2019.07.134.

Vorträge:

### **DGNC Kongress 2019, Würzburg**

The Influence of Distinct Regulatory miRNAs of the p15/p16/RB1/E2F Pathway on the Clinical Progression of Glioblastoma Multiforme.

Sippl C, Teping F, Ketter R, Braun L, Tremmel L, Schulz-Schaeffer W, Oertel J, Urbschat S



## 8 Danksagung

Mein großer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Oertel für die Überlassung dieses spannenden Themas, die Bereitstellung der Tumorgewebeproben und die vielfältigen Anregungen für diese Arbeit.

Darüberhinaus möchte ich mich bei der Leiterin des Neurochirurgischen Labors, Frau Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat, für die Unterstützung und die unbürokratische, schnelle Vermittlung meiner Doktorarbeit bedanken. Ihr verdanke ich zudem die Erstellung des Matched-Pair-Patientenkollektivs.

Meinem Betreuer Herrn Dr. med. Christoph Sippl gebührt ein ganz besonderes Dankeschön. Er war mir von Beginn an stets eine sehr große Hilfe. Seine zahlreichen Anregungen haben enorm zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Danke Christoph, ohne Dich wäre diese Arbeit womöglich nicht zustande gekommen.

Zudem Danke ich Frau Dr. rer. nat. Cornelia Lerner, Frau Dr. rer. nat. Silke Wemmert 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 qRT-PCR und die Nutzung der hierfür erforderlichen Geräte. Frau Sigrid Welsch und Frau Sonja Hoffman bin ich zudem für die Einarbeitung in die Labortätigkeit zu großem Dank verpflichtet.

Für die Bestimmung des IDH1-Mutationsstatus bedanke ich mich bei Frau Louisa Schöneberger und dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer. Die Bestimmung des Promotor-Methylierungsstatus von MGMT und Rb1 erfolgte freundlicherweise in Zusammenarbeit mit Gerrit Breitfelder. Ein Dank gilt zudem Frau Dr. med. Jana Engelhardt für die Akquisition der klinischen Daten des Matched-Pair-Patientenkollektivs.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Markus List vom Max-Planck-Institut für Informatik, Campus E14, Saarbrücken für die Erstellung des TCGA-Datensatzes.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken, bei meiner Familie. Meinen vier Geschwistern Bettina, Julia, Peter und Felix möchte ich danken, dass sie mir in jeder Lebenslage mit Rat und Tat zur Seite stehen. Ich kann mich sehr glücklich schätzen, Euch in meinem Leben zu haben. Abschließend gilt es den zwei Menschen zu danken, die mir dieses Leben geschenkt haben, meinen Eltern Karin und Dr.

Gerhard Braun. Sie haben immer an mich und das Gelingen dieser Arbeit geglaubt. Vielen Dank, dass Ihr mich Zeit meines Lebens unterstützt und mich auf meinem Weg begleitet. Ihr seid die besten Eltern, die man sich wünschen kann. Diese Arbeit ist euch gewidmet.

## **9 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.