

Aus der Klinik der Neurochirurgie

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Leitung: Prof. Dr. med. Joachim Oertel

Die Auswirkung der IDH1 Regulation durch die miRNA-181a2 auf den Krankheitsverlauf des  
Glioblastoms

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von Louisa Schöneberger

Geb. am 19.08.1995 in Speyer

Meinem Opa

Manfred Stahmer gewidmet,

verstorben am Glioblastom (+ 19.11.2006)

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	3
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	12
Abstract	14
<u>1.0 Einleitung</u>	15
1.1 Epidemiologie des Glioblastoms (GBM)	15
1.2 Ätiologie	15
1.3 Symptomatik	16
1.4 Bildgebung	17
1.5 Therapie	17
1.5.1 Prognose	20
1.6 Histopathologische, immunologische und molekulare Marker des GBM	20
1.6.1 MGMT	20
1.6.2 IDH1	20
1.6.3 MiRNAs im Glioblastom	21
1.7 MiRNA-181a2	22
<u>2.0 Ziele der Studie</u>	23
<u>3.0 Material und Methoden</u>	24
3.1 Patientenkollektiv	24
3.2 Immunhistochemie	24
3.2.1 Herstellung von Paraffinblöcken	24
3.2.2 Schneideprotokoll Paraffinschnitte	26
3.2.3 HE-Färbung	26

3.2.4 HE-Färbung Paraffinschnitte	26
3.2.5 Immunhistochemisches Verfahren	27
3.2.6 Immunhistochemie Paraffingewebe: ABC-Peroxidase System	28
3.2.7 Auswertung der IDH1 <sub>mut</sub> -Färbung	32
3.3 MiRNA Expressionsanalyse	33
3.3.1 Isolation von miRNA	33
3.3.2 MiRNA Analyse	34
3.3.3 Reverse Transkription (RT)	34
3.3.4 QRT-PCR	35
3.3.4.1 miRNA-181a2	35
3.3.4.2 Analyse der Proteinexpression des IDH1-Gens	37
3.3.5 Auswertung qRT-PCR	37
3.3.6 MGMT	39
3.3.7 TCGA- Daten	39
3.4 Statistische Verfahren	39
<u>4.0 Ergebnisse</u>	40
4.1 Deskriptive Statistik des Kollektivs	40
4.2 MGMT Status	45
4.3 IDH1 Status	46
4.4 Korrelation zwischen IDH1 Mutationsstatus und miRNA-181a2	48
4.5 MiRNA-181a2 und Proteinexpression des IDH1-Gens	49
4.6 MiRNA-181a2 im Gesamtkollektiv	49
4.7 MiRNA-181a2 Subgruppenanalyse	50

4.7.1 Bei IDH1 <sub>WT</sub>	50
4.7.1.1 Analyse des OS	50
4.7.1.2 Validierung mittels TCGA-Datensatz	51
4.7.1.3 Analyse des PFS	52
4.7.2 Bei IDH1 <sub>mut</sub>	54
4.7.2.1 Analyse des OS	54
4.7.2.2 Analyse des PFS	54
4.8 MiRNA-181a2 Bindungsstellen auf mRNA von IDH1 <sub>WT</sub>	55
<u>5.0 Diskussion</u>	56
5.1 Methodendiskussion	56
5.1.1 Kollektiv	56
5.1.2 Histopathologische, immunologische und molekulare Marker des GBM	57
5.1.3 Immunhistochemie	57
5.1.4 PCR	58
5.1.5 Proteinexpressionsbestimmung des IDH1-Proteins mittels mRNA	58
Expressionsmessung	
5.2 Diskussion der Ergebnisse	59
5.2.1 IDH1	59
5.2.2 MiRNA-181a2	60
5.2.3 Die IDH1 Expression wird durch die miRNA-181a2 beeinflusst	61
5.3 Schlussfolgerungen	63
<u>6.0 Ausblick</u>	64

Literaturverzeichnis	65
Publikationsliste	70
Danksagung	71
Curriculum vitae	72

## Abkürzungsverzeichnis:

GBM	Glioblastom
IDH1	Isocitratdehydrogenase 1
IDH1 <sub>mut</sub>	Isocitratdehydrogenase 1 Mutation
IDH1 <sub>WT</sub>	Isocitratdehydrogenase Wildtyp
miRNA	Micro-Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
qRT-PCR	quantitative Realtime Polymerase-Chain- Reaction
WHO	World Health Organisation
CT	Computertomographie
MRT	Magnetresonanztomographie
TMZ	Temozolomid
GTR	Gross-Total-Resection
5- ALA	5-Aminolavulinsäure
OP	Operation
TMS	Transkranielle Magnetstimulation
DTI	Diffusions-Tensor-Imaging
Gy	Gray
DNA	Desoxyribonukleinsäure
BCNU	Carmustin getränkte Wafer
TTF-fields	Tumortherapiefelder
MGMT	06-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
2-HG	2-Hdroxyglutarat
mRNA	Boten- RNA

RISCs	Ribonucleidacid-induced silencing Complexes
OT	Objektträger
RT	Raumtemperatur / Reverse Transkriptase
HE	Hämatoxylin-Eosin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ABC	Avidin-Biotin Komplex
GWS	Gewebeschnitt
AK	Antikörper
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
FRET	Förster resonance energy transfer
CT	Cycle treshold
H2O	Wasser
SDS	Sequence detection system
FC	Fold Change
OS	Overall survival
STR	Subtotal Resection
NR	No Resection
PFS	Progression Free Survival
NGS	Next Generation Sequenzing
TCGA	The Cancer Genome Atlas

## Abbildungsverzeichnis:

- Abb.1) HE-Färbung des GBM in 100-facher Vergrößerung
- Abb.2) HE Färbung des GBM in 20-facher Vergrößerung
- Abb.3) MRT-Gehirn Darstellung in T1 Wichtung. Darstellung eines GBM
- Abb.4) Darstellung aus dem OP; Section a) Tumorgewebe nativ; Section b) Blick durch das OP-Mikroskop
- Abb.5) Darstellung aus dem OP; Section a) Einsatz der Neuronavigation und Positionierung des Pointers; Section b) Darstellung der exakten Pointerposition im Ventrikel.
- Abb.6) Darstellung eines OT für die Immunhistochemie an Paraffingewebe
- Abb.7) Beispiele einer IDH1 Färbung, 40-fache Vergrößerung unter dem Mikroskop
- Abb.8) Exemplarischer Amplifikationsblot einer qRT-PCR
- Abb.9) Balkendiagramm. Geschlechterverteilung der eingeschlossenen Patienten der Studie
- Abb.10) Balkendiagramm; Karnofsky-Index
- Abb.11) Alter bei ED in Monaten in Bezug auf das OS in Monaten
- Abb.12) Balkendiagramm Seitenlokalisierung des GBM
- Abb.13) Balkendiagramm Tumorlokalisierung des GBM
- Abb.14) Balkendiagramm zur Darstellung der Anzahl von Patienten mit Tumorresektion
- Abb.15) Balkendiagramm; Resektionsausmaß in Bezug auf OS in Monaten.
- Abb.16) Cox-Regression; Progressionsfreies Überleben in Bezug auf das Gesamtüberleben
- Abb.17) Balkendiagramm MGMT-Status
- Abb.18) Balkendiagramm Exprimierung der MGMT-Gen-Promoter Methylierung in Abhängigkeit des OS
- Abb.19) Häufigkeitsverteilung des Vorhandenseins der IDH1-Mutation
- Abb.20) Gesamtüberleben in Monaten bei Patienten mit IDH1<sub>mut</sub>, im Vergleich zu Patienten mit IDH1<sub>WT</sub>.
- Abb.21) Kaplan-Meier-Kurve des OS bei IDH1<sub>mut</sub> im Vergleich zum IDH1<sub>WT</sub>

- Abb.22) Balkendiagramm; Korrelation zwischen IDH1 Mutationsstatus und miRNA-181a2
- Abb.23) Cox-Regression; FC miRNA-181a2 in Bezug auf den FC der Protein-Expression des IDH1-Gens.
- Abb.24) Cox-Regression; FC miRNA-181a2 in Bezug auf das OS in Monaten.
- Abb.25) Kaplan-Meier-Kurve; OS in Monaten bei geringer Expression der miRNA-181a2 und hoher Expression der miRNA-181a2.
- Abb. 26) Kaplan-Meier Kurve der Überlebensanalyse des TCGA-Datensatzes
- Abb.27) Cox-Regression; FC miRNA-181a2 in Bezug auf das PFS in Monaten.
- Abb.28) Kaplan-Meyer-Kurve; PFS in Monaten bei geringer Expression der miRNA-181a2 und hoher Expression der miRNA-181a2.
- Abb.29) Bindungsstellenanalyse: Bindungsstellen der miRNA-181a2 an der maturierten mRNA Sequenz von IDH1<sub>WT</sub>. Komplementäre Nukleotidpaare sind in (rot) markiert.

## **Tabellenverzeichnis:**

- Tabelle 1) Protokoll der einzelnen Arbeitsschritte des Tissue Tec für die Vorbereitung der Einbettung von Paraffinschnitten
- Tabelle 2) Protokoll der absteigenden Alkoholreihe für Paraffinschnitte
- Tabelle 3) Protokoll der aufsteigenden Alkoholreihe für die Entwässerung der Paraffinschnitte
- Tabelle 4) Protokoll der einzelnen Reagenzien für die Citratpuffer-Gebrauchslösung
- Tabelle 5) Reagenzien der Tris-Gebrauchslösung
- Tabelle 6) Protokoll der einzelnen Reagenzien zur Blockierung der endogenen Peroxidase für die Immunhistochemie
- Tabelle 7) Protokoll der Reagenzien für die Blockierung mit dem Normalserum Horse für die Immunhistochemie
- Tabelle 8) Protokoll der zu verwendenden Reagenzien für den primären Antikörper bei der Immunhistochemie
- Tabelle 9) Protokoll der Reagenzien für die Tris-Ak-Verdünnung
- Tabelle 10) Ansatz des sekundären Antikörpers in der Verdünnung 1:50 für die Immunhistochemie
- Tabelle 11) Ansatz des ABC-Reagenz für die Immunhistochemie
- Tabelle 12) Ansatz des VIP Peroxidase Substratkittes für die Immunhistochemie.
- Tabelle 13) Reagenzien zur Herstellung des Mastermix für die RT
- Tabelle 14) Einzelne Programmierungsschritte des Thermocyclers für die RT
- Tabelle 15) Reagenzien für den Mastermix der qRT-PCR
- Tabelle 16) Pipettierschema für die 96 Well Platte der qRT-PCR

## Zusammenfassung

Das Glioblastom ist der häufigste maligne Hirntumor. Die Prognose des Glioblastoms ist im Allgemeinen sehr schlecht, da unter anderem keine Therapieansätze zur Heilung existieren. Ohne Therapie liegt die mittlere Überlebenszeit bei ca. zwei Monaten. Die Standardtherapie umfasst die chirurgische Resektion des Tumors mit einer anschließenden Bestrahlung und einer adjuvanten Chemotherapie. Unter dieser Therapie liegt die mittlere Überlebenszeit bei ca. 14 Monaten.

Eine entscheidende Rolle in der neuropathologischen Diagnostik des Glioblastoms stellen die molekularen Parameter dar. Die Isocitratdehydrogenase 1 ist einer der prognostisch relevantesten Marker des Glioblastoms. Patienten mit Mutationen in der Isocitratdehydrogenase 1 weisen eine längere Überlebensdauer als Patienten ohne Mutation (Isocitratdehydrogenase 1 Wildtyp) auf.

MiRNAs sind kurzkettige Ribonukleinsäure Fragmente mit bis zu 23 Nukleotiden. Sie regulieren die Genexpression durch Modifikation der Translation. Es konnte gezeigt werden, dass die miRNA-181a2 im Fettgewebe die Expression der Isocitratdehydrogenase 1 reguliert.

Im Hinblick auf diese Publikation stellt sich die Frage, inwieweit der Mutationsstatus der Isocitratdehydrogenase 1 die miRNA-181a2 Expression im Glioblastom beeinflusst. Weiterhin sollen die Fragen geklärt werden, inwieweit sich die miRNA-181a2 Expression auf den Verlauf einer Glioblastom-Erkrankung auswirkt und ob die miRNA-181a2 auch im Glioblastom regulatorisch auf die IDH1-Expression wirkt.

Dazu werden in die vorliegende Studie 74 Patienten eingeschlossen, die neuropathologisch gesichert an einem primären Glioblastom erkrankt sind. Die Grundlage der Studie bilden Gewebeproben. Zunächst werden die Tumorproben mit Hilfe von immunohistochemischen Verfahren auf das Vorhandensein der Isocitratdehydrogenase 1 Mutation untersucht. Anschließend wird die Expression der miRNA-181a2 mittels quantitativer Realtime Polymerase-Chain-Reaction betreut.

Unsere Ergebnisse zeigen bei Isocitratdehydrogenase 1 mutierten Tumoren eine signifikant höhere miRNA Expression als bei Isocitratdehydrogenase 1 Wildtyp- Tumoren. In Bezug auf die Protein-Expression des Isocitratdehydrogenase 1-Gens bei Wildtyp Tumoren kann eine inverse Korrelation zwischen der miRNA-181a2 und der Proteinexpression auf Trendniveau gezeigt werden. Des Weiteren zeigt sich, dass bei einem Glioblastom mit Isocitratdehydrogenase 1 Wildtyp eine niedrige Expression der miRNA-181a2 mit einer besseren Prognose einhergeht. Sowohl das Progression Free Survival als auch das Overall Survival sind bei einer niedrigen miRNA-181a2 Expression erhöht.

In der Gruppe der Isocitratdehydrogenase 1 mutierten Tumoren hat die miRNA-181a2 Expression keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben. Diese Aussage muss jedoch aufgrund der geringen Fallzahl mit Vorsicht interpretiert werden. Zusammenfassend konnte als Neuerung mit dieser Studie gezeigt werden, dass bei Isocitratdehydrogenase 1 Wildtyp eine niedrige miRNA-181a2 Expression mit einem längeren Überleben einhergeht.

Diese Erkenntnis könnte zukünftig genutzt werden, um mit Hilfe von „liquid biopsies“ bereits zum Diagnosezeitpunkt eine Aussage bezüglich der Prognose treffen zu können. Des Weiteren könnte die miRNA-181a2 Achse genutzt werden, um mögliche Therapieoptionen zu evaluieren.

## Abstract

Glioblastoma is the most common malignant brain tumor. The prognosis of glioblastoma is generally very poor because, among other things, there are no therapeutic approaches for healing. Without therapy, the median survival time is around two months. Standard therapy includes surgical resection of the tumor followed by radiation and adjuvant chemotherapy. The average survival time with this therapy is approximately 14 months.

The molecular parameters play a decisive role in neuropathological diagnostics of glioblastoma. Isocitrate dehydrogenase 1 is one of the most relevant prognostic markers of glioblastoma. Patients with mutations in isocitrate dehydrogenase 1 have a longer survival than patients without mutation (isocitrate dehydrogenase 1 wild type).

MiRNA's are short-chain ribonucleic acid fragments with up to 23 nucleotides. They regulate gene expression through modification of translation. It could be shown that miRNA-181a2 regulates the expression of isocitrate dehydrogenase 1 in adipose tissue.

With regard to this publication, the question arises to what extent the mutation status of isocitrate dehydrogenase 1 influences miRNA-181a2 expression in glioblastoma. Furthermore, the questions should be clarified, how the miRNA-181a2 expression affects the course of a glioblastoma disease and whether the miRNA-181a2 also has a regulatory effect on the IDH1 expression in glioblastoma.

For this purpose, 74 patients are included in the present study who have neuropathological evidence of a primary glioblastoma. Tissue samples form the basis of the study. First, the tumor samples are examined for the presence of the isocitrate dehydrogenase 1 mutation using immunohistochemical methods. The expression of miRNA-181a2 is then monitored using quantitative real-time polymerase chain reaction.

Our results show a significantly higher miRNA expression in isocitrate dehydrogenase 1 mutated tumors than in isocitrate dehydrogenase 1 wild-type tumors. With regard to the protein expression of the isocitrate dehydrogenase 1 gene in wild-type tumors, an inverse correlation between miRNA-181a2 and protein expression at trend level can be shown. Furthermore, it is shown that in a glioblastoma with isocitrate dehydrogenase 1 wild type, a low expression of the miRNA-181a2 is associated with a better prognosis. Both the progression free survival and the overall survival are increased with a low miRNA-181a2 expression.

In the group of isocitrate dehydrogenase 1 mutated tumors, miRNA-181a2 expression has no influence on overall survival. However, due to the small number of cases, this statement must be interpreted with caution. In summary, as an innovation with this study it was shown that isocitrate dehydrogenase 1 wild-type low miRNA-181a2 expression goes hand in hand with longer survival.

This knowledge could be used in the future to be able to make a statement regarding the prognosis at the time of diagnosis with the help of liquid biopsies. Furthermore, the miRNA-181a2 axis could be used to evaluate possible therapy options.

## 1.0 Einleitung

### 1.1 Epidemiologie

Hirntumore sind mit einem Anteil von 10% eine eher seltene Krebserkrankung. Die malignen glialen Tumore, wie das Glioblastom (GBM), stellen 50-60% der Hirntumore dar (1). Anhand der World Health Organisation (WHO) Graduierung erfolgt eine standardisierte Klassifikation der Malignität. Hierbei wird nach histopathologischen Kriterien und entsprechendem Differenzierungsgrad dieser Neoplasien eingeteilt. Grad 1 Tumore charakterisieren sich durch eine gute Differenzierung mit einem geringen Proliferationspotenzial, und einer geringen Mitosezahl. Der Grad 4 beschreibt einen sehr undifferenzierten und invasiven Tumor mit einer hohen Mitoserate (2). Es erkranken mehr Männer als Frauen an einem GBM (Männer: 9,0 von 100.000, Frauen: 7,7 von 100.000) (96). Des Weiteren tritt die Erkrankung vermehrt in westlichen Ländern auf und hat eine höhere Prävalenz bei weißen im Vergleich zu farbigen Menschen (3), (5). Unter allen malignen Tumoren bei Kindern treten Hirntumoren in 20% der Fälle auf. Ein GBM ist selten (4).

### 1.2 Ätiologie

Gliale Tumore gehen vom Stützgewebe des Gehirns, den Gliazellen aus. Die Entstehung des GBM ist bislang nicht vollständig verstanden. Der einzig bekannte Risikofaktor ist die hochdosierte ionisierende Strahlenexposition (5). Patienten, die chemotherapeutisch wegen einer akuten lymphatischen Leukämie behandelt wurden, zeigen im weiteren Lebensverlauf eine erhöhte Inzidenz an einem GBM zu erkranken (5). Ebenfalls wird die übermäßige Applikation von Ovarialhormonen und die Exposition von Kupfersulfaten mit dem GBM in Verbindung gebracht (6). Eine Metaanalyse deutet auf einen Zusammenhang mit dem Immunsystem hin. Allergiker haben demnach ein 60% geringeres Risiko an einem GBM zu erkranken. Der Grund hierfür ist nicht abschließend verstanden (7), (8), (9). Eine genetische Veranlagung wird derzeit nur in 5-10% der Fälle diskutiert (10).

GBM entstehen zu 95% in supratentoriellen Bereichen der weißen Substanz. Es zeichnet sich durch rasantes Wachstum aus. Makroskopisch können einige Tumore der Gestalt eines Schmetterlings ähneln, da sie sich im fortgeschrittenen Stadium über die Falx cerebri erstrecken (11). Das GBM erscheint sehr heterogen. Makroskopisch lassen sich multifokale Blutungen, Nekrosen und zystische Bereiche differenzieren. Histologisch ähnelt das GBM einem anaplastischen Astrozytom. Die Malignitätskriterien des anaplastischen Astrozytoms sind pleomorphe Zellen mit einer hohen mitotischen Aktivität (Abb.1). Das GBM weist histologisch zusätzlich Nekrosen (Abb.2a) und Gefäßhyperplasien (Abb.2b) auf (12).

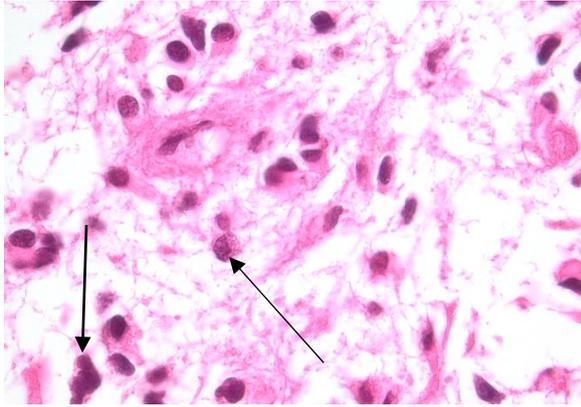


Abb.1) HE-Färbung des GBM in 100-facher Vergrößerung; Darstellung des Pleomorphismus (dicker Pfeil) und der Mitosen (dünner Pfeil).

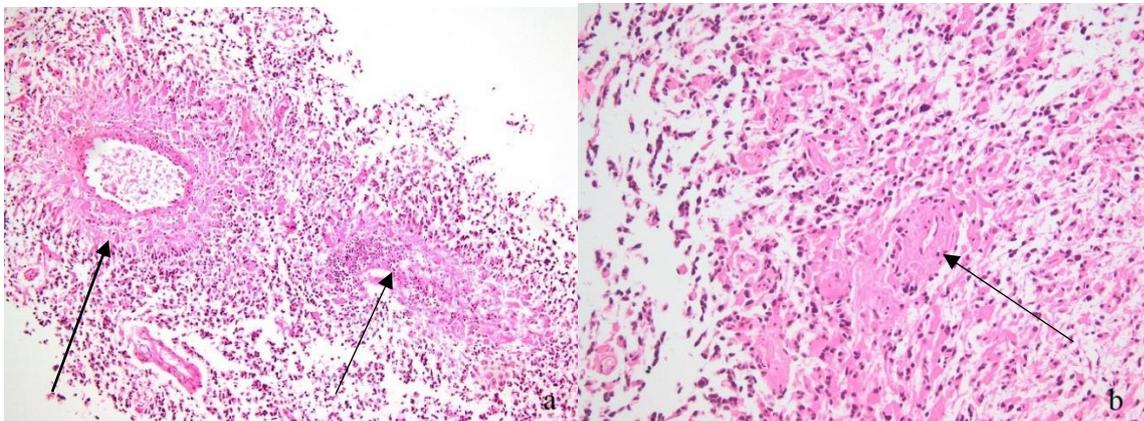


Abb.2) Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE) des GBM in 20-facher Vergrößerung; Sektion a) Darstellung von Flächennekrosen (dicker Pfeil) und stiftförmigen Nekrosen (dünner Pfeil). Sektion b) Darstellung von Gefäßhyperplasien.

Die diagnostische Einteilung von ZNS-Tumoren erfolgt histologisch auf Basis der WHO-Klassifikation. In den letzten Jahren wurden verschiedene molekulare Marker identifiziert, die zu einer präziseren Tumorklassifikation und besseren Vorhersage des Therapieansprechens und der individuellen Prognose beitragen können. Zu den wichtigsten molekularen Markern beim GBM gehören der Nachweis von Mutationen im IDH1-Gen, sowie der MGMT-Status. Träger mit einer IDH1 R132 Mutation werden als IDH1<sub>mut</sub> bezeichnet. De Novo entstandene GBM zeigen nur selten eine Mutation und sind daher meist IDH1<sub>WT</sub>. (2), (13).

### 1.3 Symptomatik

Klinisch auffällig werden Patienten, in Abhängigkeit der Lokalisation des Tumors, durch Persönlichkeitsveränderungen, Gleichgewichtsstörungen, Ataxie und ggf. Inkontinenz. Durch die

Zerstörung des Hirngewebes (Nekrosen) kann es zu neurologischen Defiziten kommen. Aufgrund der Tumorausbreitung mit einem entstehenden Ödem und der Hirndruckerhöhung kann es im weiteren Verlauf zu Kopfschmerzen, Erbrechen und einem Papillenödem kommen. Auch die neuauftretenden Krampfanfälle stellen ein mögliches Symptom dar.

Das allgemeine Befinden sowie die Alltagsaktivität werden mit dem Karnofsky-Index eingeschätzt und im Verlauf reevaluiert. Der Wert reicht von 100 (keine Einschränkung) bis 0 (Tod) (14).

#### 1.4 Bildgebung

Als Bildgebung wird routinemäßig die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) verwendet (15). Bei einem CT-Scan erscheint die Läsion als hypodenser Bereich. Eine Verschiebung der Mittellinie kann aufgrund des umliegenden Ödems vorkommen. Den Goldstandard stellt die kontrastmittelgestützte MRT- Diagnostik dar. In einer T1 gewichteten kontrastmittelverstärkten Aufnahme stellt sich ein GBM als randständig, kontrastmittelauffin dar. Es zeigt sich oft eine zentrale Nekrose. Umliegend ist ein hypointenses Hirnödem erkennbar (Abb.3) (16).

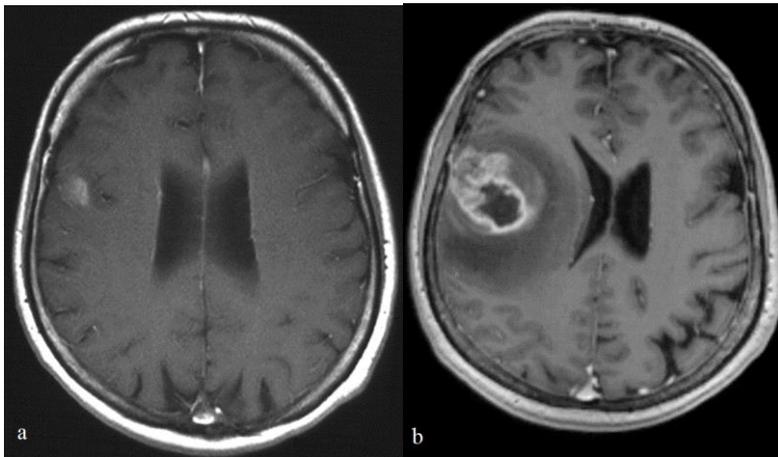


Abb.3) MRT-Gehirn Darstellung in T1 Wichtung. Darstellung eines GBM. Sektion a) Zum Zeitpunkt der ersten Symptome. Sektion b) GBM 8 Wochen nach Symptombeginn.

#### 1.5. Therapie

Die Standardtherapie stellt das sogenannte Stuppschema dar. Dieses umfasst die chirurgische Resektion des Tumors mit einer anschließenden Bestrahlung und einer adjuvanten Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) (17).

Eine Hauptkomponente der Therapie stellt die Operation dar. Das Ausmaß der chirurgischen Resektion ist von der Tumorlokalisation abhängig. In einigen Fällen ist lediglich eine Biopsieentnahme zur histologischen Diagnosesicherung möglich. Dies gilt vornehmlich dann, wenn sich der Tumor in einem eloquenten Areal befindet. Bei guter operativer Zugänglichkeit des Tumors wird eine Gross-Total-Resektion (GTR) durchgeführt, um möglichst viel Tumorgewebe entfernen zu können (18). Dennoch kann der Tumor nicht vollständig reseziert werden, da der Tumor das umliegende Hirngewebe diffus infiltriert.

Um den Tumor intraoperativ besser darstellen zu können, besteht die Möglichkeit der Fluoreszenz gestützten Resektion. Hierbei wird dem Patienten drei bis vier Stunden vor der Operation (OP) 5-Aminolavulinsäure (5 ALA) (20mg 5-ALA/Kilogramm Körpergewicht) oral verabreicht. Nur das Tumorgewebe wandelt 5-ALA in fluoreszierendes Protoporphyrin IX um. Intraoperativ kann mit einem OP-Mikroskop mit blauvioletterm Licht das fluoreszierende Signal kenntlich gemacht werden. Die Tumorbereiche erscheinen violett/rot (Abb.4 Section a/b) (19).

Um intraoperativ den Tumorbereich und die umgebenden Strukturen darstellen zu können, wird die Neuronavigation verwendet. Die Neuronavigation verknüpft den OP-Situs mit dem angefertigten drei dimensional CT/MRT. Somit kann intraoperativ mit Hilfe eines Pointers dessen räumliche Tumorausdehnung bestimmt werden (Abb.5 Section a/b) (20).

Vor der OP kommen zwei Methoden zur Anwendung, um den operativen Zugangsweg zu planen und eloquente Areale darzustellen. Bei der transkraniellen Magnetstimulation (TMS) wird eine Magnetspule an den Kopf des Patienten gehalten. Das erzeugte elektromagnetische Feld führt zu Potentialänderungen am motorischen Kortex. Die Depolarisation von Neuronen generiert Aktionspotentiale. Diese werden über den Kortikospinaltrakt an die Motoneurone des Zielmuskels weitergeleitet und können dort durch Elektromyographie sichtbar gemacht werden. Das Fibertracking stellt die Lage und den Verlauf von neuronalen Faserverbindungen im Gehirn dar. Durch eine spezielle MRT-Sequenz (Diffusions-Tensor-Imaging (DTI)) können die Faserverbindungen visualisiert werden (21).

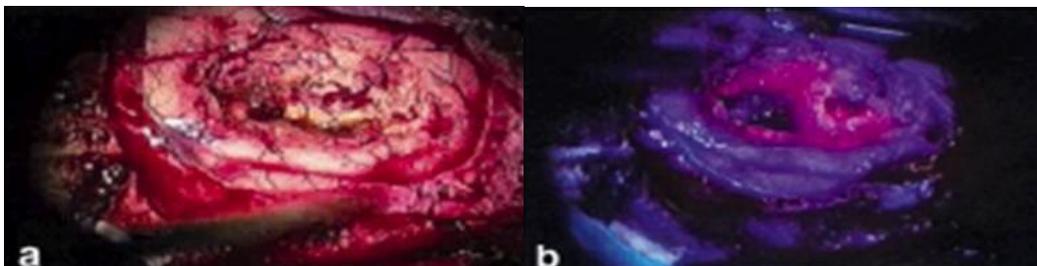


Abb.4) Darstellung aus dem OP: Sektion a) Tumorgewebe nativ; Sektion b) Blick durch das OP-Mikroskop; Anreicherung des Tumorgewebes mit 5-ALA. Durch Umwandlung in Protoporphyrin IX erscheint das Tumorgewebe violett/rot.

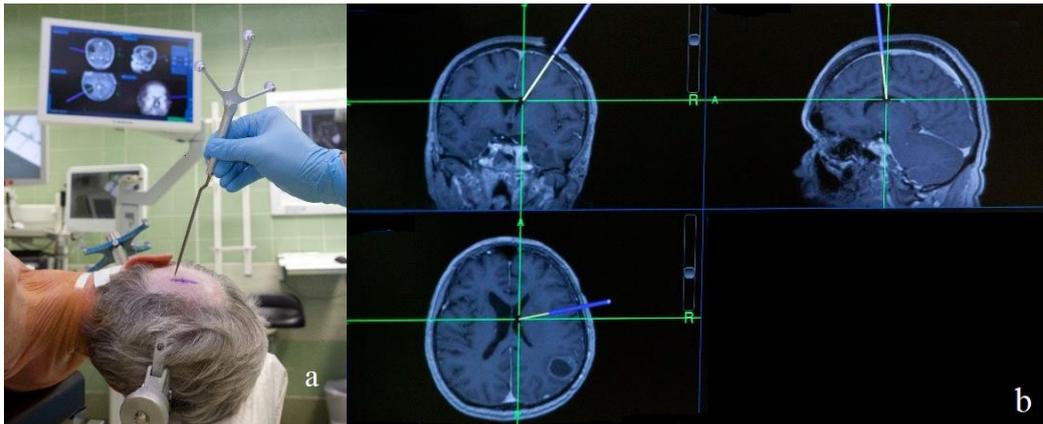


Abb.5) Darstellung aus dem OP. Sektion a) Einsatz der Neuronavigation und Positionierung des Pointers; Sektion b) Darstellung der exakten Pointerposition im Ventrikel.

Ein weiteres Element der Therapie ist die Strahlenbehandlung. Bei der Teilhirnbestrahlung wird durch die Schnittbilddiagnostik das Zielvolumen festgelegt. Das Standardschema besteht aus einer Bestrahlung der Tumorregion mit 60 Gray (Gy). Aufgeteilt in einzelne Fraktionen wird der Patient in einem Zeitraum von sechs Wochen bestrahlt (17), (22).

Parallel dazu erfolgt die Applikation von TMZ in einem konkordanten Therapieregime. Der Mechanismus besteht in der Blockierung des Zellzyklus in der G<sub>2</sub> Phase durch Methylierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) an der N<sup>7</sup> und O<sup>6</sup> Position. Die komplementäre Base kann aufgrund der Methylierung nicht angelagert werden und die Apoptose setzt ein (23). Der Vorteil des Chemotherapeutikums TMZ besteht in der oralen Darreichungsform. Die Patienten können die Chemotherapie im ambulanten Setting durchführen. Der weitere Vorteil besteht in den geringen Nebenwirkungen. Es treten, im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika, seltener Haarausfall, Übelkeit oder Erbrechen auf (24).

Bei dennoch auftretenden Unverträglichkeitsreaktionen können andere Chemotherapeutika wie Lomustin oder Etoposid verabreicht werden (25). Eine antiangiogene Medikation mit Anti-VEGF-Antikörpern oder Antikörper gegen EGFR und Tyrosinkinaseinhibitoren kann ebenfalls eingesetzt werden (26).

Intraoperativ kann zudem ein Carmustin getränkter Wafer (BCNU) eingesetzt werden, um lokal eine Chemotherapie durchzuführen (27), (28), (29), (30).

Die Tumortherapiefelder (TTF) stellen eine weitere Therapieoption dar. Hierbei trägt der Patient mindestens 18 Stunden pro Tag eine Haube auf dem rasierten Kopf. In diese sind Keramik-Gel-Pads integriert, welche elektromagnetische Wechselfelder in den Kopf übertragen. Durch diese Felder soll die Spindelbildung der Mitosephase unterbrochen werden. Gemeinsam mit der Chemotherapie soll das progressionsfreie Überleben verlängert werden (31), (32), (33).

Neben den therapeutischen Maßnahmen benötigen die Patienten unterstützende Maßnahmen und symptomatische Therapieansätze. Hierbei wird Levetiracetam zur Anfallsprohylaxe verwendet. Dexamethason wird aufgrund seiner antiödematösen Wirkung verabreicht (34).

### 1.5.1 Prognose

Im Allgemeinen ist die Prognose sehr schlecht, da unter anderem keine Therapieansätze zur Heilung existieren. Die Überlebenszeit ist abhängig von diversen genetischen Faktoren, dem Mutationstyp des Glioblastoms (IDH1<sub>mut</sub> oder IDH1<sub>WT</sub>), dem Erkrankungsalter des Patienten, der Lokalisation des Tumors, sowie der Therapie. Ohne Therapie liegt die mittlerer Überlebenszeit bei ca. zwei Monaten. Bei alleiniger Operation beträgt sie etwa fünf Monate und bei Operation mit Strahlentherapie etwa zwölf Monate (28). Das durchschnittliche Überleben unter der Standardtherapie nach Stupp beträgt im Mittel 14 Monate (22).

## 1.6 Histopathologische, immunologische und molekulare Marker des GBM

Eine Rolle in der neuropathologischen Diagnostik stellen unter anderem die molekularen Parameter dar. Hierbei wird die Isocitratdehydrogenase 1 Mutation (IDH1<sub>mut</sub>), sowie die 06- Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) genauer betrachtet.

### 1.6.1 MGMT

MGMT ist ein DNA-Reparaturprotein, das Tumorzellen vor alkylierenden Chemotherapeutika schützt. Durch dieses Protein werden Alkylgruppen an der DNA entfernt und die Wirkung der Chemotherapie nivelliert. Patienten mit einer erhöhten MGMT Expression haben daher eine schlechtere Ansprechrate auf eine alkylierende Chemotherapie und entsprechend eine schlechtere Gesamtprognose. Durch Promoter-Hypermethylierung erfolgt eine Stilllegung des MGMT-Promoters. Patienten mit einer MGMT-Gen-Promoter Methylierung zeigen entsprechend eine bessere Ansprechrate auf alkylierende Chemotherapeutika und eine bessere Gesamtprognose (35).

### 1.6.2 IDH1

IDH1 ist einer der prognostisch relevantesten Marker des GBM. Patienten mit Mutationen in der IDH1 haben eine längere Überlebensdauer als Patienten ohne Mutation (IDH1<sub>WT</sub>) (36). Im Citratzyklus wird Isocitrat zu alpha-Ketoglutarat durch die Isocitratdehydrogenase oxidiert. Diesen Schritt katalysieren verschiedene Enzyme wie die Isocitratdehydrogenase 1 und 2. Der Citratzyklus ist ein entscheidendes

Element im Energiestoffwechsel. Er stellt die Reduktionsäquivalente für die Atmungskette bereit. Die Isocitratdehydrogenase 1 kommt vor allem im Zytosol und den Peroxisomen vor, die Isocitratdehydrogenase 2 in den Mitochondrien. Hierbei entsteht das Reduktionsäquivalente NADPH. Mutationen im Isocitrat-Dehydrogenase-1/2 Signalweg sind in Tumoren wie dem GBM vorzufinden (37). Hierbei handelt es sich um eine Punktmutation auf dem Chromosom 2q33. Die Base Arginin wird durch Histidin im Codon 132 an der Nukleotidposition 395 ersetzt (R132 H IDH1). Andere Punktmutationen können auch am Codon 132 auftreten z.B. R132C oder R132S (38). Die Mutationen treten bei jüngeren Personen im Alter zwischen 20 und 50 Jahren, sowie bei Astrozytomen und Oligodendrogliomen (WHO Grad 2-3) vermehrt auf. 60-80% der sekundären GBM und damit IDH1<sub>mut</sub> weisen eine IDH1 R132 Mutation auf, während de Novo entstandene GBM und daher meist IDH1<sub>WT</sub> nur selten eine Mutation zeigen (39), (40).

IDH1 Mutationen führen zur verstärkten Akkumulation von 2-Hydroxyglutarat (2-HG). Durch die Isocitratdehydrogenase wird alpha-Ketoglutarat zu 2-HG umgewandelt. 2-HG führt aufgrund der Beeinflussung der Atmungskette zu Redoxstress und kann daher die Onkogenese antreiben (41).

### 1.6.3 MiRNAs im Glioblastom

MiRNAs sind kurzkettige Ribonukleinsäure (RNA)-Fragmente mit bis zu 23 Nukleotiden. Sie regulieren die Genexpression.

Durch die miRNA kann die Transkription einzelner Gene unterdrückt werden (silencing). Hierzu lagern sich die miRNAs an die 3'-nicht-translatierten Bereiche von Boten-RNA (mRNA) an. Die miRNAs verbinden sich mit Proteinen aus der Argonaut-Familie und bilden RNA-induced-silencing-complexes (RISCs). Hierbei werden die Argonaut-Proteine zu komplementären Zielsequenzen auf mRNAs angelagert und blockiert (42). Somit können miRNAs die Proteinbiosynthese blockieren und den Abbau von Proteinen oder mRNA fördern. MiRNAs können als Tumorsuppressoren oder Onkogene fungieren, entsprechend den von ihnen regulierten Genen. Studien zeigen, dass miRNAs der Familie 181 in der GBM-Entwicklung beteiligt sind (43), (44). Eine Überexpression der miRNA-181b und der miRNA-181c wirkt als Tumorsuppressor mit Hemmung der Proliferation (45), (46). Slaby et al. konnte in seiner Studie zeigen, dass die miRNA-181b und die miRNA-181c bei Patienten mit einer guten Ansprechbarkeit auf TMZ signifikant herunterreguliert waren (47). Eine niedrige Expression von miRNA-181d zeigt ein besseres Ansprechen auf eine BCNU-Therapie mit konsekutiver Prognoseverbesserung.

Zhai et al konnte zeigen, dass die miRNA-181a1 die Expression des CC-Motiv Chemokinliganden 8 (CCL8) verringert. CCL8 ist in GBM-Geweben hochreguliert und korreliert negativ mit der miRNA-181a1 Expression. Aufgrund dieser Studien erscheint die miRNA-181a1 als ein potenzieller molekularer Biomarker bei der klinischen Behandlung von GBM (48).

## 1.7 MiRNA-181a2

Die miRNA-181a2 gehört zur Familie der miRNA-181. Diese besteht aus mehreren Mitgliedern, miRNA-181a, miRNA-181b, miRNA-181c und miRNA-181d (49), (50). Wie oben beschrieben zeigen Studien, dass die miRNA-181 Familie in der GBM-Entwicklung beteiligt ist und als potenzieller molekularer Marker bei der Behandlung von GBM angesehen werden kann.

Die funktionelle miRNA-181a2 besteht aus 23 Nukleotiden mit der Basenabfolge:

AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU (51)

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit wurde maßgeblich durch eine Studie von Yang et al. beeinflusst. In deren Arbeit konnte mit in Vitro Untersuchungen an Mauszellen gezeigt werden, dass die miRNA-181a2 den Fettstoffwechsel durch IDH1 reguliert. Eine Überexpression der miRNA-181a2 war mit einer verringerten IDH1 Expression vergesellschaftet (52).

Eine eingehende Analyse der miRNA-181a2 im Glioblastom, insbesondere unter dem Aspekt der intratumoralen IDH1 Regulation, erfolgte bisher nicht.

## **2.0 Ziele der Studie**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es den Einfluss der miRNA-181a2 auf den Verlauf der Glioblastomerkkrankung zu bestimmen. Insbesondere soll geklärt werden, ob die miRNA-181a2 einen, bisher nur im Fettgewebe nachgewiesenen, regulatorischen Effekt auf die IDH1 auch im Tumor in vivo ausübt.

Hieraus leiten sich folgende Fragestellungen ab:

1. Inwieweit beeinflusst der Mutationsstatus der IDH1 die miRNA-181a2 Expression bei Patienten mit einem GBM?
2. Inwieweit beeinflusst die Expression der miRNA-181a2 die Proteinexpression des IDH1-Gens im GBM?
3. Inwieweit wirkt sich die miRNA-181a2 Expression auf den Verlauf einer GBM-Erkrankung aus?

### **3.0 Material und Methoden**

#### 3.1 Patientenkollektiv

In die vorliegende Arbeit werden 74 erkrankte Patienten eingeschlossen. Die Grundlage der Studie bilden Gewebeproben, die Patienten in der Neurochirurgie in Homburg entnommen worden sind. Die eingeschlossenen Patienten sind, neuropathologisch gesichert, an einem primären Glioblastom erkrankt und sind in der Neurochirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes behandelt worden. Ein Ethikvotum der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes für die Studie liegt vor. Die klinischen Follow-Up Daten liegen vor. Das Tumorgewebe aus den Resektionen wird für die Studie asserviert. Die Gewebeproben werden schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der Behandlungsablauf wird durch den Einschluss der Patienten in unsere Studie nicht verändert.

#### 3.2 Immunhistochemie

##### 3.2.1 Herstellung von Paraffinblöcken

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Proben werden zunächst angetaut. Mit einem sterilen Skalpell wird von jeder Tumorseite ein ca. 0,5cm großes Gewebestück separiert und über drei bis sechs Tage in einer 4% Formalinlösung (Roth, Karlsruhe) fixiert.

Die Fixierung im Paraffinblock dient dazu, das Gewebe möglichst in seiner natürlichen Architektur zu erhalten. Substanzverluste und Autolyse werden durch die Fixierung vermieden. Anschließend können die Proben mikroskopisch beurteilt werden.

Nach der Fixierung werden die Proben in 20\*20\*3 cm großen Biopsie Einbettkassetten (Thermo Scientific, Braunschweig) eingebettet. Über Nacht werden die Proben mit Hilfe des Tissue-Tek (Tissue-Tek VIP 5 Jr. E2, Japan) in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit flüssigem Paraffin durchtränkt. Während des Entwässerns werden folgende Stufen durchlaufen (Tabelle 1).

Tabelle 1) Protokoll der einzelnen Arbeitsschritte des Tissue-Tek für die Vorbereitung der Einbettung von Paraffinschnitten

Reagenzien	Zeiteinheiten
Spülen in Leitungswasser	2h
Isopropanol 20% (Roth, Karlsruhe)	45-60min
Spülen in destilliertem Wasser (Aqua dest.)	
Isopropanol 40% (Roth, Karlsruhe)	45-60min
Spülen in Aqua dest.	
Isopropanol 60% (Roth, Karlsruhe)	45-60min
Spülen in Aqua dest.	
Isopropanol 80% (Roth, Karlsruhe)	45-60min
Spülen in Aqua dest.	
Isopropanol 90% (Roth, Karlsruhe)	45-60min
Spülen in Aqua dest.	
Isopropanol 100% (Roth, Karlsruhe)	45-60min
Isopropanol 100%	45-60min
Isopropanol 100%	8h
Xylol (ZChL, Saarbrücken)	1h
Xylol	1h
Xylol	1h
Paraffin 55-65°C (Roth, Karlsruhe)	4h
Paraffin 55-65°C	8h
Paraffin 55-65°C	4h

Das Gewebe wird an der Paraffinausgussstation (Shandon, Histocentre 2, Dreieich) in Metallförmchen justiert und anschließend mit flüssigem Paraffin übergossen. Das flüssige Paraffin erstarrt, um anschließend mit Hilfe des Mikrotoms (Slee medical CUT 5062, Mainz) Schnitte anfertigen zu können.

### 3.2.2 Schneideprotokoll Paraffinschnitte

Die Schnittstärke wird am Mikrotom auf 3µm eingestellt. Der angefertigte Schnitt wird in das bereitgestellte Wasserbad zur Schnittstreckung gegeben. Durch das Aufziehen auf einen Objektträger (OT) (Thermo Scientific, Braunschweig) haftet der Schnitt und wird bei RT getrocknet.

### 3.2.3 HE-Färbung

Die HE-Färbung ist eine Methode, mit der feingewebliche Strukturen anhand von zwei Einzelfärbungen sichtbar gemacht werden können. Hämatoxylin dient der Anfärbung der Zellkerne und Eosin der Anfärbung des Zytoplasmas. Somit können die krankhaften Veränderungen der Morphologie erkannt werden. Des Weiteren dient Hämatoxylin als Gegenfärbung bei der Immunhistologie.

Es wird von jeder Tumorprobe ein Gewebeschnitt erstellt, der im Anschluss mit HE angefärbt wird. Histotypische Merkmale des Glioblastoms sind die stiftförmigen Nekrosen/ Flächen-Nekrosen und die Gefäßhyperplasien. Sind diese Merkmale nicht erkennbar, müssen erneut Schnitte hergestellt werden, um repräsentatives Tumorgewebe darzustellen.

### 3.2.4. HE-Färbung Paraffinschnitte

Nach Herstellung der Paraffinschnitte werden diese über Nacht luftgetrocknet. Am nächsten Morgen werden die Schnitte ca. 30min im Wärmeschrank (VWR 466-3510, EC) eingeschmolzen. Anschließend durchlaufen die Schnitte die absteigende Alkoholreihe (Tabelle 2).

Tabelle 2) Protokoll der absteigenden Alkoholreihe für Paraffinschnitte

Reagenzien	Zeiteinheiten
Xylol 1	5min
Xylol 2	5min
Xylol 3	5min
100% Ethanol (Sigma-Aldrich co.Steinheim)	5min
96% Ethanol (Sigma-Aldrich co.Steinheim)	5min
70% Ethanol (Sigma-Aldrich co.Steinheim)	5min
Aqua dest.	10sec.

Nun werden die Schnitte durch das 15-minütige Eintauchen in Mayer's Hämalaun (Roth, Karlsruhe) angefärbt. Dann werden die Schnitte 10min unter dem fließenden Leitungswasser gebläut und mit Aqua dest. gespült. Weiterhin wird 0,5% Eosin (Roth, Karlsruhe), versetzt mit drei Tropfen der Essigsäure (Roth, Karlsruhe) für ca. 2min auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte werden unter laufendem Aqua dest. ausgewaschen und durchlaufen die aufsteigende Alkoholreihe (Tabelle 3).

Tabelle 3) Protokoll der aufsteigenden Alkoholreihe für die Entwässerung der Paraffinschnitte

Reagenzien	Zeiteinheiten
100% Ethanol 1	2min
100% Ethanol 2	2min
100% Ethanol 3	2min
Xylol 1	2min
Xylol 2	2min

Aus dem letzten Xylol werden die Schnitte entnommen. Ein Tropfen Histokit (Roth, Karlsruhe) wird auf die Stelle des Gewebeschnittes getropft und mit einem Deckglas (Engelbrecht, Edermünde) fixiert.

### 3.2.5 Immunhistochemisches Verfahren

Die Immunhistochemie ist eine Methode, mit der Antigene im Gewebe detektiert werden können. Antikörper sind in der Lage sich an spezifische Epitope zu binden, die somit durch spezifische Farbstoffe kenntlich gemacht werden.

Bei der Erhebung des Isocitratdehydrogenase 1 – R132H Mutationsstatus der auserwählten Tumorproben wird die indirekte Methode verwendet. Hierbei bindet zunächst ein Antikörper an das entsprechende Epitop. Anschließend wird der gebundene Antikörper durch das Binden eines weiteren Antikörpers sichtbar gemacht (53).

Für die Paraffinschnitte wird das immunhistochemische Verfahren des Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Peroxidase Systems verwendet.

### 3.2.6 Immunhistochemie Paraffingewebe: ABC-Peroxidase System

Für jedes Tumorpräparat werden pro OT zwei Gewebeproben aufgetragen, eine Negativkontrolle und eine zu evaluierende Probe (Abb.5).

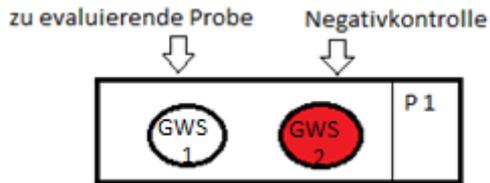


Abb.6) Darstellung eines OT für die Immunhistochemie an Paraffingewebe. Für eine Tumorprobe (P1) mit einem Gewebeschnitt (GWS) für die zu evaluierende Probe (GWS 1) und einem GWS für die Negativkontrolle (GWS 2) desselben Tumors.

Der hergestellte Paraffinschnitt wird 30min in den Wärmeschrank bei 58°C gestellt, entparaffiniert und rehydriert. Dazu durchlaufen die Gewebeproben die absteigende Alkoholreihe, um die Gewebe in ihre wässrige Phase zu überführen. Die Formalinfixierung und die Einbettung in Formalin führen zu den inter- und intramolekularen Vernetzungen der Proteine und entsprechend zur Maskierung der Antigene. Daher muss für die Gewährleistung der Immunreaktion und dem Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse eine hitzeinduzierte Antikörperdemaskierung erfolgen.

Die Antigendemaskierung erfolgt durch das Befüllen des Dampfgarers (Braun, Darmstadt) mit 1l Wasser. Die Küvette wird mit 200ml der Citratpuffer-Gebrauchslösung (Tabelle 4) in den Dampfgarer gegeben und erhitzt.

Tabelle 4) Protokoll der einzelnen Reagenzien für die Citratpuffer-Gebrauchslösung

Reagenzien (Verdünnen auf 1:10)
29,4g Tri-Natriumcitratdihydrat (Sigma, Steinheim)
900ml Aqua. Dest

Die Küvette verbleibt für 20min im Gerät. Anschließend wird die Küvette ca. 20min abgekühlt und 5min in der Tris-Gebrauchslösung (Tabelle 5) gespült.

Tabelle 5) Reagenzien der Tris-Gebrauchslösung

Reagenzien
100ml Stammlösung (Tris-Puffer) (63,5g Tris Säure; 11,8g Tris Base, 1l Aqua dest)
15g NaCL (Sigma, Steinheim)
885ml Aqua dest.

Für die Blockierung der endogenen Peroxidase wird folgendes Reagenz angesetzt (Tabelle 6):

Tabelle 6) Protokoll der einzelnen Reagenzien zur Blockierung der endogenen Peroxidase für die Immunhistochemie

Reagenzien
1ml 0,3% Peroxidase (Merck KGaA, Darmstadt)
99ml Methanol (thgeyer, Renningen)

Der OT wird für 20min in das in Tabelle 4 angegebene Gemisch eingetaucht. Die Gewebe auf dem OT werden mit einem Pub Pen (Vector, Burlingame) umfahren und der OT in eine feuchte Kammer gelegt.

Hiermit werden durch einen Substratüberschuss die endogenen Peroxidasen im Gewebe blockiert. Somit wird bei der Auswertung eine Hintergrundfärbung dieser physiologisch im Gewebe vorkommenden Peroxidasen ausgeschlossen.

Weiterhin wird durch die Blockierung mit dem Normalserum Horse (Vectorlabs, Burlingame) (entsprechend der Tierspezies, von der der sekundäre Antikörper stammt) eine unspezifische Hintergrundfärbung, welche durch das Anlagern der beiden Antikörper entsteht, vermieden. Falsch-positive Ergebnisse, bedingt durch die Bindung des Sekundärantikörpers an die Bestandteile des Normalserums können dadurch verhindert werden.

Der OT wird zwei Mal 5min in der Tris-Gebrauchslösung gespült. Die umkreisten Gewebeproben werden mit dem Normalserum Horse blockiert (Tabelle 7).

Tabelle 7) Protokoll der Reagenzien für die Blockierung mit dem Normalserum Horse für die Immunhistochemie

Reagenzien
2,5µl Normalserum Horse
250µl Tris
1 Tropfen Avidin (Vector, Burlingame)

Jeweils 50µl dieser Suspension wird auf die beiden Gewebeproben des OT's pipettiert. Nach einer 30-minütigen Einwirkzeit wird das Reagenz ablaufen gelassen.

Die zu evaluierende Gewebeprobe wird mit 50µl des Primären Antikörper (mouse monoklonal) in der Verdünnung 1:50 versetzt (Tabelle 8).

Tabelle 8) Protokoll der zu verwendenden Reagenzien für den Primären Antikörpern bei der Immunhistochemie

Reagenzien
1µl AK mouse monoklonal (Dianova, Hamburg)
50µl Tris-Puffer
1Tropfen Biotin (Vector, Burlingame)

Auf die Negativkontrolle wird 50µl Tris gegeben (Tabelle 9).

Tabelle 9) Protokoll der Reagenzien für die Tris-Ak-Verdünnung

Reagenzien
50ml Tris Gebrauchslösung
1ml Tween 20 (Sigma-Alderich, Steinheim)

In der feuchten Kammer wird dies über Nacht im Kühlschrank bei 4°C stehen gelassen.

Am nächsten Tag wird der OT zwei Mal 5min in der Tris Gebrauchslösung gespült. Des Weiteren werden die Gewebeproben mit dem biotinylierten Sekundären-AK (Horse-anti-mouse) in einer 1:200 Verdünnung versetzt, damit dieser an das Fc-Fragment des Primär-Antikörpers binden kann (Tabelle 10).

Tabelle 10) Ansatz des Sekundären Antikörpers in der Verdünnung 1:50 für die Immunhistochemie

Reagenzien
1µl sekundärer Antikörper (Horse anti mouse)
50µl Tris Ak-Verdünnung
2,5µl Normalserum Horse

Jeweils 50µl wird auf die Gewebeproben für 1h bei RT aufgetragen. Anschließend wird mit der Tris-Gebrauchslösung zweimal 5min gespült.

Die Gewebeproben werden mit je 50µl (Strept) ABC Reagenz versetzt (Tabelle 11). Dieses wird 30min vorher angesetzt. In diesem Schritt bindet nun das Streptavidin an den Sekundärantikörper über die Biotinbindungsstellen.

Tabelle 11) Ansatz des ABC-Reagenz für die Immunhistochemie

Reagenzien
2µl Reagenz A (Vector; Burlingame)
1µl Reagenz B (Vector,Burlingame)
50µl Tris Gebrauchslösung

Anschließend wird der OT 5min in der Tris-Gebrauchslösung gespült. Um nachzuweisen, ob der Antikörper gebunden hat, verwendet man zur enzymatischen Detektion das VIP-Peroxidase-Kit (Tabelle 12).

Tabelle 12) Ansatz des VIP Peroxidase Substratkittes für die Immunhistochemie.

Reagenzien
1,7ml Tris-Gebrauchslösung
1Tropfen Reagenz 1 (Vector, Burlingame)
1Tropfen Reagenz 2 (Vector, Burlingame)
1Tropfen Reagenz 3 (Vector, Burlingame)
1Tropfen Reagenz 4 (Vector, Burlingame)

Es werden jeweils 50µl auf die Gewebeproben aufgetragen und 5min bei RT inkubiert. Schließlich wird der OT mit Aqua dest. gespült.

Zur Erhöhung des Kontrastes wird im letzten Schritt die Kernfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. Es werden 50µl auf die Gewebeproben für 30sec. aufgetragen. Im Anschluss wird der OT unter fließendem Leitungswasser für 5-10min gebläut und mit Aqua dest. abgespült. Unter dem Abzug wird in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Schließlich wird der OT mit Histokit eingedeckt.

### 3.2.7 Auswertung der IDH<sub>mut</sub>-Färbung

Für jede Tumorprobe wird neben der IDH-1-Färbung und der Negativkontrolle auch ein Nativpräparat angefertigt. Die Auswertung erfolgt bei 40-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Olympus BX61, Japan). Es kann bei der Beurteilung der Nativkontrolle festgestellt werden, ob die Schnitttiefe im Tumorgewebe ausreichend ist, um typische Merkmale des Glioblastoms histologisch zu identifizieren. Ist dies zutreffend, wird die Negativkontrolle mit der zu evaluierenden Probe verglichen. Die Negativkontrolle darf keine positiv gefärbten Zellen aufzeigen. Hierbei ist eine Färbung als positiv zu werten, wenn die Zellen sich im Vergleich zum umliegenden Gewebe violett anfärben. Bei der Auswertung, ob eine Tumorprobe IDH1<sub>mut</sub> positiv gefärbt ist, kommt es neben der Anfärbung auch auf den prozentualen Anteil der gefärbten Zellen an. Somit kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob der Tumor die IDH1-R132H-Mutation in geringem oder hohem Maße exprimiert (Abb.6 a/b).

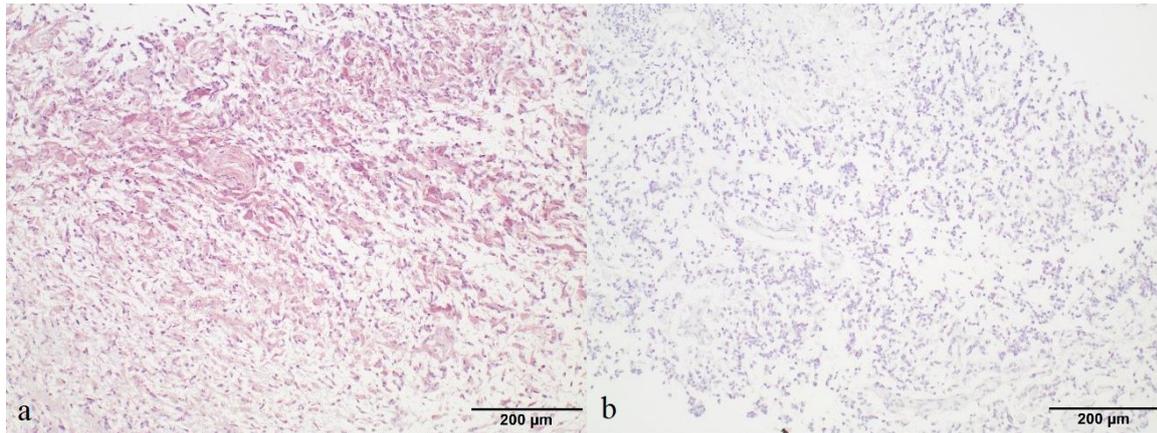


Abb.7) Beispiele einer IDH1 Färbung, 40-fache Vergrößerung unter dem Mikroskop; Sektion a) positiv markiertes Präparat in violetter Anfärbung; Sektion b) Negativkontrolle ohne Farbumschlag.

### 3.3 MiRNA Expressionsanalyse

#### 3.3.1 Isolation von miRNA

Die Isolation erfolgt mittels des miRNAeasy Kits (Quiagen GmbH, Hilden). Für jede zu extrahierende Gewebeprobe wird jeweils ein Falcon mit 700µl Qiazol (Corning, Kaiserslautern) befüllt. Anschließend wird ca. ein erbsengroßes Stück der bei -80°C gefrorenen Gewebeprobe abgeschnitten und das Tumorstück in den Falcon gegeben. Das Tumorstück wird mit Hilfe eines Ultraturrax (Ika, Staufen im Breisgau) homogenisiert. Das Homogenisat wird bei RT 5min inkubiert. Anschließend wird 140µl Chloroform (Fisher Scientific, Schwerte) je Falcon hinzugegeben und der Falcon für 15sec gevortext. Danach wird das Homogenisat erneut für 2min bei RT inkubiert. Dann werden die Falcons für 15min in eine Kühlzentrifuge (Sigma3-16PK, Tuttlingen) mit 12000xg bei 4°C zentrifugiert. Die Eppendorfgefäße werden mit 600µl Ethanol befüllt. Nach Beendigung der Zentrifugation werden 160µl des wässrigen Überstandes der einzelnen Proben abpipettiert und in die jeweiligen Eppendorfgefäße pipettiert. Der Überstand wird mit dem Ethanol durchmischt. Nun werden 700µl dieser Suspension in die RNeasy Mini Säulen (Quiagen GmbH, Hilden) pipettiert. Die RNeasy Mini Eppendorfgefäße werden anschließend bei <8000xg für 15sec bei RT zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Zugabe von 700µl Buffer RWT in die RNeasy Pipetten und ebenfalls Zentrifugation bei <8000xg für 15sec bei RT. Der Durchfluss wird ebenfalls verworfen. Des Weiteren wird 500µl Buffer RPE hinzugegeben und ebenfalls 15sec bei <8000gx zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Schließlich wird mit 500µl Buffer RPE für 2min bei 8000xg zentrifugiert. Weiterhin wird die RNeasy Minisäule des Eppendorfgefäßes in ein neues Eppendorfgefäß gesteckt. Anschließend werden 40µl RNase freies Wasser auf die RNeasy Minisäulenmembran gegeben. Es wird erneut bei 8000xg für 1min zentrifugiert. Anschließend wird dies mit 30µl RNase freiem Wasser (Quiagen GmbH, Hilden) wiederholt. Die gewonnenen Stocklösungen werden aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

### 3.3.2 MiRNA Analyse

Zunächst wird von der zu messenden Probe eine Arbeitsverdünnung hergestellt. Dazu werden die Isolationskonzentrationen der Stocklösung mit dem NanoDrop (NanoDrop Technologies 7513, USA) gemessen. Die Proben werden auf eine Arbeitskonzentration von 20ng/μl RNA verdünnt.

### 3.3.3 Reverse Transkription (RT)

Die RT ist ein Enzym welches die miRNA in ihre komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umschreibt. Dies dient der Vorbereitung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), und damit der Amplifizierung einzelner DNA-Abschnitte. Für die PCR muss daher zunächst die RNA in DNA umgeschrieben werden, um dann mit Hilfe von spezifischen Primern entsprechende DNA-Abschnitte vervielfältigen zu können.

Die benötigten Reagenzien (RT-Primer, PCR-grade H<sub>2</sub>O, dNTPs, RT-Puffer und RNase Inhibitor) (Tabelle 13) (TaqMan MicroRNA Reverse Transkription Kit, Applied Biosystems™, Kufe Technologies, Darmstadt) werden auf Eis aufgetaut und ein entsprechender Mastermix nach folgender Zusammensetzung pipettiert:

Tabelle 13) Reagenzien zur Herstellung des Mastermix für die RT

Reagenzien	Reaktionsansatz
dnTPs	0,15μl
RT-Puffer	1,5μl
RNase Inhibitor	0,19μl
PCR-grade H <sub>2</sub> O	4,16μl
Reverse Transkriptase	1μl

Für die RT werden 7μl Mastermix zusammen mit 5μl der verdünnten Tumorprobe und 3μl des jeweils verwendeten Primers (miRNA-181a2 oder RNU 48) in die Mini-Eppendorfgefäße pipettiert.

Nach erfolgtem Pipettieren werden alle Mini-Eppendorfgefäße verschlossen, invertiert und zentrifugiert. Die RT erfolgt im Thermocycler (Biozym Diagnostik GmbH PTC-200, Oldendorf) nach folgendem Programm (Tabelle 14):

Tabelle 14) Einzelne Programmierungsschritte des Thermocycler für die RT

Temperatur	Zeiteinheiten
16°C	30min
42°C	30min
85°C	5min
4°C	Bis zur Entnahme der Proben

Mit der gewonnenen cDNA erfolgt im nächsten Schritt die Analyse mit Hilfe der quantitativen-Realtime Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR).

### 3.3.4 QRT-PCR

#### 3.3.4.1 MiRNA-181a2

Die qRT-PCR stellt eine Variante der PCR und der damit verbundenen Vervielfältigung von DNA-Sequenzen dar. Die Emission der Fluoreszenzfarbstoffe steigt proportional zum Anstieg der Menge des vorhandenen Amplifikationsprodukts an. Hierzu werden spezifische Sonden benötigt. Bei den verwendeten TaqMan-Sonden wird das Verfahren der Förster resonance energy transfer (FRET) genutzt.

Die an der DNA-bindende Sonde besitzt an einem Ende einen Quencher (Akzeptor) und an ihrem anderen Ende einen Reporter (Donor). Nimmt der Abstand zwischen dem Akzeptor und dem Donor durch den PCR-Zyklus und den dadurch entstehenden Abbau der Sonde zu, steigt das Fluoreszenzsignal.

Für diesen Versuchsschritt werden TM-Primer (MicroRNA-Assays, Applied Biosystems), Mastermix (Applied Biosystems) und Wasser benötigt. Alle diese Materialien werden auf Eis aufgetaut.

Die beiden TM-Primer RNU 48 (Applied Biosystems TaqMan MicroRNA Assays ID: P02928564) und miRNA-181a2 (Applied Biosystems TaqMan MicroRNA Assays ID: P01077061) werden invertiert und zentrifugiert. Für jede miRNA wird in den großen Eppendorfpipetten ein Mastermix angesetzt (Tabelle 15).

Tabelle 15) Reagenzien für den Mastermix der qRT-PCR

Reagenzien	1miRNA/1 Probe
TM-Primer	0,5µl
Mastermix	5µl
H2O	3,5µl

Für das Pipettieren wird ein individuelles Pipettierschema für die 96-Well-Platte (MicroAmp Fast 96 Well Reaction Plate 0,1ml, Applied Biosystems) (Tabelle 16) benötigt. Hierbei ist zu beachten, dass pro Tumorprobe und pro Primer Triplikate pipettiert werden müssen, um anschließend die Ergebnisse auswerten zu können. Aus den drei Einzelmessungen der Triplikate wird ein Cycle threshold Mittelwert (CT-Mittelwert) gebildet und dieser nur als valide erachtet, wenn er innerhalb einer 0,16 Zyklen Standardabweichung liegt (54), (55). Weiterhin müssen sechs Wells für die Negativkontrolle (Wasser) bereitgestellt werden. Sechs Felder werden nach dem verwendeten Pipettierschema nicht belegt.

Tabelle 16) Pipettierschema für die 96 Well Platte der qRT-PCR. Jede Tumorprobe (beschriftet mit P und der jeweiligen Ziffer) wird gemeinsam mit dem Mastermix RNU 48 in die Felder A1-H3 und A7-H9 pipettiert. Entsprechend werden die Proben und der Mastermix für die miRNA-181a2 in die Wells A4-H6 pipettiert. Als Negativkontrolle werden jeweils 3 Proben Wasser (H2O) pro Primer verwendet. Für die RNU 48 in den Wells G7-9 und für die miRNA-181a2 in den Wells G10-12.

	RNU48			miRNA-181a2			RNU 48			miRNA-181a2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P9	P9	P9	P9	P9	P9
B	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P10	P10	P10	P10	P10	P10
C	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P11	P11	P11	P11	P11	P11
D	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P12	P12	P12	P12	P12	P12
E	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P13	P13	P13	P13	P13	P13
F	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P14	P14	P14	P14	P14	P14
G	P7	P7	P7	P7	P7	P7	P15	P15	P15	P15	P15	P15
H	P8	P8	P8	P8	P8	P8	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O

Für dieses Schema werden 9µl des jeweiligen Mastermix in die Wells auf Eis pipettiert. Anschließend wird die cDNA invertiert und gevortext. In die Triplikate wird nun 1µl der entsprechenden cDNA pipettiert.

Pro Primer muss für das Pipettierschema ein Triplett H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle eingeplant werden, dazu wird zu dem jeweils verwendeten Mastermix 1µl H<sub>2</sub>O pipettiert.

Die fertig pipettierte Platte wird mit einer speziellen Folie (MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems) bedeckt. Dann wird die Platte bei 1000 Umdrehungen 1min abzentrifugiert (Eppendorf 5804R, Hamburg), in das PCR-Gerät gestellt und der Versuch gestartet. Hierfür wird ein Thermocycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific StepOnePLUS, Singapore) verwendet.

#### 3.3.4.2 Analyse der Proteinexpression des IDH1-Gens

Für die Analyse der Proteinexpression des IDH1-Gens wird ebenfalls die qRT-PCR mit oben angegebenen Anwendungsschritten verwendet. Als Housekeeping-Gen und Referenz mRNA wird  $\beta$ -Actin (Applied Biosystems TaqMan MicroRNA Assays ID: Hs99999903\_m1) verwendet. Die IDH1 Expressionsmessung mit hierfür spezifischen mRNA Primern (Applied Biosystems TaqMan MicroRNA Assays ID: Hs01855675\_s1). Entsprechend Tabelle 16 wird ebenfalls ein Pipettierschema für die 96 Well Platte erstellt. Im Rahmen der IDH1 Proteinexpressionsanalyse werden 48 Proben der IDH1<sub>WT</sub> Gruppe ausgewertet. Der Einschluss weiterer Patienten der IDH1<sub>WT</sub> Gruppe ist aufgrund unzureichendem Probenmaterials der zuvor erfolgten miRNA-181a2 Messung nicht möglich.

#### 3.3.5 Auswertung qRT-PCR

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgt mit Amplifikationsplots (Abb.7). Hierbei wird die Fluoreszenz gegen die Zykluszahl aufgetragen. Die qRT-PCR verläuft in drei Phasen. Die erste Phase (Abb.7 Phase 1 schwarz) zeichnet sich durch geringes Ausgangsmaterial und entsprechend geringe Produktmenge aus. Diese Phase bildet die Baseline. In der zweiten Phase (Abb.7 Phase 2 blau) werden die Substrate langsam verbraucht. Ein exponentieller Anstieg der Produktmenge entsteht. In der letzten Phase (Abb.7 Phase 3 lila) sind die Substrate verbraucht. Es entsteht ein Plateau. Der Vergleich von zwei Proben erfolgt anhand ihres CT-Wertes (Abb.7  $\Delta$ CT rot). Ein geringer CT-Wert deutet prinzipiell auf eine höhere Konzentration in der Probe hin. Ein größerer, also auf dem Amplifikationsplot rechtsverschobener CT-Wert deutet auf eine geringere Konzentration des Templates hin.

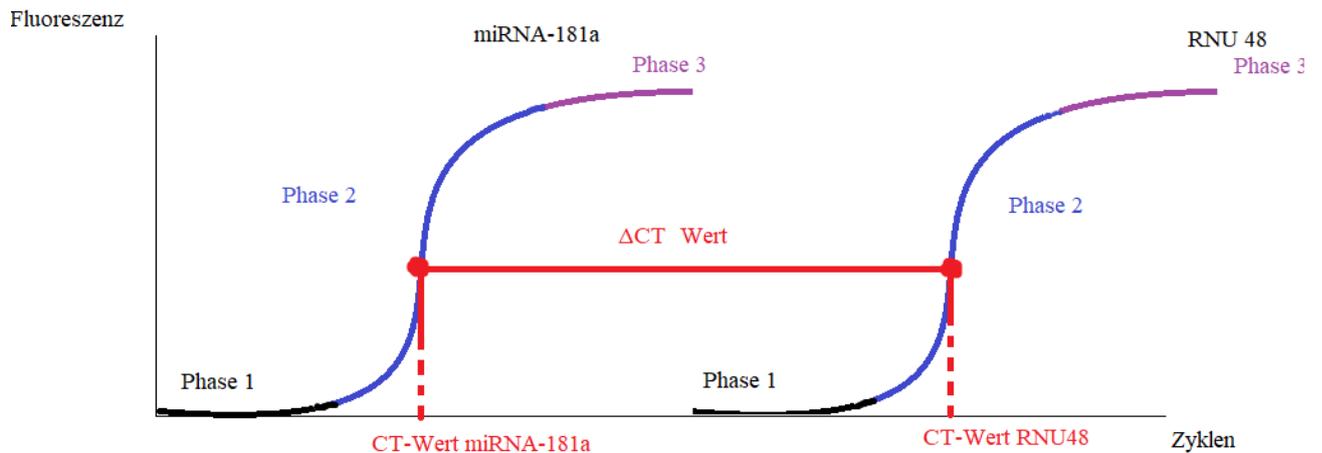


Abb.8) Exemplarischer Amplifikationsblot einer qRT-PCR. Die Zykluszahl wird gegen die Floreszenzen aufgetragen. Die Housekeeping RNU 48 wird mit der zu messenden miRNA-181a2 verglichen. Die Phasen 1-3 beschreiben die unterschiedlichen Abschnitte des Substratverbrauches. Der  $\Delta$ CT- Wert wird durch Substraktion der RNU 48 von der miRNA-181a2 berechnet.

Die Berechnung der Ausgangsmenge erfolgt unter Verwendung der SDS-Auswertsoftware (Sequence detection system, Applied Biosystems). Diese Software bestimmt die Basislinie und die CT-Werte. Um die Messergebnisse zu validieren, wird der ermittelte CT-Wert einer Probe von einem ubiquitär exprimierten Gen, dem Housekeeping-Gen, substrahiert und entsprechend normalisiert. In dieser Arbeit ist das Housekeeping-Gen die RNU48 bzw  $\beta$ -Actin. Das Housekeeping Gen stellt eine bekannte Größe dar, mit welcher die zu analysierende miRNA verglichen wird. Hierbei wird

$$\Delta Ct = CT_{miRNA-181a2} - CT_{RNU48}$$

Bzw.

$$\Delta Ct = CT_{IDH1} - CT_{\beta\text{-Actin}}$$

ermittelt (56). Als Maß für die Expression wird der sog. Fold Change (FC) ermittelt. Dieser errechnet sich folgendermaßen:

$$FC\text{-miRNA-181a2} = 2^{-\Delta Ct}$$

Bzw.

$$FC\text{-IDH1} = 2^{-\Delta Ct}$$

Dieser dient als Maß für die individuelle Expression der miRNA der jeweiligen Probe. Jede Messung erfolgt zum Fehlerausschluss dreifach als Triplikat.

### 3.3.6 MGMT

Die MGMT- Analyse und Ergebnisse werden aus Vorarbeiten mit dem gleichen Patientenkollektiv übernommen (57).

### 3.3.7 TCGA-Daten

Zur unabhängigen Validierung der vorliegenden Ergebnisse erfolgt eine „in silico“ Analyse anhand eines TCGA (The Cancer Genom Atlas) Datensatz. Hierfür wird ein Datensatz von 671 GBM Patienten aus der dortigen Datenbank mittels eines online Portals (<https://xenabrowser.net/>) geladen. Bei diesen Patienten wird das gesamte RNome mittels eines Microarrays Assays (Agilent Human miRNA\_8x15K) gemessen (TCGA, Tier 3 daten). Von diesen 671 Individuen erfüllt eine Untergruppe von 32 Patienten die Kriterien des primären GBM, der verfügbaren miRNA-181a2-Expressionsdaten, eines IDH1wt sowie eines dokumentierten Therapieprotokolls entsprechend den Patienten in der vorliegenden Arbeit. Alle Patienten in dieser Untergruppe erhielten gleichzeitig eine Radio-Chemotherapie mit Temozolomid. Es erfolgt an den 32 Patienten der TCGA Kohorte eine Kaplan-Meier-Überlebensanalyse. Hierfür wird die TCGA Kohorte (32 Patienten) am Schwellenwert der medianen miRNA-181a2 Expression dichotomisiert und in Patienten mit hoher ( $\geq$  Median, 16 Patienten) und niedriger ( $<$ Median, 16 Patienten) miRNA-181a2 Expression unterteilt.

### 3.4 Statistische Verfahren:

Für die statistische Auswertung wird das Programm SPSS (BM SPSS Statistics 25) verwendet. Der Tumorsektionsumfang wird mittels postoperativem MRT beurteilt. Ein Progress der Erkrankung wird definiert durch eine neue kontrastmittelaffine Raumforderung im MRT, einem Abfall des Karnofsky-Index um 30 Punkte oder durch das Versterben des Patienten (58). Die quantitativen Merkmale werden mit Hilfe von Lagemaßen (Median, Mittelwert) und Streumaßen (Standardabweichung) berechnet und mit einem Box-Blot oder einem Histogramm skizziert. Für die Abhängigkeit einzelner Messwerte zu einer Variablen wird die lineare Regressionsanalyse herangezogen. Vergleiche von quantitativen nominal verteilten Größen werden mit dem unverbundenen t-Test berechnet. Für den Vergleich von zwei unverbundenen Gruppen mit qualitativen Merkmalen wird der Chi-Quadrat-Test verwendet. Die Überlebenszeitanalyse wird mit dem Verfahren der Cox-Regression als auch der linearen Regression analysiert. Zur besseren grafischen Darstellung erfolgt zusätzlich die Auswertung mit Hilfe der Kaplan-Meier-Kurve. Die Expressionswerte der miRNA-181a2 werden hierfür am statistischen Mittel dichotomisiert. Für alle statistischen Verfahren wird ein Signifikanzniveau von  $\alpha < 0,05$  (5%) festgelegt.

## 4.0 Ergebnisse

### 4.1 Deskriptive Statistik des Kollektivs

Es werden zunächst die Charakteristika des Kollektivs deskriptiv dargestellt. Es wurden 74 Patienten eingeschlossen.

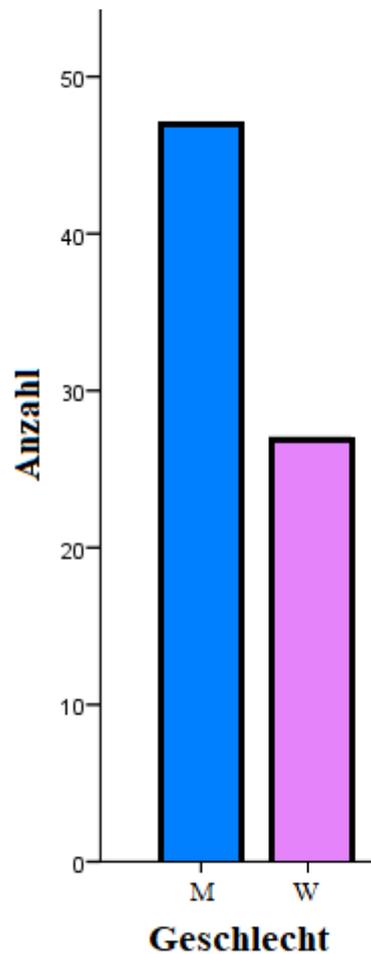


Abb. 9) Balkendiagramm. Geschlechterverteilung der eingeschlossenen Patienten der Studie. „M“ verdeutlicht das männliche Geschlecht, „W“ das weibliche.

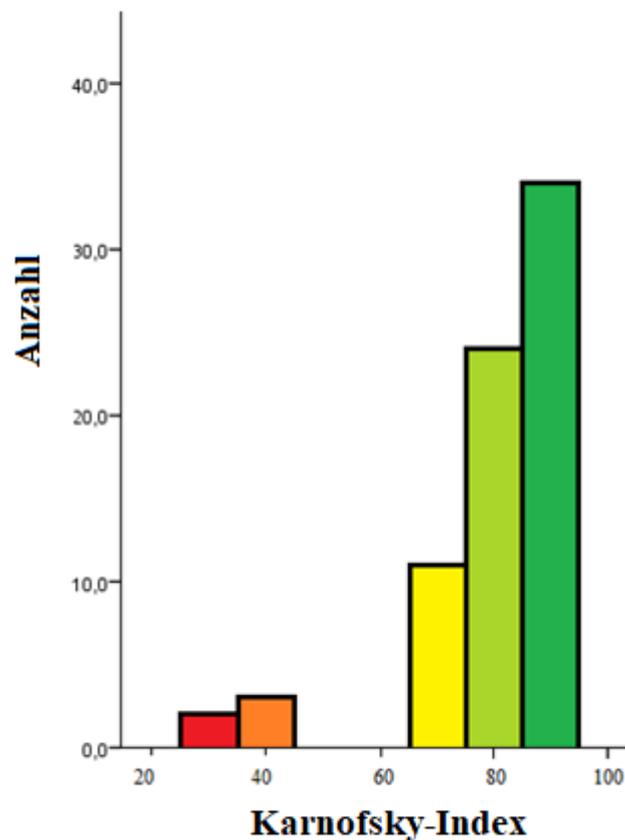


Abb. 10) Balkendiagramm; Karnofsky-Index  
Einschätzung der Alltagsfähigkeit der Patienten. 100 = keine Einschränkung; 0 = Tod.  
rot = 30; orange = 40; gelb = 70;  
hellgrün = 80; grün = 90

Die Studie inkludiert 47 (63,5%) Männer und 27 (36,5%) Frauen (Abb. 9). Im Durchschnitt liegt das Erkrankungsalter bei Erstdiagnose (ED) bei  $59,01 \pm 11,45$  Jahren [35,68 - 83,02] (Abb.11). Das Alter

bei ED zeigt einen signifikanten Zusammenhang mit dem Overall Survival (OS) in Monaten ( $p = 0,001$ ). Patienten mit einem höheren Lebensalter weisen ein kürzeres OS auf als jüngere Patienten (Abb.11).

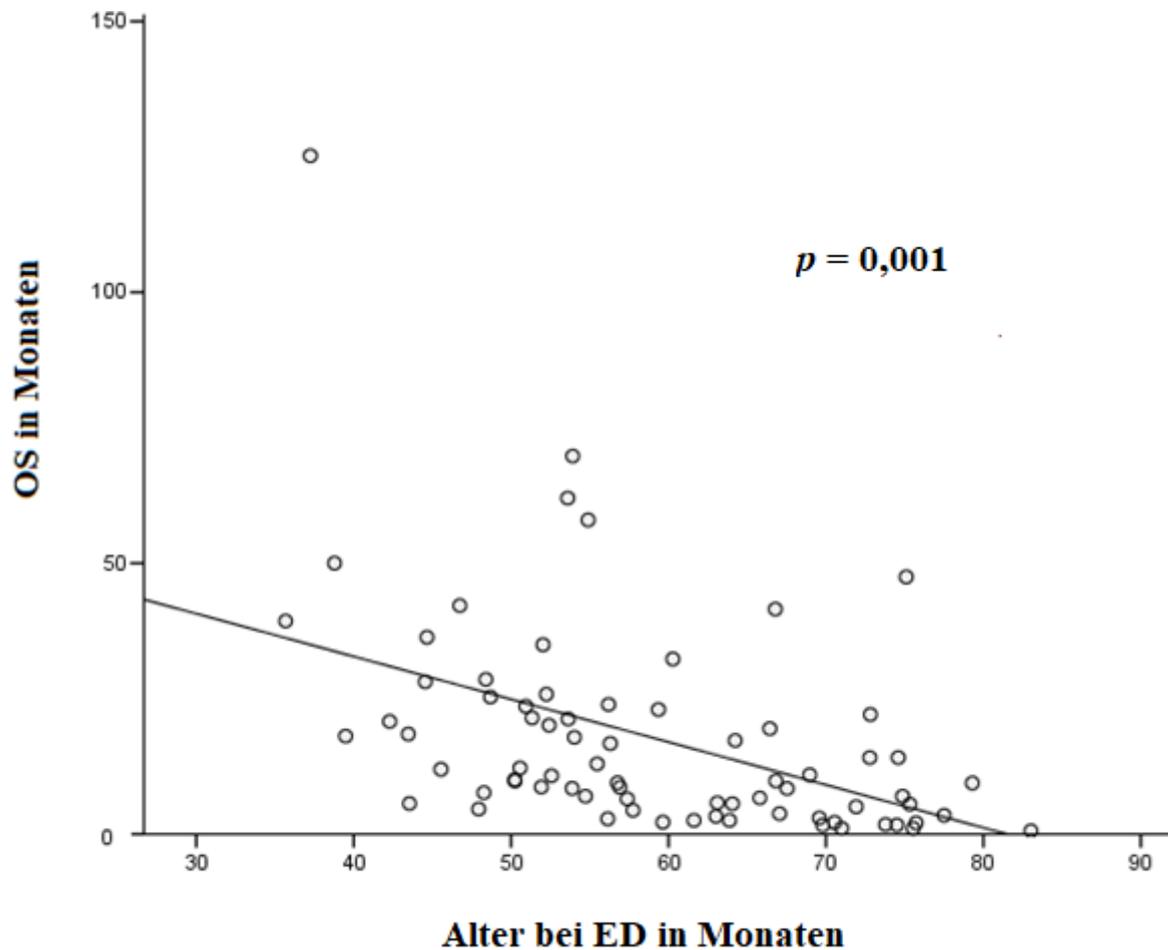


Abb.11) Alter bei ED in Monaten in Bezug auf das OS in Monaten.

Zum Abschluss der Studie sind bereits 72 Patienten (97,6%) verstorben, lediglich zwei Patienten (2,7%) sind noch am Leben. Der Progress tritt nach  $9,57 \pm 11,17$  [0,00 - 57,99] Monaten ein. Das Gesamtüberleben liegt im Durchschnitt bei  $17,68 \pm 19,99$  [0,62 - 125,21] Monaten.

Die Beurteilung des Allgemeinzustandes erfolgt anhand des Karnofsky-Index. Es werden zwei Patienten (2,7%) mit dem Karnofsky-Index 30 eingestuft. Den Karnofsky-Index 40 erhalten drei Patienten (4,1%). Eine bessere Alltagsfähigkeit haben elf Patienten (14,9%) mit dem Wert 70. Unter den Studienteilnehmern erhalten 24 Patienten (32,4%) den Wert 80. Eine nur geringe Einschränkung haben 34 Patienten (45,9%) mit dem Karnofsky-Index 90 (Abb. 10) Ein höherer Karnofsky-Index ist signifikant mit einem längeren OS assoziiert ( $p = 0,019$ ).

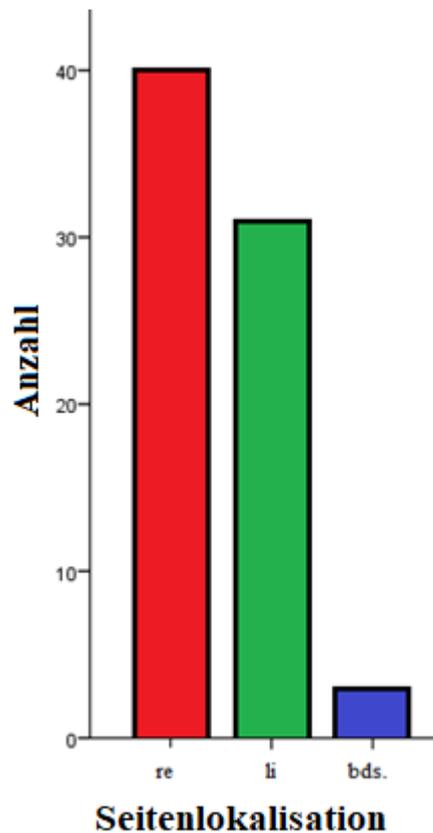


Abb.12) Balkendiagramm Seitenlokalisation des GBM; re = rechte Hemisphäre; li = linke Hemisphäre; bds = Bisphärisch

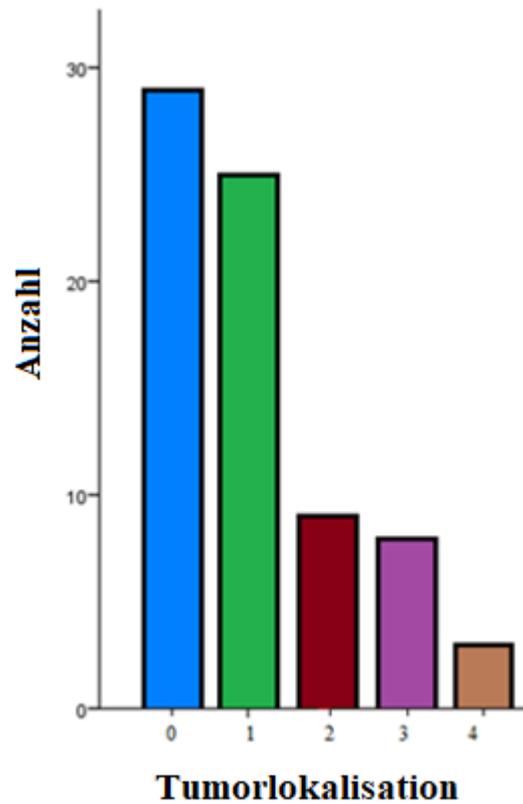


Abb. 13) Balkendiagramm Tumorlokalisation des GBM;  
 0 (blau) = Frontallappen; 1 (grün) = Temporallappe;  
 2 (rot) = Parietallappen; 3 (lila) = Occipitallappen,  
 4 (braun) = Mesencephalon oder Stammganglien

Das GBM tritt bei 40 Patienten (54,1%) im Bereich der rechten Hemisphäre auf. Bei 31 Patienten (41,9%) tritt das GBM im Bereich der linken Hemisphäre auf. Nur drei Patienten (4,1%) weisen das GBM in beiden Hemisphären auf (Abb. 12).

Bei Betrachtung der Tumorlokalisation des GBM wird deutlich, dass das GBM am häufigsten im Frontalkortex (0) auftritt. Von den Patienten weisen dies 29 Patienten (39,2%) auf. Die zweithäufigste Verteilung des GBM ist im Temporallappen (1), 25 Patienten (33,8%) weisen diese Lokalisation auf. Eher seltener tritt das GBM im Parietallappen (2) auf. Von den Patienten zeigen diese Lokalisation neun (12,2%). Bei acht Patienten (10,8%) tritt das GBM im Occipitallappen (3) auf. Lediglich drei Patienten (4,1%) weisen das GBM im Mesencephalon oder Stammhirn auf (4) (Abb. 13).

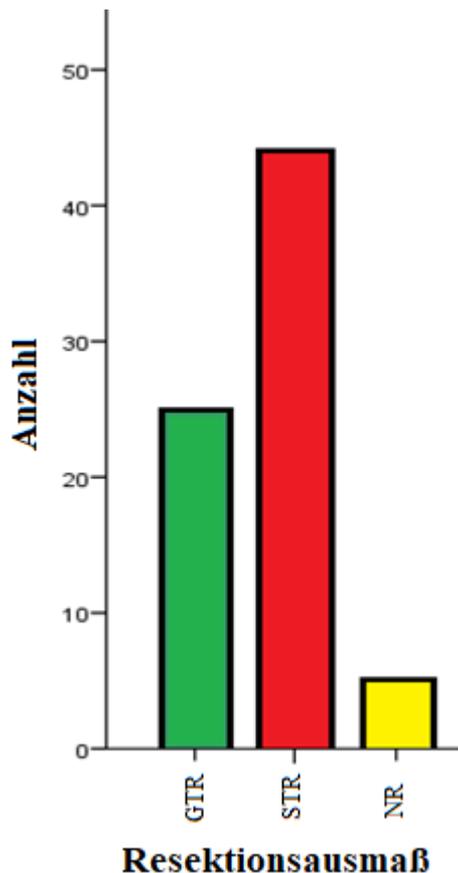


Abb.14) Balkendiagramm zur Darstellung der Anzahl von Patienten mit Tumorresektion (GTR) = grün und bei Patienten mit (STR) = rot Resektion, sowie bei Patienten mit nicht bestimmtem Resektionsausmaß (NR) = gelb.

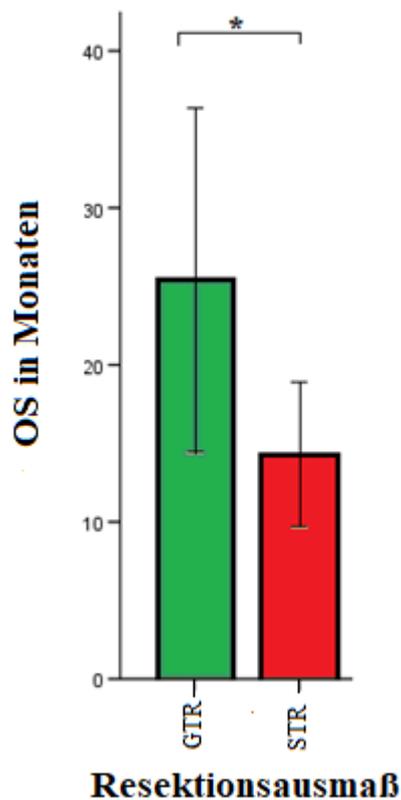


Abb.15) Balkendiagramm; Resektionsausmaß in Bezug auf das OS in Monaten. GTR = grün; STR = rot

Bei 25 Patienten (33,8%) ist eine Resektion möglich (GTR). Bei 44 Patienten (59,5%) ist aufgrund der Lokalisation des Tumors in einem eloquenten Areal die operative Entfernung nur bedingt, im Sinne einer Sub Total Resektion (STR) möglich. Bei 5 Patienten konnte, mangels entsprechender Bildgebung, kein postoperativer Resektionsumfang ermittelt werden (NR) (Abb.14).

Es zeigt sich ein statistischer Zusammenhang ( $p = 0,03$ ) zwischen dem Resektionsausmaß und dem OS. Patienten mit GTR weisen ein längeres OS als Patienten mit STR auf. Patienten mit nicht bestimmtem Resektionsausmaß werden nicht in der Graphik dargestellt (Abb.15).

Es zeigt sich eine Signifikanz ( $p = 0,001$ ) bei Betrachtung des PFS im Vergleich zum OS. Patienten mit einem frühen Progress sterben früher als Patienten mit einem späteren Progress (Abb.16).

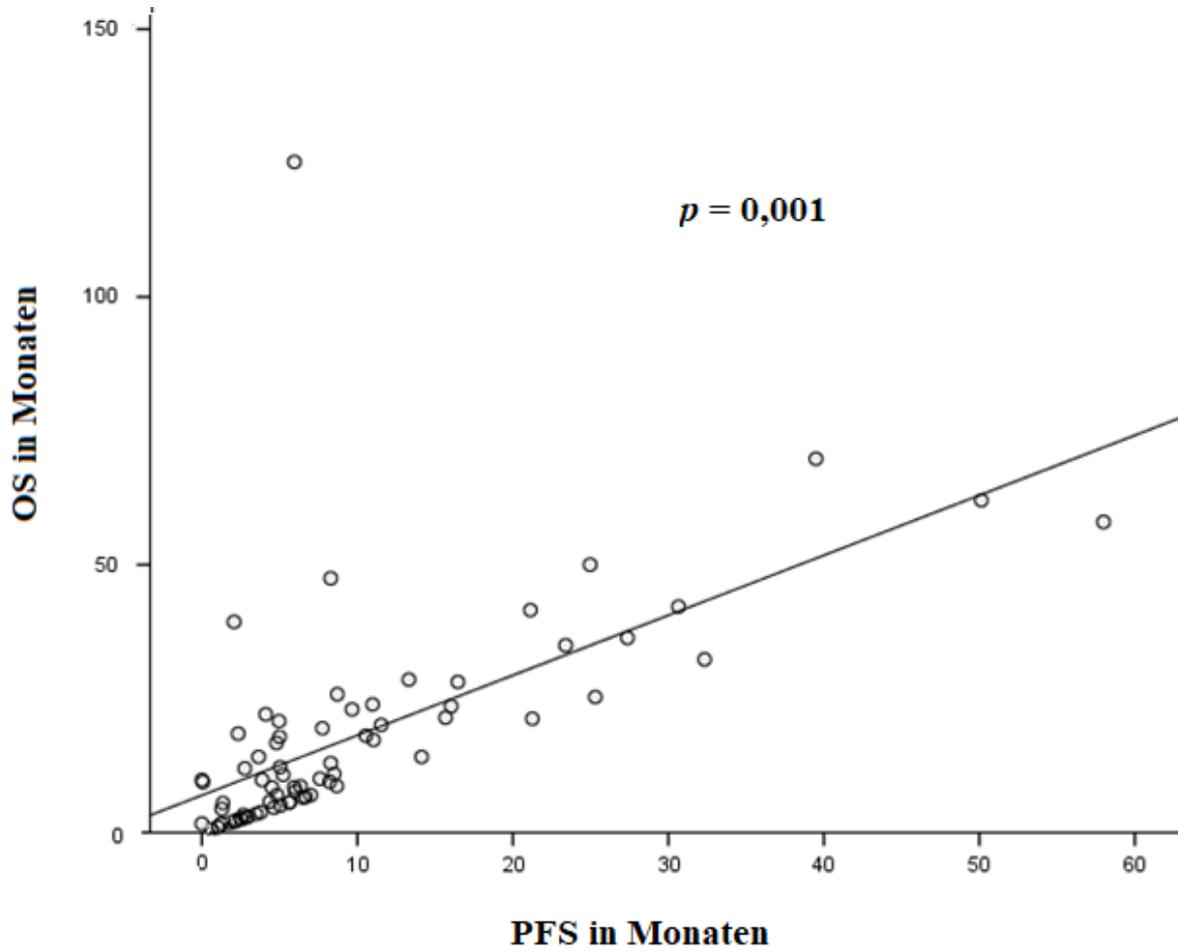


Abb.16) Cox-Regression; Progressionsfreies Überleben (PFS) in Bezug auf das Gesamtüberleben.

## 4.2 MGMT- Status

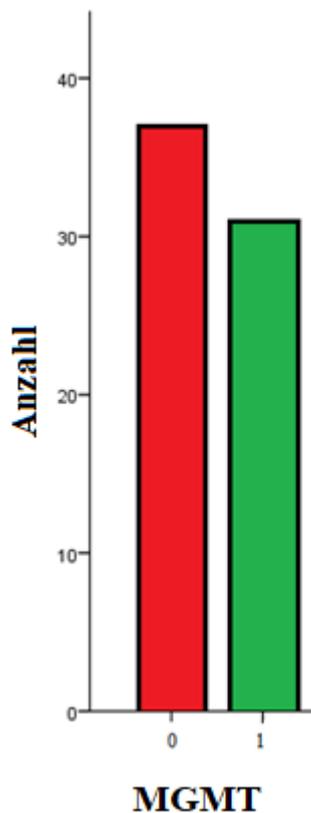


Abb.17) Balkendiagramm MGMT-Status;  
0 (rot) = keine MGMT-Gen-Promoter-Methylierung;  
1 (grün) = MGMT-Gen-Promoter-Methylierung

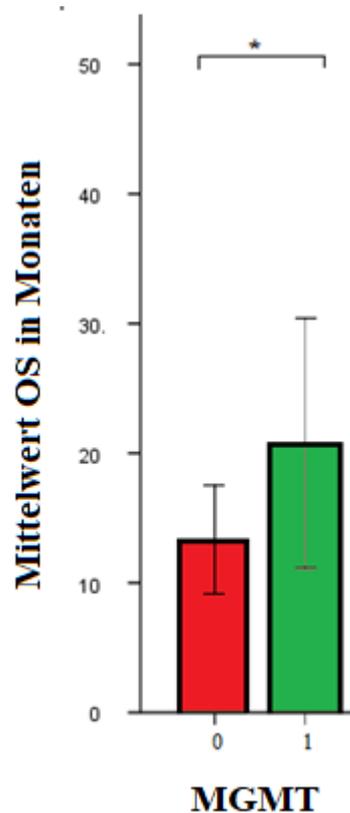


Abb.18) Balkendiagramm Expressierung der MGMT-Gen-Promoter-Methylierung in Abhängigkeit des OS;  
0 (rot) = MGMT-Gen-Promoter-Methylierung nicht vorhanden  
1 (grün) = MGMT-Gen-Promoter Methylierung

Die folgenden Daten zur MGMT-Methylierung werden aus Vorpublikationen am gleichen Kollektiv entnommen (25). Von den eingeschlossenen Patienten weisen 37/74 (50%) eine MGMT-Gen-Promoter Methylierung auf, 31/74 (41,9%) zeigen diese Methylierung nicht. Insgesamt sind bei 6/74 (8,1%) Patienten die MGMT-Gen Promoter-Methylierung Bestimmung nicht möglich. Diese sind in der Grafik nicht dargestellt (Abb.17).

Es zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,001$ ) in Bezug auf das OS bei Patienten mit einer MGMT-Gen-Promoter-Methylierung. Patienten mit dieser Methylierung weisen im Durchschnitt eine Gesamtüberlebensdauer von  $20,76 \pm 26,26$  [0,62 - 125,21] Monaten auf. Im Falle eines Progresses tritt dieser im Mittel nach  $10,99 \pm 13,05$  [0,00 - 57,99] Monaten ein. Patienten ohne diese MGMT-Gen-Promoter-Methylierung haben eine mittlere Gesamtüberlebensdauer von  $13,33 \pm 12,55$  [1,71 - 62,03]

Monaten (Abb.18). Der Progress tritt bei diesen Patienten durchschnittlich nach  $7,83 \pm 8,88$  [1,25 - 50,14] Monaten auf.

#### 4.3 IDH1 Status

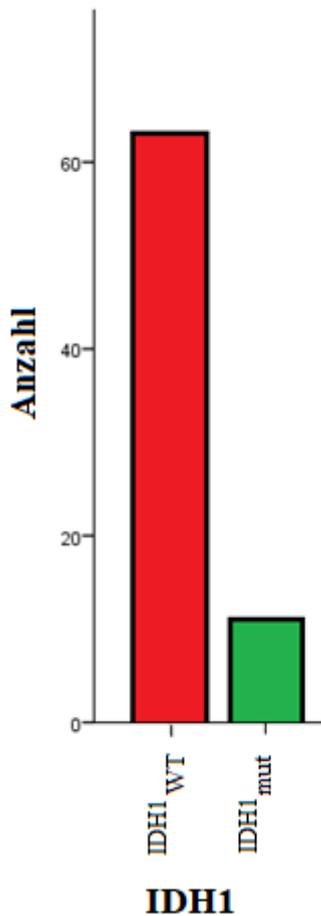


Abb.19) Häufigkeitsverteilung des Vorhandenseins der IDH1.  
IDH1<sub>WT</sub> = rot; IDH1<sub>mut</sub> = grün

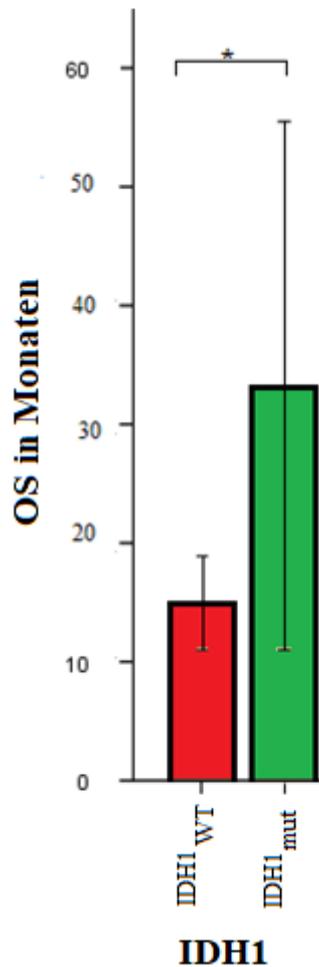


Abb.20) Gesamtüberleben in Monaten bei Patienten mit IDH1<sub>mut</sub>, im Vergleich zu Patienten mit IDH1<sub>WT</sub>. IDH1<sub>WT</sub> = rot  
IDH1<sub>mut</sub> = grün

Des Weiteren wurden die Patienten mit Hilfe der Immunhistologie auf das Vorhandensein der IDH1<sub>mut</sub> untersucht. Von den eingeschlossenen Patienten weisen elf Patienten (14,9%) eine IDH1<sub>mut</sub> auf, 63 Patienten (85,1%) exprimieren den IDH1<sub>WT</sub>. Patienten mit IDH1<sub>mut</sub> haben eine signifikant ( $p = 0,04$ ) verlängerte Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zu Patienten mit IDH1<sub>WT</sub> (Abb.19).

Im Falle einer IDH1<sub>mut</sub> liegt das OS bei  $33,25 \pm 33,12$  [5,65 - 125,21] Monaten. Beim IDH<sub>WT</sub> liegt das OS bei  $14,96 \pm 15,59$  [0,62 - 69,78] Monaten. Im Falle eines Progresses tritt dieser bei Patienten mit IDH1<sub>mut</sub> nach  $11,17 \pm 10,08$  [0,07 - 32,33] Monaten auf. Bei Patienten mit IDH1<sub>WT</sub> tritt ein Progress nach  $9,29 \pm 11,40$  [0,00 - 57,99] Monaten auf (Abb. 20).

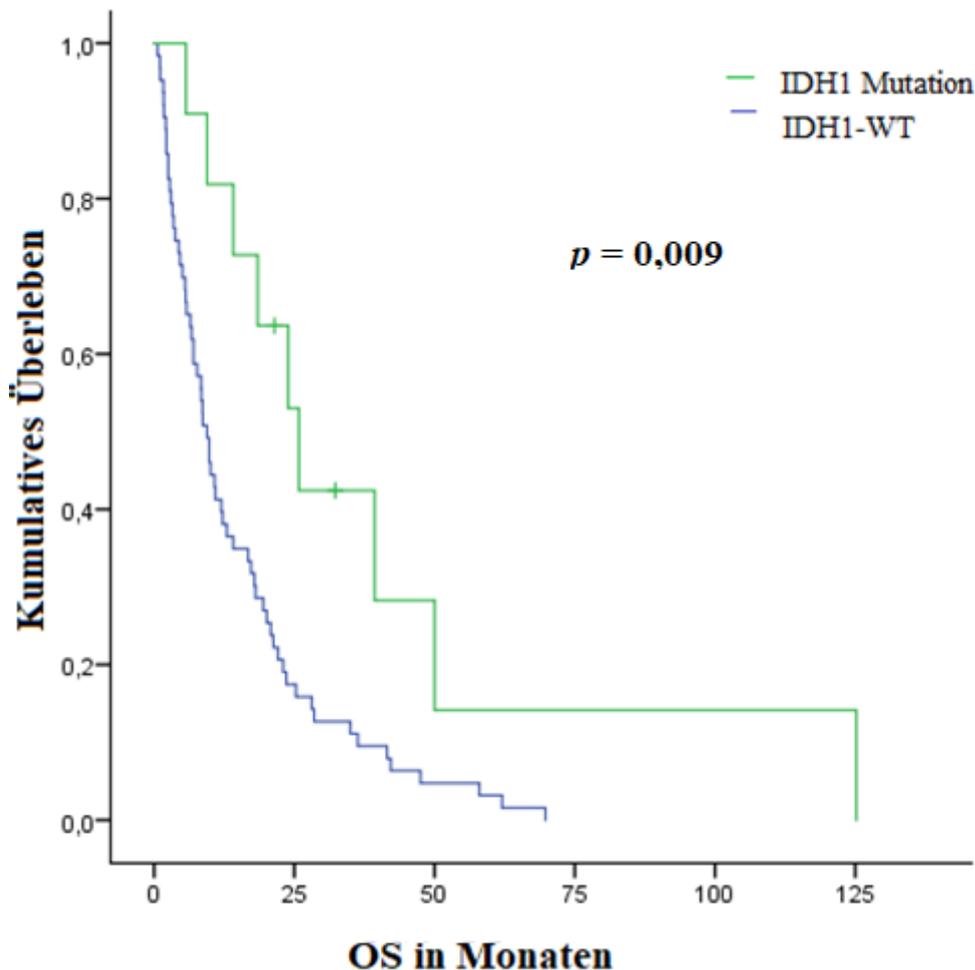


Abb.21) Kaplan-Meier Kurve des OS bei IDH1<sub>mut</sub> im Vergleich zum IDH1<sub>WT</sub>

Wird die Mutation der IDH1 im Vergleich zum OS betrachtet, zeigt sich eine hohe Signifikanz ( $p = 0,009$ ) im Log Rank der Kaplan-Meier Kurve. Patienten, die eine IDH1<sub>mut</sub> aufweisen leben länger als Patienten mit IDH1<sub>WT</sub> (Abb.21).

#### 4.4) Korrelation zwischen IDH1 Mutationsstatus und miRNA-181a2

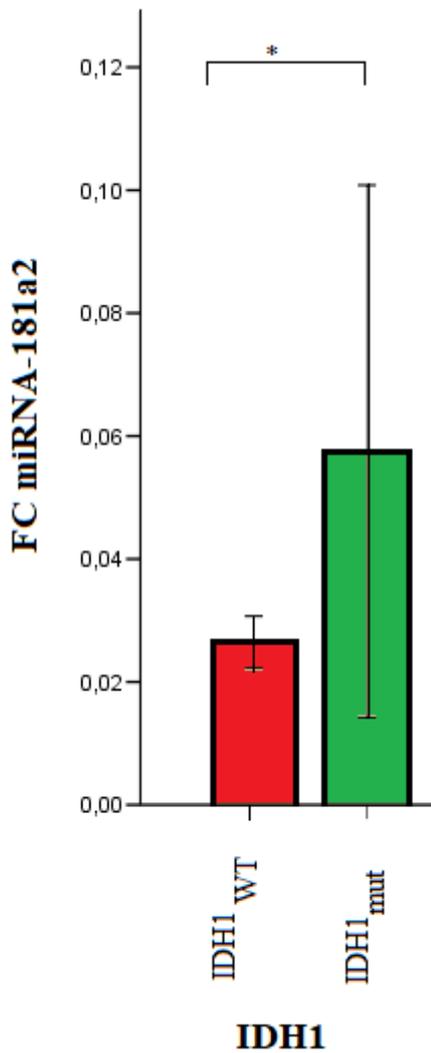


Abb.22) Balkendiagramm; Korrelation zwischen IDH1 Mutationsstatus und miRNA-181a2. IDH1<sub>WT</sub> = rot; IDH1<sub>mut</sub> = grün

Es zeigt sich eine Korrelation zwischen dem IDH1-Mutationsstatus und der Expression der miRNA-181a2 beim GBM. Patienten mit IDH1<sub>WT</sub> exprimieren die miRNA-181a2 gemessen am FC im Mittel von  $0,02648 \pm 0,0168$  [0,0021 - 0,07406]. Patienten mit IDH1<sub>mut</sub> exprimieren die miRNA-181a2 gemessen am FC im Mittel von  $0,0575 \pm 0,0645$  [0,0093 - 0,241]. Tumore mit einer IDH1<sub>mut</sub> zeigen eine signifikant höhere Expression der miRNA-181a2 als IDH1<sub>WT</sub> Tumore ( $p = 0,001$ ; Abb.22).

#### 4.5) MiRNA-181a2 und Proteinexpression des IDH1-Gens

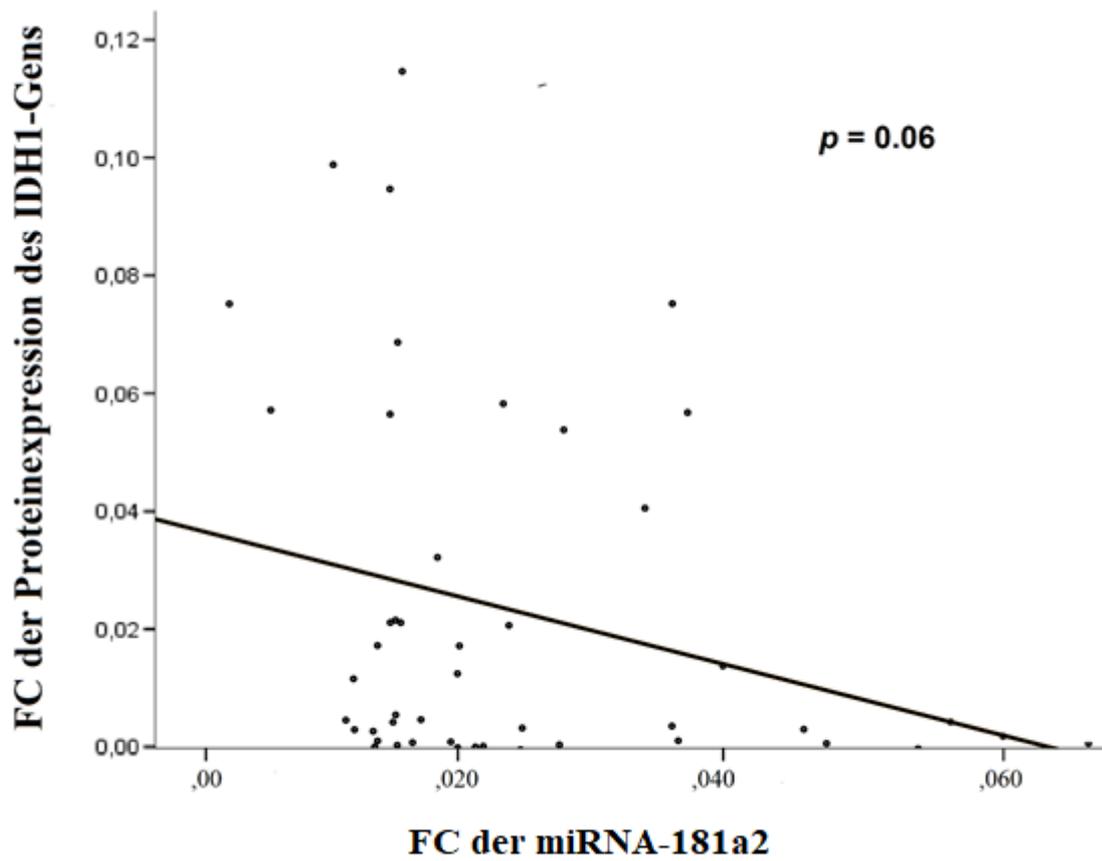


Abb.23) Cox-Regression; FC miRNA-181a2 in Bezug auf den FC der Protein-Expression des IDH1-Gens.

Bei den 48 untersuchten Patienten beträgt der FC der mRNA der IDH1-Expression im Mittel  $0,234 \pm 0,309$  [0,0002 – 1,12]. In der linearen Regression zeigt sich auf Trendniveau eine inverse Korrelation zwischen miRNA-181a2 und Protein-Expression des IDH1-Gens ( $p = 0,06$ ) (Abb.23). Die miRNA-181a2 zeigt sich als ein von der IDH1 mRNA unabhängiger Prädiktor des OS.

#### 4.6) MiRNA-181a2 im Gesamtkollektiv

Die Expression der miRNA-181a2 der Patienten des Gesamtkollektivs ( $n = 74$ ) wurde mit den klinischen Charakteristika (OS; PFS) korreliert. Der Mittelwert der miRNA-181a2 Expression beträgt  $FC = 0,310 \pm 0,305$  [0,002 - 0,03]. Die Expression der miRNA-181a2 korreliert nicht mit dem OS ( $p = 0,575$ ) im Gesamtkollektiv. Ebenso zeigt sich kein statistischer Zusammenhang mit dem PFS der Patienten ( $p = 0,615$ ) im Gesamtkollektiv. Da in Bezug auf das Gesamtkollektiv kein Zusammenhang zwischen der miRNA-181a2 und den Überlebensdaten besteht, wird eine Subgruppenanalyse durchgeführt.

#### 4.7) MiRNA-181a2 Subgruppenanalyse

##### 4.7.1 Bei IDH1<sub>WT</sub>

##### 4.7.1.1 Analyse des OS

Von den untersuchten Patienten exprimieren 63/74 den IDH1<sub>WT</sub>. Bei diesen Patienten beträgt der FC der miRNA-181a2 Expression im Mittel  $0,0265 \pm 0,0168$  [0,0021 - 0,0740]. In der linearen Regression zeigte sich eine signifikant inverse Korrelation zwischen miRNA-181a2 Expression und dem OS ( $p = 0,019$ ) (Abb.24).

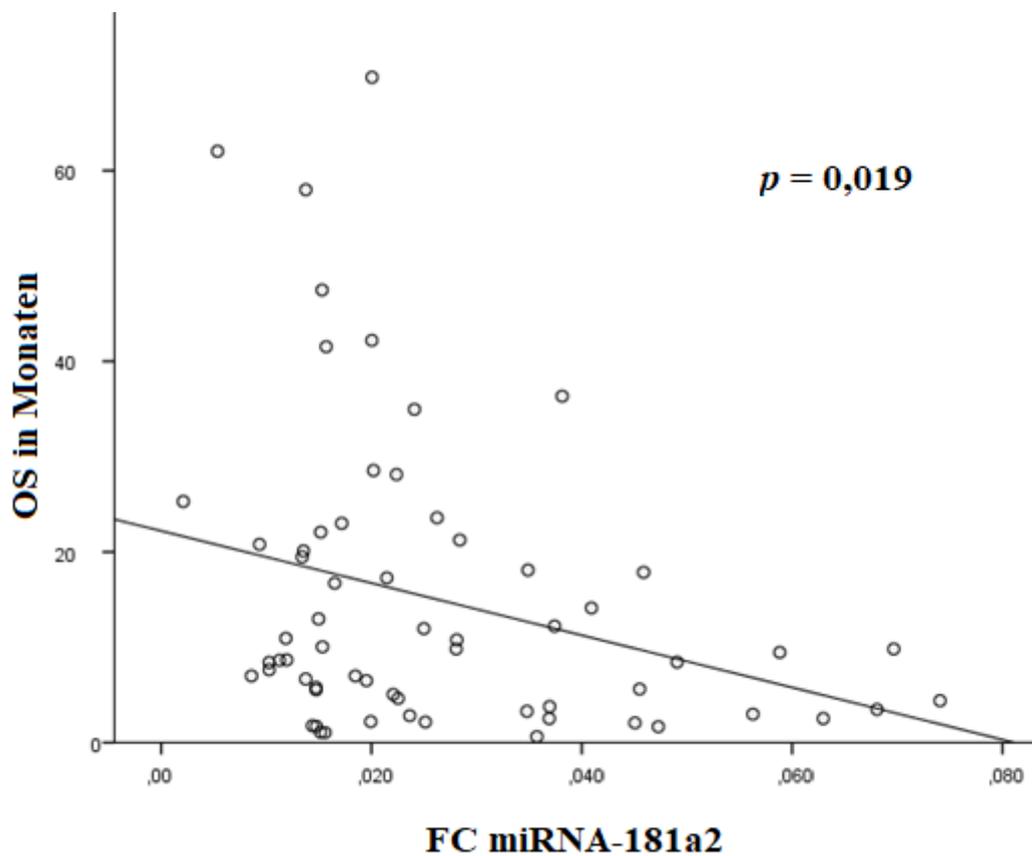


Abb. 24) Cox-Regression; FC miRNA-181a2 in Bezug auf das OS in Monaten.

Neben der in Abb.24 dargestellten linearen Regression zum Vergleich der Variablen OS und FC miRNA-181a2 erfolgt im nächsten Schritt die Analyse der zeitabhängigen Variablen mittels Cox-Regression. Hier zeigte sich ebenso ein signifikant verlängertes OS bei Patienten mit einer geringen Expression der miRNA-181a2: HR = 1,5; [95% CI: 1,63 - 12,8];  $p = 0,007$ .

Abschließend erfolgt zur besseren graphischen Darstellung das Plotten einer Kaplan-Meier-Kurve. Hierfür erfolgt eine Dichotomisierung des Kollektivs am mittleren Expressionswert der miRNA-181a2 (FC = 0,0265) bei Patienten mit einer hohen sowie einer geringen miRNA-181a2 Expression (Abb.25). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem niedrigen Expressionswert der miRNA-181a2 ein längeres OS aufweisen als Patienten mit einem hohen Expressionswert der miRNA-181a2 ( $p = 0,014$ ).

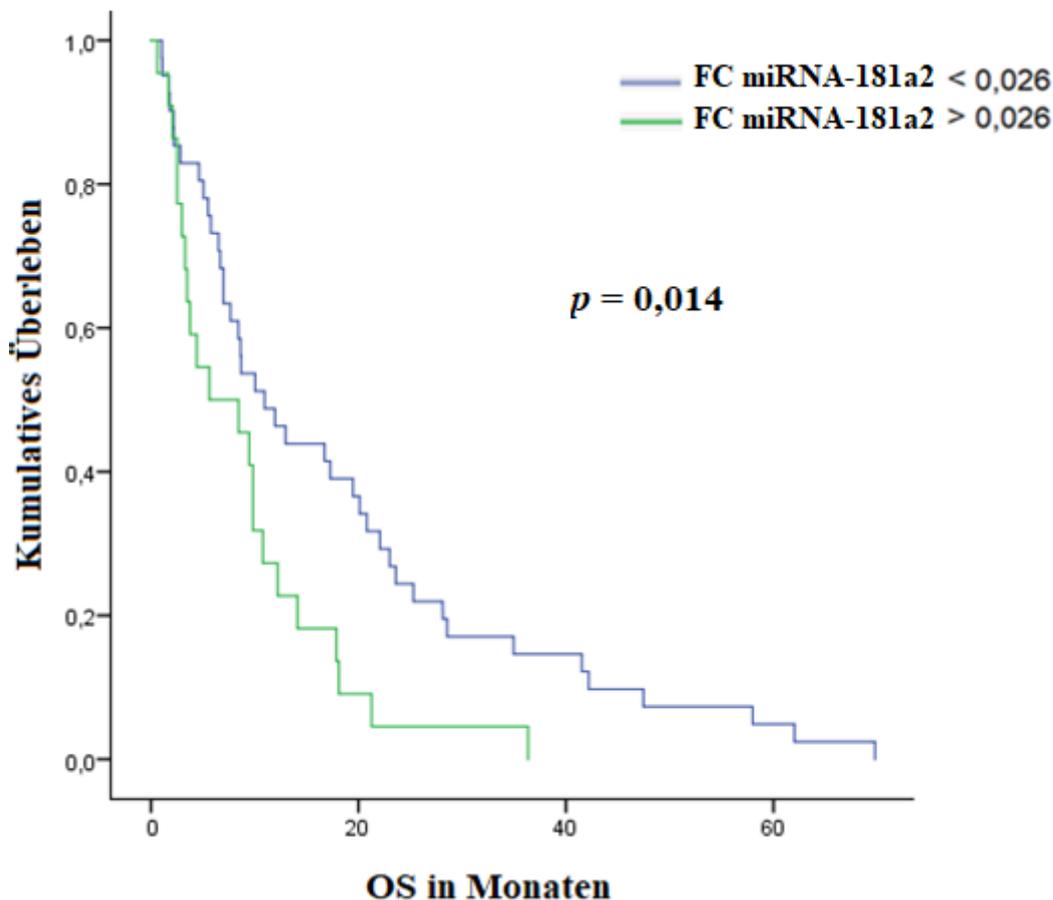


Abb.25) Kaplan-Meier Kurve; OS in Monaten mit geringer Expression der miRNA-181a2 = blau und hoher Expression der miRNA-181a2 = grün.

#### 4.7.1.2 Validierung mittels TCGA-Datensatz

Die unter 4.7.1.1. gefundene Korrelation zwischen dem Expressionslevel der miRNA-181a2 und dem Überleben wird anhand eines TCGA-Datensatzes validiert. Hier zeigt sich ebenso ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer niedrigen miRNA-181a2 Expression und dem OS ( $p = 0,021$ ) (Abb.26).

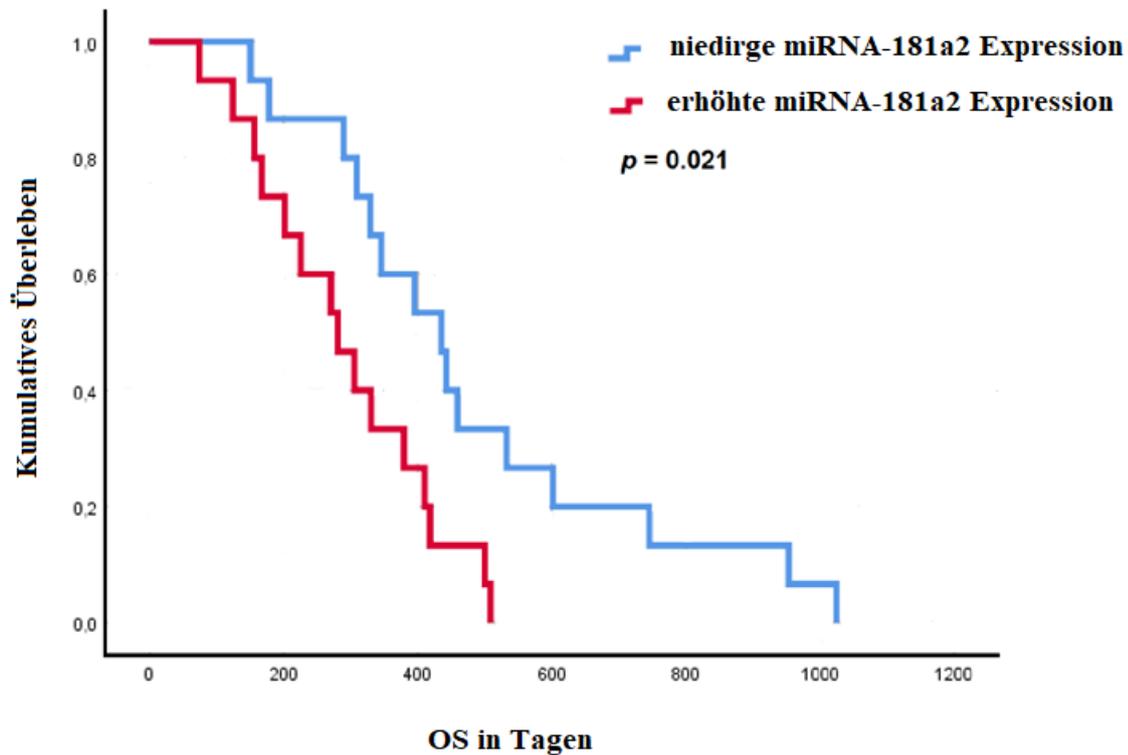


Abb. 26) Kaplan-Meier Kurve der Überlebensanalyse des TCGA-Datensatzes; Analyse mit 32 Patienten mit einem IDH1<sub>WT</sub> GBM. Die blaue Kurve repräsentiert Patienten mit einer niedrigen miRNA-181a2 Expression. Die rote Kurve repräsentiert Patienten mit einer erhöhten miRNA-181a2 Expression.

#### 4.7.1.3 Analyse des PFS

Sowohl beim OS zeigt sich in der linearen Regression eine signifikant inverse Korrelation zwischen miRNA-181a2 Expression als auch dem PFS ( $p = 0,021$ ).

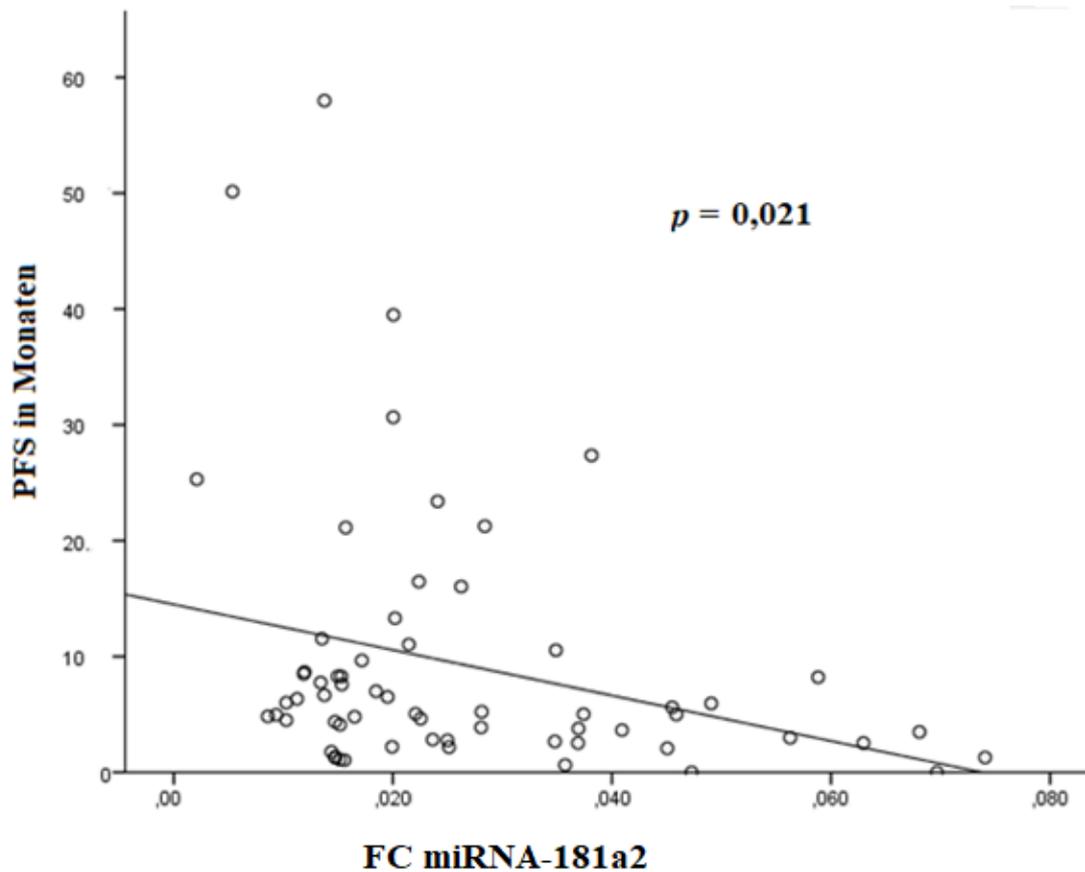


Abb. 27) Cox-Regression; FC miRNA-181a2 in Bezug auf das PFS in Monaten.

Auch hier erfolgt die Analyse der zeitabhängigen Variablen mittels Cox-Regression. Hier zeigt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einem verlängerten PFS und einer geringen Expression der miRNA-181a2: HR = 2,4; [95% CI: 13,4 - 43,8];  $p = 0,002$  (Abb.27).

Konkordant zur Auswertung des OS erfolgt die Darstellung des Zusammenhangs zwischen hoher und geringer miRNA-181a2 Expression auch als Kaplan-Meier-Kurve. Eine Aufteilung des Kollektivs in eine hohe respektive geringe Expression der miRNA-181a2 erfolgt wieder am Mittel des FC = 0,0265 (Abb.28). Es kann gezeigt werden, dass Patienten mit einem niedrigen Expressionswert der miRNA-181a2 später einen Progress erleiden als Patienten mit einem hohen Expressionswert der miRNA-181a2 ( $p = 0,021$ ).

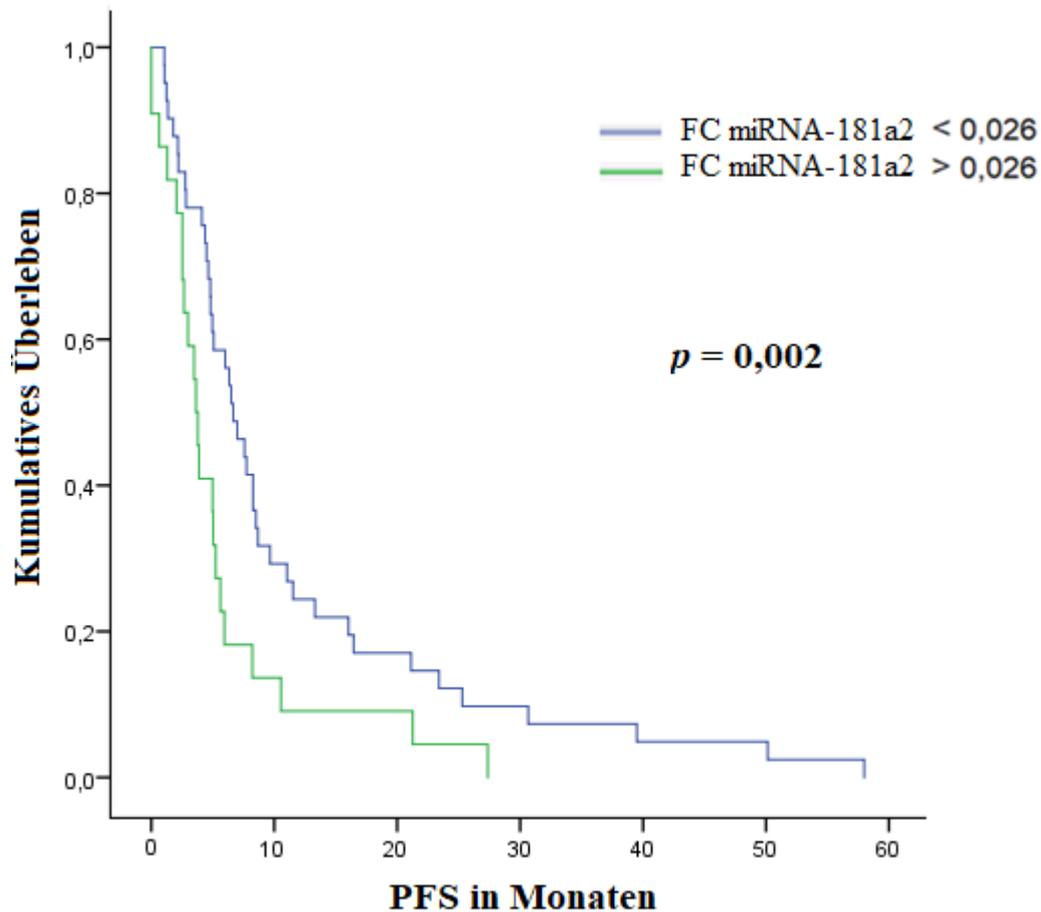


Abb.28) Kaplan-Meier-Kurve; PFS in Monaten bei geringer Expression der miRNA-181a2 (blau) und hoher Expression der miRNA-181a2 (grün).

#### 4.7.2 Bei IDH1<sub>mut</sub>

##### 4.7.2.1 Analyse des OS

Von den untersuchten Patienten exprimieren 11/74 die IDH1<sub>mut</sub>. Bei diesen Patienten beträgt der FC der miRNA-181a2 Expression im Mittel  $0,057 \pm 0,064$  [0,0093 - 0,241]. Bezüglich des OS und der miRNA-181a2 zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,73$ ).

##### 4.7.2.2 Analyse des PFS

Es besteht ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen miRNA-181a2 Expression und PFS

( $p = 0,23$ ).



## 5.0 Diskussion

Kürzliche Publikationen haben gezeigt, dass die miRNA-181a2 im Fettgewebe eine regulatorische Funktion bezüglich der IDH1 besitzt. Eine Überexpression der miRNA-181a2 in Fettzellen der Maus war hier mit einer verringerten IDH1 Expression vergesellschaftet (52). Die IDH1 ist der prognostisch relevanteste molekulare Marker im GBM. Patienten, die eine IDH1<sub>mut</sub> aufweisen, haben ein längeres Gesamtüberleben (59). Eine eingehende Analyse der miRNA-181a2 im Glioblastom, insbesondere unter dem Aspekt der intratumoralen IDH1 Regulation, erfolgte bisher nicht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher den Einfluss der miRNA-181a2 auf den Verlauf der Glioblastomkrankung zu bestimmen. Insbesondere soll geklärt werden, ob die miRNA-181a2 einen, bisher nur im Fettgewebe nachgewiesenen, regulatorischen Effekt auf die IDH1 auch im Tumor in vivo ausübt.

### 5.1 Methodendiskussion

#### 5.1.1 Kollektiv

Um diese Fragestellung beantworten zu können, wird ein möglichst repräsentatives Patientenkollektiv untersucht. Unter den 74 eingeschlossenen Patienten sind 63,5 % Männer und 36,5% Frauen. Dies entspricht in etwa dem in der Literatur beschriebenen Geschlechterverhältnis beim GBM, in der auch eine leichte männliche Dominanz beschrieben wird (60). Auch das PFS und OS entspricht den Literaturangaben. Im Durchschnitt liegt das PFS abhängig vom Alter zwischen 7 und 11 Monaten. Auch das OS liegt abhängig von dem Ansprechen der Therapie und der Möglichkeit der Reoperation zwischen 9,9 und 18,4 Monaten (61). In unserer Studie liegen PFS und OS bei 9,5 respektive 17,6 Monaten. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in der vorliegenden Studie bei  $59,01 \pm 11,45$  Jahren. Ähnliches berichten Steward et al. Hier liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 55 Jahren (61), (62). Weiterhin zeigt sich im beschriebenen Kollektiv ein medianer Karnofsky-Index von 80 bei Erstdiagnose. In großen epidemiologischen Studien zeigt sich eine ähnliche klinische Performance bei Erstdiagnose mit einem vergleichbaren medianen Karnofsky-Index (1). Die Tumorlokalisierung zeigt sich zwischen linker (41,9%) und rechter Seite (54,1%) in etwa gleich verteilt, der Primärlokus liegt insbesondere im Frontal (39,2%) und Temporallappen (33,8%). Diese Verteilung wird auch in Arbeiten berichtet (63).

Bei etwa einem Drittel der betroffenen Patienten konnte eine GTR durchgeführt werden, bei dem verbliebenen Drittel gelang dies nicht (STR). Ziel der Tumorresektion beim GBM ist neben der histologischen Sicherung der Diagnose die Zytomassenresektion (64). Zwar zeigen Studien einen klaren Überlebensvorteil bei möglichst umfangreicher GBM-Resektion, dennoch ist die Tumorresektion immer unter dem zwingenden Aspekt des Erhalts der neurologischen Funktionen zu planen (65).

Auch im vorliegenden Kollektiv ist eine GTR mit einem signifikanten längeren Überleben vergesellschaftet ( $p = 0,03$ ). In Fällen, bei denen die Resektion eine Kompromittierung eloquenter Areale zu Folge hätte, kann keine GTR durchgeführt werden. Eine GTR mit postoperativ verschlechterter neurologischer Funktion ist gegenüber einer STR mit erhaltender neurologischer Funktion in der Gesamtprognose unterlegen (66), (67). Bei in der Literatur beschriebenen Patientenkollektiven wird daher von einem ähnlichen Verteilungsmuster im Hinblick auf den Resektionsumfang ( $p = 0,021$ ) berichtet (66), (61), (68). Aufgrund der oben genannten Aspekte zeigt sich eine hohe Vereinbarkeit mit den in der Literatur berichteten Daten. Entsprechend kann unser Kollektiv als repräsentativ für die zu beantwortende Fragestellungen betrachtet werden.

### 5.1.2 Histopathologische, immunologische und molekulare Marker des GBM

Für das GBM existieren wichtige histopathologische, immunologische und molekulare Marker. Der MGMT-Status kann Auskunft über die Ansprechrate der Chemotherapeutika geben (57). Der IDH1-Status dient der Diagnostik und der Prognoseabschätzung (38).

### 5.1.3 Immunhistochemie

Für die Bestimmung des IDH1 Status in GBM-Proben existieren verschiedene Methoden. Die IDH1<sub>mut</sub> kann mit dem von uns verwendeten Verfahren der Immunhistochemie oder mit einem Sequenzierungsverfahren (Pyrosequenzierung) detektiert werden (69).

Der Vorteil der Immunhistochemie besteht in der einfachen Handhabung und dem geringeren Zeitaufwand. Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der hohen Sensitivität, sodass einzelne mutierte Tumorzellen erkannt werden können. Bei der Pyrosequenzierung muss eine höhere Anzahl an mutierten Tumorzellen vorhanden sein, um die Probe als positiv zu identifizieren (70), (71). Der Nachteil der Immunhistochemie ist die Interpretation und Auswertung, ob eine Tumorprobe als positiv zu werten ist. Die Interpretation ist anders als bei der Pyrosequenzierung mit Erfahrung verbunden und bedingt subjektiv (53).

Darüber hinaus können mit Hilfe von der Sequenzierung weitere Mutationen detektiert werden. (69). Bei der Immunhistochemie ist dies nur unter Verwendung entsprechend spezifischer Antikörper möglich.

Das Verfahren der Immunhistochemie wird aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit sowie seines geringeren Arbeits- und Kostenaufwands gewählt. Da außer der IDH1<sub>mut</sub> keine weiteren Mutationen detektiert werden müssen, ist das Verfahren der Immunhistochemie für unsere Studie adäquat.

#### 5.1.4 PCR

Für die Analyse der Expression der miRNA-181a2 wird in unserer Studie das Verfahren der qRT-PCR genutzt.

Es gibt verschiedene Arten der RNA-Expressionsanalyse. Sowohl die qRT-PCR als auch das konkurrierend gegenüberstehende Verfahren des Next Generation Sequencing (NGS) stellen relative Quantifizierungen des miRNA Gehalts einer zu analysierenden Probe dar. Im Gegensatz dazu trifft die Microarray Analyse Aussagen über den absoluten Gehalt an miRNA einer Probe (72). Die relative als auch die absolute Quantifizierung weisen eine hohe Empfindlichkeit für die RNA Analyse auf (73). In unsere Studie reicht eine relative Quantifizierung des miRNA Gehalts aus. Ziel unserer Studie ist die Beantwortung der Frage, ob eine hohe respektive niedrige Expression der miRNA-181a2 mit dem klinischen Verlauf vergesellschaftet ist. Entsprechend ist hier eine relative Quantifizierung ausreichend, um die Fragestellung beantworten zu können, sodass auf eine absolute Quantifizierung auch aus Kostengründen verzichtet wurde.

Die NGS und qRT-PCR weisen eine ähnliche analytische Sensitivität und Spezifität auf (74). Die Vorteile des Verfahrens der NGS sind der Informationsgehalt über die Allelsequenz und die Erfassung der miRNA Expressionen, sowie Mutationen (75), (76). Dieses Verfahren liefert entsprechend eine hohe Entdeckungskraft auch nicht bekannter miRNA Expressionen. (77). Weiterhin können mit der NGS viele Proben in kurzer Zeit hintereinander analysiert werden (78), (79). Der Nachteil dieses Verfahrens ist allerdings der hohe Kosten- und Zeitaufwand (77). Im Vergleich hierzu bietet das Verfahren der qRT-PCR praktisch keine Entdeckungskraft und ist auf die bekannte Basenabfolge der zu ermittelnden miRNA angewiesen. Große Vorteile dieses Verfahrens sind die bekannten Arbeitsabläufe, sowie die geringeren Investitionskosten, da ein solches Verfahren in den meisten Laboratorien durchgeführt werden kann. Des Weiteren ist das Verfahren auf kleinere Probenansätze besser abgestimmt (19), (80).

Da in unserer Studie die zu untersuchende miRNA-Sequenz bekannt ist, wird das Verfahren auch aufgrund seiner geringeren Arbeitskosten dem Verfahren der NGS vorgezogen (78).

#### 5.1.5 Proteinexpressionsbestimmung des IDH1- Proteins mittels mRNA-Expressionsmessung

Die Proteinexpressionsbestimmung des IDH1 Proteins erfolgt PCR-gestützt mittels mRNA Expressionsanalyse. Prinzipiell stehen für die Proteinanalyse verschiedene Techniken zur Verfügung. Dazu zählen Western Blot, ELISA-Assays sowie die in der vorliegenden Arbeit angewendete mRNA Expressionsanalyse (81). Der prinzipielle Vorteil von Western Blot und ELISA-Assays ist der direkte Proteinnachweis mit Hilfe von Antikörperbindung. Dies wirkt sich allerdings nachteilig bei in vivo Präparaten aus. Insbesondere postoperative Veränderungen wie koaguliertes Gewebe sowie Blutanteile können oben genannte Antikörperbindungen stören und zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen

(82). Im Gegensatz wird bei der verwendeten Methode der mRNA Expressionsanalyse vorausgesetzt, dass eine direkte Korrelation zwischen der Expression des Proteins und der zugehörigen mRNA besteht. Über eine Messung der mRNA kann somit auf die Proteinexpression geschlossen werden. Letztendlich handelt es sich hierbei aber um eine indirekte Methode der Proteinexpressionsbestimmung (83).

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit mit den in der Literatur berichteten Ergebnissen diskutiert werden.

### 5.2.1 IDH1

Wie oben erwähnt ist der Mutationsstatus der IDH1 einer der entscheidenden molekularbiologischen Charakteristika im Hinblick auf die Prognose eines Glioblastoms (84).

Es erscheint plausibel, dass sich dieser diametrale Unterschied im Hinblick auf die Prognose des GBM, in Abhängigkeit des IDH1 Mutationsstatus, auf molekularer Ebene widerspiegelt.

Sun et. al beispielweise zeigen, dass sich die Proteinexpression neoangiogenetischer Enzyme maßgeblich zwischen IDH1<sub>mut</sub> und IDH1<sub>WT</sub> Tumoren unterscheidet. Die Studie besteht aus einer Kohortengröße von 84 Patienten. Dieser Expressionsunterschied der Proteine  $\alpha$ -SMA, NG2 und PDGFR- $\beta$  kann nicht nur mit Hilfe des Western Blot, sondern auch bildmorphologisch „in Vivo“ am MRT-Spektroskop dargestellt werden. Diesem Expressionsunterschied neoangiogenetischer Proteine wird von Sun et. al auch eine Erklärung für das unterschiedliche biologische Verhalten der Tumore beigemessen (37).

Dass sich molekulare Charakteristika bei IDH1<sub>mut</sub> und IDH<sub>WT</sub> Patienten aber nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf epigenetischer Ebene unterscheiden, zeigen Turkan et al. Sie untersuchen ob Änderungen in den Methylierungseigenschaften zwischen IDH1<sub>mut</sub> und IDH1<sub>WT</sub> auftreten. Hierzu werden 81 Tumore unter Verwendung genomischer DNA- Analysen untersucht. Hierbei können die Autoren zeigen, dass die Expression der Mutante IDH1 einen deutlichen Anstieg der Hypermethylierung einiger Gene verursacht. Die Expression der IDH1<sub>WT</sub> verursacht hingegen eine Hypomethylierung an bestimmten Stellen. Somit kann gezeigt werden, dass die Produktion von 2-HG als auch Ketoglutarat das Methylohm unterschiedlich beeinflusst (85), (86).

Ein weiteres epigenetisches Charakteristikum, das durch den IDH1 Status beeinflusst wird, können miRNAs sein. Bei Wang et al werden miRNA Expressionsdaten aus dem „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) Datenportal ausgewertet. Insgesamt werden 155 GBM Patienten eingeschlossen, davon weisen

15 Patienten eine IDH1<sub>mut</sub> und 140 Patienten den IDH1<sub>WT</sub> auf. Die Autoren berichten, dass 23 verschiedene miRNA's in ihrer Gesamtsignatur eine signifikant aberrante Expression zwischen IDH1<sub>mut</sub> und IDH1<sub>WT</sub> Tumoren aufweisen. Tatsächlich können Wang et. al anhand dieser miRNA Signatur den IDH1 Status vorhersagen (87), (88), (89).

Eine zentrale Fragestellung der vorliegenden Dissertation ist, inwieweit der Mutationsstatus der IDH1 die miRNA-181a2 Expression bei Patienten mit einem GBM beeinflusst? Patienten zeigen abhängig von ihrem IDH1 Status eine unterschiedliche Expression der miRNA-181a2. Der IDH1<sub>mut</sub> Status ist im Vergleich zum IDH1<sub>WT</sub> Status signifikant mit einer höheren Expression der miRNA-181a2 vergesellschaftet.

### 5.2.2 MiRNA-181a2

Die miRNA-181a2 hat in unterschiedlicher Weise Einfluss auf die Onkogenese. Sie ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt und zeigt insbesondere bei der Tumorentstehung eine aberrante Wirkweise. Einige Studien zeigen, dass die miRNA-181a2 sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressor dienen kann (90), (91), (92).

Eine hohe Expression der miRNA-181a2 führt bei diversen Krebsarten wie dem Prostatakarzinom, dem Mammakarzinom oder auch dem Lungenkarzinom zu weniger Proliferation, Invasion und zellulärer Dedifferenzierung. Dies konnte von Wang et al. in der Zellkultur als auch in Vivo gezeigt werden (93).

Darüber hinaus ist eine niedrige Expression der miRNA-181a2 mit einem aggressiveren Verhalten bei diesen Krebsarten assoziiert (19), (17). Lu et al. konnte in einer Studie retrospektiv zeigen, dass das OS im Falle einer geringen miRNA-181a2 Expression signifikant verkürzt ist. In die Studie sind 90 Patienten eingeschlossen, die histopathologisch gesichert an einem Adenokarzinom erkrankt sind (94).

In unserer Studie zeigen wir im Hinblick auf das Glioblastom ein konträres Verhalten.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei Glioblastomen mit IDH1<sub>WT</sub> eine niedrige Expression der miRNA-181a2 mit einer signifikant besseren Prognose einhergeht. Sowohl das PFS als auch das OS sind bei einer niedrigen miRNA-181a2 Expression erhöht (Abb.27). Entsprechend kann unsere Fragestellung, inwieweit die Expression der miRNA-181a2 Einfluss auf den klinischen Verlauf einer GBM Erkrankung nimmt, klar dahingehend beantwortet werden, dass eine niedrige miRNA-181a2 Expression mit einem längerem Gesamtüberleben einhergeht. Unsere Daten können hierbei auch in einem unabhängigen TCGA Kollektiv bestätigt werden. Auch hier zeigt sich bei GBM-Patienten mit IDH1<sub>WT</sub> ein klarer Überlebensvorteil im Falle einer verminderten Expression von miRNA-181a2. Nach unserem besten Wissen wurde bisher kein Zusammenhang zwischen der miRNA-181a2 Expression und der Prognose beim GBM publiziert.

Die Erklärung, warum die Expression der miRNA-181a2 bei den unterschiedlichen Tumorentitäten teils diametrale Ergebnisse zeigt, bleibt herausfordernd.

Prinzipiell ist zu beachten, dass der kausale Zusammenhang zwischen der miRNA-181a2 Expression und dem klinischen Verlauf der unterschiedlichen Tumorarten von den Autoren diversen Signalkaskadewegen zugeschrieben wird.

So berichten Wang et al., dass die miRNA-181a2 mit Hilfe der Regulation des Kaisoproteins auf die Prognose bei Prostatakarzinom, Mammakarzinom und Lungenkarzinom Einfluss nimmt (22). Kaiso, ein Protein der BTB/POX Familie, wird mit dem Auftreten der Invasion sowie dem Metastasierungsverhalten bei oben genannten Karzinomen in Verbindung gebracht. Kaiso ist ein direktes Zielprotein der miRNA-181a2, sodass durch eine geringe miRNA-181a2 Expression das Protein stimuliert und das Krebswachstum gefördert wird.

Parikh et al. berichten, dass die Dysregulation der miRNA-181a2 über den TGF- $\beta$  gesteuerten Signalweg Einfluss auf den Verlauf des Ovarialkarzinoms hat (95).

Lu et al. berichten beim Magenkarzinom eine Inhibition von Caprin-1 durch die Überexpression der miRNA-181a2. Caprin-1 und die miRNA-181a2 korrelieren invers miteinander. Die Dysregulation dieses Proteins führt entsprechend zu einem aggressiveren klinischen Verhalten beim Magenkarzinom. Eine Herunterregulierung der miRNA-181a2 konnte hingegen die Expression der Caprin-1 steigern und einen protektiven Effekt auf den Verlauf der Karzinomerkkrankung bewirken (94).

In der Gruppe der IDH1<sub>mut</sub> Tumoren hat die miRNA-181a2 Expression keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben. Diese Aussage muss jedoch mit Vorsicht interpretiert werden. Aufgrund von lediglich elf Patienten in der IDH1<sub>mut</sub> Gruppe kann keine sichere Aussage getroffen werden. Dass in unserem Kollektiv nur eine geringe Fallzahl eine IDH1<sub>mut</sub> aufweist, entspricht auch den Literaturangaben bezüglich des Auftretens der Mutation bei primären GBM.

In diesem Zusammenhang scheint sich zu bestätigen, dass eine miRNA mehrere Zielproteine haben kann und dass auch ein Protein in seiner Expression von mehreren miRNAs reguliert werden kann (91).

### 5.2.3 Die IDH1 Expression wird durch die miRNA-181a2 beeinflusst.

Um den Einfluss der miRNA-181a 2 auf die Prognose des GBM bei IDH1<sub>WT</sub> Tumoren näher aufklären zu können, erfolgt die Bestimmung der Proteinexpression des IDH1 in Abhängigkeit der miRNA-181a2. Hier zeigt sich eine inverse Korrelation auf Trendniveau. Eine geringe Expression der miRNA-181a2 ist eher mit einer hohen Proteinexpression vergesellschaftet. Dies ist gut vereinbar mit dem Modell, dass die miRNA-181a2 die Expression des IDH1-Proteins reguliert (52).

In der Literatur wird der unbestreitbare Einfluss des IDH1 beim GBM, insbesondere im Falle einer Mutation des IDH1-Gens mit der Akkumulation eines Onkometaoliten beschrieben (41).

Wir hingegen zeigen durch Regulation der IDH1 Proteinexpression mittels miRNA-181a2 eine neue bisher im GBM unbekannte Wechselwirkung auf. Scheinbar ist nicht nur die Mutation im IDH1-Gen ein Einflussfaktor auf die Prognose, sondern auch die konkrete Höhe der Proteinexpression, welche durch die miRNA-181a2 gesteuert wird.

### 5.3 Schlussfolgerung

Es soll zunächst die Frage beantwortet werden, inwieweit die Expression der miRNA-181a2 den IDH1 Status von Patienten mit einem GBM beeinflusst.

Hierzu kann gezeigt werden, dass Tumoren mit einer IDH<sub>mut</sub> eine signifikant höhere Expression der miRNA-181a2 aufweisen als IDH<sub>WT</sub> Tumore.

Als zweites soll die Fragestellung beantwortet werden, inwieweit die Expression der miRNA-181a2 die Proteinexpression des IDH1-Gens im GBM beeinflusst.

Es zeigt sich auf Trendniveau eine inverse Korrelation zwischen der miRNA-181a2 und der Protein-Expression des IDH1-Gens. Die miRNA-181a2 zeigt sich als ein von der IDH1 mRNA unabhängiger Prädiktor des OS

Die dritte Fragestellung ist, inwieweit sich die miRNA-181a2 Expression auf den Verlauf einer GBM-Erkrankung auswirkt.

Hier zeigt sich ein differenziertes Bild. Im Gesamtkollektiv hat die Expression der miRNA-181a2 zunächst keinen Einfluss auf das OS oder PFS gezeigt. Bei näherer Betrachtung der Subgruppe der IDH1<sub>WT</sub> zeigt sich jedoch ein anderer Sachverhalt. Bei IDH1<sub>WT</sub> Tumoren ist eine geringe Expression der miRNA-181a2 mit einem signifikant verlängerten PFS und OS vergesellschaftet. Bei der Subgruppe der IDH1<sub>mut</sub> hat die miRNA-181a2 Expression keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben. Aufgrund der geringen Fallzahl in der Subgruppe IDH1<sub>mut</sub> ist die Aussage, dass die Expression keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben hat, mit Zurückhaltung zu werten.

## 6.0 Ausblick

Mit unserer Studie konnten wir zeigen, dass bei IDH1<sub>WT</sub> Tumoren eine geringe Expression der miRNA-181a2 mit einem signifikant verlängerten Überleben einhergeht. Mit den Ergebnissen dieser Dissertation besteht nun die Möglichkeit eine prospektive Langzeitstudie durchzuführen, um den genauen Pathomechanismus aufzudecken.

Zunächst sollte durch Expressionsmessung der IDH1 untersucht werden, inwieweit deren Expression von der Expression der miRNA-181a2 abhängt.

Eine niedrige miRNA-181a2 Expression geht in der vorliegenden Arbeit mit einem längeren OS einher. Aufgrund dessen könnte zukünftig präoperativ eine liquid biopsy verwendet werden, um eine frühzeitige Prognoseabschätzung durchzuführen. Bei der liquid biopsy handelt es sich um eine Blutuntersuchung, bei der ins Blut abgegebene Tumorzellen genauer untersucht werden können. Auch unter dem Aspekt eines potenziell therapeutischen Ansatzes ist die miRNA-181a2 interessant. Ein therapeutisches Ziel könnte die Inhibition der miRNA-181a2 sein. Somit könnte vielleicht das Leben bei Patienten mit Expression des IDH1<sub>WT</sub> verlängert werden.

## Literaturverzeichnis

1. Dobran M, Nasi D, Della Costanza M, Gladi M, Iacoangeli M, Rotim K and Splavski B: Characteristics of treatment and outcome in elderly patients with brain glioblastoma: a retrospective analysis of case series. *Acta Clin Croat* 58: 221–228, 2019.
2. DeWitt JC, Mock A and Louis DN: The 2016 WHO classification of central nervous system tumors: what neurologists need to know. *Curr Opin Neurol* 30: 643–649, 2017.
3. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS and Villano JL: Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 23: 1985–1996, 2014.
4. Frühwald MC and Rutkowski S: Tumors of the Central Nervous System in Children and Adolescents. *Dtsch Ärztebl Int* 108: 390–397, 2011.
5. Ohgaki H and Kleihues P: Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 109: 93–108, 2005.
6. Kabat GC, Etgen AM and Rohan TE: Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 19: 2421–2427, 2010.
7. Lachance DH, Yang P, Johnson DR, *et al.*: Associations of high-grade glioma with glioma risk alleles and histories of allergy and smoking. *Am J Epidemiol* 174: 574–581, 2011.
8. Linos E, Raine T, Alonso A and Michaud D: Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 99: 1544–1550, 2007.
9. Hochberg F, Toniolo P, Cole P and Salcman M: Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults. *J Neurooncol* 8: 55–60, 1990.
10. Hemminki K, Tretli S, Sundquist J, Johannesen TB and Granström C: Familial risks in nervous-system tumours: a histology-specific analysis from Sweden and Norway. *Lancet Oncol* 10: 481–488, 2009.
11. Opoku-Darko M, Amuah JE and Kelly JJP: Surgical Resection of Anterior and Posterior Butterfly Glioblastoma. *World Neurosurg* 110: e612–e620, 2018.
12. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM and Simjee SU: Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 18: 3–9, 2017.
13. Capper D and Reifenberger G: Klassifikation von Gliomen. *Nervenarzt* 86: 672–683, 2015.
14. Péus D, Newcomb N and Hofer S: Appraisal of the Karnofsky Performance Status and proposal of a simple algorithmic system for its evaluation. *BMC Med Inform Decis Mak* 13: 72, 2013.
15. Nelson SJ and Cha S: Imaging glioblastoma multiforme. *Cancer J Sudbury Mass* 9: 134–145, 2003.
16. Martínez-García M, Álvarez-Linera J, Carrato C, *et al.*: SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of glioblastoma (2017). *Clin Transl Oncol* 20: 22–28, 2018.
17. Chang JE, Khuntia D, Robins HI and Mehta MP: Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme. *Clin Adv Hematol Oncol HO* 5: 894–902, 907–915, 2007.
18. Lara-Velazquez M, Al-Kharboosh R, Jeanneret S, *et al.*: Advances in Brain Tumor Surgery for Glioblastoma in Adults. *Brain Sci* 7, 2017.
19. Eljamel S: 5-ALA Fluorescence Image Guided Resection of Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis of the Literature. *Int J Mol Sci* 16: 10443–10456, 2015.
20. Ganslandt O, Grummich P and Nimsky C: Multimodal functional neuronavigation and intraoperative imaging. In: *Brain Mapping: From Neural Basis of Cognition to Surgical Applications*. Duffau H (ed.) Springer, Vienna, pp277–285, 2011.
21. Fibertracking - Inselspital Bern - Neurochirurgie.
22. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.*: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987–996, 2005.
23. Hottinger AF, Stupp R and Homicsko K: Standards of care and novel approaches in the management of glioblastoma multiforme. *Chin J Cancer* 33: 32–39, 2014.

24. Friedman HS, Kerby T and Calvert H: Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 6: 2585–2597, 2000.
25. Park K-J, Yu MO, Park D-H, Park J-Y, Chung Y-G and Kang S-H: Role of vincristine in the inhibition of angiogenesis in glioblastoma. *Neurol Res* 38: 871–879, 2016.
26. Le Rhun E, Preusser M, Roth P, *et al.*: Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev* 80: 101896, 2019.
27. 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* 5: 79–88, 2003.
28. Wemmert S, Ketter R, Rahnenführer J, *et al.*: Patients with high-grade gliomas harboring deletions of chromosomes 9p and 10q benefit from temozolomide treatment. *Neoplasia N Y N* 7: 883–893, 2005.
29. Kadota T, Saito R, Kumabe T, *et al.*: A multicenter randomized phase III study for newly diagnosed maximally resected glioblastoma comparing carmustine wafer implantation followed by chemoradiotherapy with temozolomide with chemoradiotherapy alone; Japan Clinical Oncology Group Study JCOG1703 (MACS study). *Jpn J Clin Oncol* 49: 1172–1175, 2019.
30. Urbschat S, Sippl C, Engelhardt J, Kammers K, Oertel J and Ketter R: Importance of biomarkers in glioblastomas patients receiving local BCNU wafer chemotherapy. *Mol Cytogenet* 10, 2017.
31. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial | Neuro-oncology | JAMA | JAMA Network.
32. Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches: TumortheraPIefelder: „Wechselstrom-Haube“ verbessert Ergebnisse der... Dtsch Ärztebl, 2017.
33. Rossini PM and Rossi S: Transcranial magnetic stimulation: diagnostic, therapeutic, and research potential. *Neurology* 68: 484–488, 2007.
34. Cenciarini M, Valentino M, Belia S, *et al.*: Dexamethasone in Glioblastoma Multiforme Therapy: Mechanisms and Controversies. *Front Mol Neurosci* 12: 65, 2019.
35. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, *et al.*: MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 997–1003, 2005.
36. Parsons DW, Jones S, Zhang X, *et al.*: An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321: 1807–1812, 2008.
37. Sun C, Zhao Y, Shi J, *et al.*: Isocitrate dehydrogenase1 mutation reduces the pericyte coverage of microvessels in astrocytic tumours. *J Neurooncol* 143: 187–196, 2019.
38. Horbinski C: What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? *Acta Neuropathol (Berl)* 125: 621–636, 2013.
39. Kalkan R, Atli Eİ, Özdemir M, Çiftçi E, Aydin HE, Artan S and Arslantaş A: IDH1 mutations is prognostic marker for primary glioblastoma multiforme but MGMT hypermethylation is not prognostic for primary glioblastoma multiforme. *Gene* 554: 81–86, 2015.
40. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P and Ohgaki H: IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 174: 1149–1153, 2009.
41. Dang L, White DW, Gross S, *et al.*: Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 465: 966–966, 2010.
42. Izaurralde E: MicroRNAs - mächtige Winzlinge, die Gene ausschalten MicroRNAs - mighty dwarfs that switch off genes. 4, 2007.
43. Tabibkhoei A, Izadpanahi M, Arab A, Zare-Mirzaei A, Minaeian S, Rostami A and Mohsenian A: Profiling of novel circulating microRNAs as a non-invasive biomarker in diagnosis and follow-up of high and low-grade gliomas. *Clin Neurol Neurosurg* 190: 105652, 2019.
44. Schaefer A, O’Carroll D, Tan CL, Hillman D, Sugimori M, Llinas R and Greengard P: Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med* 204: 1553–1558, 2007.
45. Su Y, Yuan J, Zhang F, *et al.*: MicroRNA-181a-5p and microRNA-181a-3p cooperatively restrict vascular inflammation and atherosclerosis. *Cell Death Dis* 10: 1–15, 2019.

46. Wang H, Tao T, Yan W, *et al.*: Upregulation of miR-181s reverses mesenchymal transition by targeting KPNA4 in glioblastoma. *Sci Rep* 5: 1–11, 2015.
47. Slaby O, Lakomy R, Fadrus P, *et al.*: MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. *Neoplasma* 57: 264–269, 2010.
48. Zhai F, Chen X, He Q, *et al.*: MicroRNA-181 inhibits glioblastoma cell growth by directly targeting CCL8. *Oncol Lett* 18: 1922–1930, 2019.
49. Yang L, Ma Y, Xin Y, Han R, Li R and Hao X: Role of the microRNA 181 family in glioma development. *Mol Med Rep* 17: 322–329, 2018.
50. Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z and You Y: hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res* 1236: 185–193, 2008.
51. miRNA Entry for MI0000289.
52. Chu B, Wu T, Miao L, Mei Y and Wu M: MiR-181a regulates lipid metabolism via IDH1. *Sci Rep* 5: 8801, 2015.
53. Preusser M, Wöhrer A, Stary S, Höftberger R, Streubel B and Hainfellner JA: Value and limitations of immunohistochemistry and gene sequencing for detection of the IDH1-R132H mutation in diffuse glioma biopsy specimens. *J Neuropathol Exp Neurol* 70: 715–723, 2011.
54. Holzapfel B and Wickert L: Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biol Unserer Zeit* 37: 120–126, 2007.
55. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45, 2001.
56. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods San Diego Calif* 25: 402–408, 2001.
57. Sippl C, Urbschat S, Kim YJ, Senger S, Oertel J and Ketter R: Promoter methylation of RB1, P15, P16, and MGMT and their impact on the clinical course of pilocytic astrocytomas. *Oncol Lett* 15: 1600–1606, 2018.
58. Sippl C, Ketter R, Bohr L, Oertel J and Urbschat S: P01.025 MiRNA-181d expression significantly affects treatment responses to carmustinewafer implantation. *Neuro-Oncol* 20: iii233–iii234, 2018.
59. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, *et al.*: Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 27: 5743–5750, 2009.
60. Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States. - PubMed - NCBI.
61. Helseth R, Helseth E, Johannesen TB, *et al.*: Overall survival, prognostic factors, and repeated surgery in a consecutive series of 516 patients with glioblastoma multiforme. *Acta Neurol Scand* 122: 159–167, 2010.
62. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. - PubMed - NCBI.
63. Cayuela N, Simó M, Majós C, *et al.*: Seizure-susceptible brain regions in glioblastoma: identification of patients at risk. *Eur J Neurol* 25: 387–394, 2018.
64. Mukherjee S, Wood J, Liaquat I, Stapleton SR and Martin AJ: Craniotomy for recurrent glioblastoma: Is it justified? A comparative cohort study with outcomes over 10 years. *Clin Neurol Neurosurg* 188: 105568, 2020.
65. Ma R, Chari A, Brennan PM, *et al.*: Residual enhancing disease after surgery for glioblastoma: evaluation of practice in the United Kingdom. *Neuro-Oncol Pract* 5: 74–81, 2018.
66. Ahmadipour Y, Rauschenbach L, Gembruch O, *et al.*: To resect or not to resect? Risks and benefits of surgery in older patients with glioblastoma. *J Geriatr Oncol*, 2019.
67. Weninger L, Haarbuerger C and Merhof D: Robustness of Radiomics for Survival Prediction of Brain Tumor Patients Depending on Resection Status. *Front Comput Neurosci* 13: 73, 2019.
68. JPMA - Journal of Pakistan Medical Association.

69. Setty P, Hammes J, Rothämel T, Vladimirova V, Kramm CM, Pietsch T and Waha A: A Pyrosequencing-Based Assay for the Rapid Detection of IDH1 Mutations in Clinical Samples. *J Mol Diagn JMD* 12: 750–756, 2010.
70. Agarwal S, Sharma MC, Jha P, *et al.*: Comparative study of IDH1 mutations in gliomas by immunohistochemistry and DNA sequencing. *Neuro-Oncol* 15: 718–726, 2013.
71. Perizzolo M, Winkfein B, Hui S, Krulicki W, Chan JA and Demetrick DJ: IDH mutation detection in formalin-fixed paraffin-embedded gliomas using multiplex PCR and single-base extension. *Brain Pathol Zurich Switz* 22: 619–624, 2012.
72. Liu C-G, Calin GA, Volinia S and Croce CM: MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat Protoc* 3: 563–578, 2008.
73. Devonshire AS, Sanders R, Wilkes TM, Taylor MS, Foy CA and Huggett JF: Application of next generation qPCR and sequencing platforms to mRNA biomarker analysis. *Methods San Diego Calif* 59: 89–100, 2013.
74. NGS vs. qPCR.
75. Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, *et al.*: Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia* 28: 1299–1307, 2014.
76. Tuononen K, Mäki-Nevala S, Sarhadi VK, *et al.*: Comparison of targeted next-generation sequencing (NGS) and real-time PCR in the detection of EGFR, KRAS, and BRAF mutations on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor material of non-small cell lung carcinoma-superiority of NGS. *Genes Chromosomes Cancer* 52: 503–511, 2013.
77. Behjati S and Tarpey PS: What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 98: 236–238, 2013.
78. Comparison of Next-Generation Sequencing, Quantitative PCR, and Sanger Sequencing for Mutation Profiling of EGFR, KRAS, PIK3CA and BRAF in Clinical... - PubMed - NCBI.
79. Method of the Year | Nature Methods.
80. Robin JD, Ludlow AT, LaRanger R, Wright WE and Shay JW: Comparison of DNA Quantification Methods for Next Generation Sequencing. *Sci Rep* 6: 1–10, 2016.
81. Porsch-Özcürümez M, Kischel N, Priebe H, Splettstösser W, Finke E-J and Grunow R: Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Western Blotting, Microagglutination, Indirect Immunofluorescence Assay, and Flow Cytometry for Serological Diagnosis of Tularemia. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 1008–1015, 2004.
82. Ma D, Baruch D, Shu Y, *et al.*: Using protein microarray technology to screen anti-ERCC1 monoclonal antibodies for specificity and applications in pathology. *BMC Biotechnol* 12: 88, 2012.
83. Guo Y, Xiao P, Lei S, *et al.*: How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin* 40: 426–436, 2008.
84. Ichimura K: Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathol* 29: 131–139, 2012.
85. Turcan S, Rohle D, Goenka A, *et al.*: IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 483: 479–483, 2012.
86. Xu W, Yang H, Liu Y, *et al.*: Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of  $\alpha$ -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell* 19: 17–30, 2011.
87. Wang Z, Bao Z, Yan W, You G, Wang Y, Li X and Zhang W: Isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation-specific microRNA signature predicts favorable prognosis in glioblastoma patients with IDH1 wild type. *J Exp Clin Cancer Res CR* 32: 59, 2013.
88. A Ten-microRNA Expression Signature Predicts Survival in Glioblastoma.
89. Zhang W, Zhang J, Yan W, *et al.*: Whole-genome microRNA expression profiling identifies a 5-microRNA signature as a prognostic biomarker in Chinese patients with primary glioblastoma multiforme. *Cancer* 119: 814–824, 2013.

90. Shen H, Weng X-D, Liu X-H, *et al.*: miR-181a-5p is downregulated and inhibits proliferation and the cell cycle in prostate cancer. 8.
91. Yang C, Tabatabaei SN, Ruan X and Hardy P: The Dual Regulatory Role of MiR-181a in Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem* 44: 843–856, 2017.
92. Gao W, Yu Y, Cao H, Shen H, Li X, Pan S and Shu Y: Deregulated expression of miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 64: 399–408, 2010.
93. Wang L, Ma J, Wang X, *et al.*: Kaiso (ZBTB33) Downregulation by Mirna-181a Inhibits Cell Proliferation, Invasion, and the Epithelial–Mesenchymal Transition in Glioma Cells. *Cell Physiol Biochem* 48: 947–958, 2018.
94. Lu Q, Chen Y, Sun D, *et al.*: MicroRNA-181a Functions as an Oncogene in Gastric Cancer by Targeting Caprin-1. *Front Pharmacol* 9, 2019.
95. Parikh A, Lee C, Joseph P, *et al.*: microRNA-181a has a critical role in ovarian cancer progression through the regulation of the epithelial-mesenchymal transition. *Nat Commun* 5: 2977, 2014.
96. Robert Koch-Institut; Häufigkeiten und Trends. 11. Ausgabe. Berlin, 2017. S. 108f

## **Publikationsliste:**

### **Publiziert:**

- miRNA-26a expression influences the therapy response to carmustine wafer implantation in patients with glioblastoma multiforme.  
Christoph Sippl, Ralf Ketter, Luisa Braun, Fritz Teping, **Louisa Schoeneberger**, Yoo Jin Kim, Markus List, Arjang Nakhoda, Silke Wemmert, Joachim Oertel, Steffi Urbschat  
Acta Neurochirurgica 2019, doi: 10.1007/s00701-019-04051-8
  
- Impact of miRNA-181a2 on the clinical course of IDH1 wild type glioblastoma.  
Christoph Sippl, **Louisa Schoeneberger**, Fritz Teping, Walter Schulz-Schaeffer, Steffi Urbschat, Ralf Ketter, Joachim Oertel  
Processes 2021,9(5), 728, doi:10.3390/pr9050728

## **Danksagung**

Mein großer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Oertel für die Überlassung des Themas sowie die vielfältigen Anregungen für diese Arbeit.

Darüber hinaus 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.

Meinem Betreuer Herrn Dr. med. Christoph Sippl gebührt größter Dank für die Begleitung meiner Doktorarbeit. Ich bedanke mich für den jederzeit verfügbaren Rat, die unzähligen Anregungen und die große Unterstützung, ohne die diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Rüdiger Koop, dem neurochirurgischen Fotografen für das Bereitstellen der Bildmaterialien aus dem OP.

Frau Sigrid Welsch bin ich für die Anleitung der Labortätigkeiten und die Unterstützung bei jeglichen Fragestellungen zu großem Dank verpflichtet.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Silke Wemmert für die Hilfestellung und die Einweisung in die Laborgeräte der HNO.

Lisa Bohr und Luisa Braun danke ich für die Bereitstellung der Methylierungsdaten.

Ein herzliches Dankeschön geht darüber hinaus an Larissa Wolf für das Gegenlesen der Arbeit.

## **Lebenslauf**

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

Tag der Promotion: 08.12.2021

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Joachim Oertel

Prof. Dr. med. Eckart Meese

Prof. Dr. med. Norbert Graf