

Aus dem Bereich Neurochirurgie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften bzw. Klinische Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**MicroRNA-Expressions- und DNA-Methylierungsuntersuchungen im  
Primärtumor und Rezidiv des Glioblastoma multiforme**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät***

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2021

vorgelegt von: Mara Louisa Schürgers

geb. am: 10.05.1994 in Köln, Nordrhein-Westfalen



Tag der Promotion: 30.11.2021

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

Berichterstatter 1: Prof. Dr. med. Joachim Oertel

Berichterstatter 2: Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese



# Inhaltsverzeichnis

|   |            |
|---|------------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                      | <b>III</b> |
| <b>1. Zusammenfassung .....</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1 Abstract.....   | 1          |
| <b>2. Einleitung .....</b>  | <b>3</b>   |
| 2.1 Glioblastoma multiforme .....                                       | 3          |
| 2.2 Epigenetische Modifikation.....                                     | 5          |
| 2.2.1 MicroRNA .....  | 5          |
| 2.2.2 DNA-Methylierung .....  | 11         |
| <b>3. Fragestellung .....</b>   | <b>16</b>  |
| <b>4. Material und Methoden .....</b>                                   | <b>18</b>  |
| 4.1 Tumormaterial.....  | 18         |
| 4.2 MicroRNA-Analyse.....   | 19         |
| 4.2.1 RNA Isolation.....  | 19         |
| 4.2.2 Reverse Transkription.....  | 21         |
| 4.2.3 Quantitative Real-Time PCR.....                                   | 24         |
| 4.3 DNA-Methylierungsanalyse.....                                       | 27         |
| 4.3.1 DNA Isolation.....  | 27         |
| 4.3.2 Methylierungsspezifische PCR und Bisulfitmarkierung .....         | 28         |
| 4.3.3 Agarose-Gelelektrophorese .....                                   | 34         |
| <b>5. Ergebnisse .....</b>  | <b>37</b>  |
| 5.1 Deskriptive Statistik.....  | 37         |
| 5.1.1 Patientenkollektiv und Krankheitsverlauf.....                     | 37         |
| 5.2 MicroRNA-Expressionsanalyse .....                                   | 40         |
| 5.2.1 MicroRNA-Expression im Primärtumor und Rezidiv .....              | 41         |
| 5.2.2 Einfluss von microRNA-Expressionen auf klinische Parameter .....  | 49         |
| 5.3 DNA-Methylierungsanalyse.....                                       | 50         |
| 5.3.1 DNA-Methylierungen im Primärtumor und Rezidiv .....               | 50         |
| 5.3.2 Einfluss von DNA-Methylierungen auf klinische Parameter.....      | 53         |
| <b>6. Diskussion .....</b>  | <b>57</b>  |
| 6.1 Patientenkollektiv .....  | 59         |
| 6.2 Verhalten von microRNAs im Krankheitsverlauf des Glioblastoms ..... | 60         |
| 6.3 DNA-Methylierungsstatus im Krankheitsverlauf des Glioblastoms.....  | 64         |
| 6.4 Limitationen .....  | 69         |
| <b>7. Ausblick.....</b>   | <b>70</b>  |

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| <b>8. Literaturverzeichnis</b> .....  | <b>72</b>  |
| <b>9. Abbildungsverzeichnis</b> ..... | <b>80</b>  |
| <b>10. Tabellenverzeichnis</b> .....  | <b>82</b>  |
| <b>11. Materialverzeichnis</b> .....  | <b>85</b>  |
| <b>12. Anhang</b> .....               | <b>87</b>  |
| 12.1 Material und Methoden .....      | 87         |
| 12.2 Ergebnisse aus 5.2.....          | 89         |
| 12.3 Ergebnisse aus 5.3.....          | 99         |
| <b>13. Danksagung</b> .....           | <b>105</b> |
| <b>14. Lebenslauf</b> .....           | <b>106</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|           |  |
|-----------|--|
| Bcl-2     | B-cell lymphoma 2                                    |
| CDK       | Cyclin abhängige Kinasen                             |
| DGCR8     | DiGeorge syndrome chromosomal (or critical) region 8 |
| DNA       | Desoxyribonukleinsäure                               |
| DNMT      | DNA-Methyltransferasen                               |
| dsDNA     | double-stranded DNA                                  |
| dsRNA     | double-stranded RNA                                  |
| FC        | Fold change  |
| GBM       | Glioblastoma multiforme                              |
| GTR       | gross total resection                                |
| HCC       | Hepatozelluläres Karzinom                            |
| K-Ras     | Kirsten Rat Sarcoma virus                            |
| MGMT      | O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase                |
| miRNA     | microRNA   |
| MM        | Mastermix  |
| mRNA      | messenger RNA  |
| MS-PCR    | methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion   |
| OS        | Overall Survival                                     |
| OP        | Operation  |
| PCR       | Polymerase-Kettenreaktion                            |
| PFS       | Progression Free Survival                            |
| pRB       | Retinoblastomprotein                                 |
| pre-miRNA | precursor miRNA                                      |
| pri-miRNA | primary miRNA  |
| qPCR      | quantitative Real-Time PCR                           |
| qRT-PCR   | quantitative Reverse Transkriptase PCR               |
| RISC      | RNA-induzierter Silencing-Komplex                    |
| RNA       | Ribonukleinsäure                                     |
| RNase     | Ribonuklease   |

|      |                                     |
|------|-------------------------------------|
| RT   | reverse Transkription               |
| STR  | subtotal resection                  |
| TRBP | TAR RNA binding protein             |
| VES  | Veränderung des Expressionsstatus   |
| VMS  | Veränderung des Methylierungsstatus |
| WHO  | World Health Organization           |



# 1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte miRNA-Expressionen und DNA-Methylierung im Primärtumor und Rezidiv des Glioblastoma multiforme. Ziel der Studie war es, epigenetische Prozesse im Glioblastom und ihre Auswirkungen auf den Verlauf dieser Erkrankung zu analysieren.

Es wurden Proben eines Primärtumors und des zugehörigen Rezidivs von Glioblastomen von 19 Patienten, die im Zeitraum von 2006 bis 2015 entnommen wurden, untersucht. Die Expressionsraten der miRNA-21, -24, -26a und -181d wurden mit quantitativer Real-Time PCR bestimmt. Der Methylierungsstatus von p15, p16 und MGMT wurde durch methylierungsspezifische PCR analysiert. Für die miRNA-181d zeigte sich eine signifikant höhere Expressionsrate im Primärtumor als im Rezidiv und könnte somit ein epigenetischer Marker für die Krankheitsprogression sein. Für miRNA-21, -24 und -26a waren keine signifikanten Veränderungen der Expression im Vergleich von Primär- und Rezidivtumor nachweisbar. Bei keiner der untersuchten miRNAs waren signifikante Korrelationen zwischen den Expressionsraten und der klinischen Progression nachweisbar. Ein methylierter MGMT-Status zeigte sich im Verlauf der Erkrankung meist stabil. Es zeigten sich keine signifikanten Korrelationen der Methylierungsstatus von p15 und p16 mit dem klinischen Verlauf. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass methylierte p15- und p16-Status bei Krankheitsprogression zu unmethylierten Status konvertieren und sich daraus neue Möglichkeiten für die Verlaufskontrolle einer Glioblastomerkrankung ergeben könnten.

## 1.1 Abstract

The present work investigated miRNA expressions and DNA methylation in primary and recurrent glioblastoma multiforme. The aim of the study was to analyze epigenetic processes and their impact on the course of glioblastoma disease.

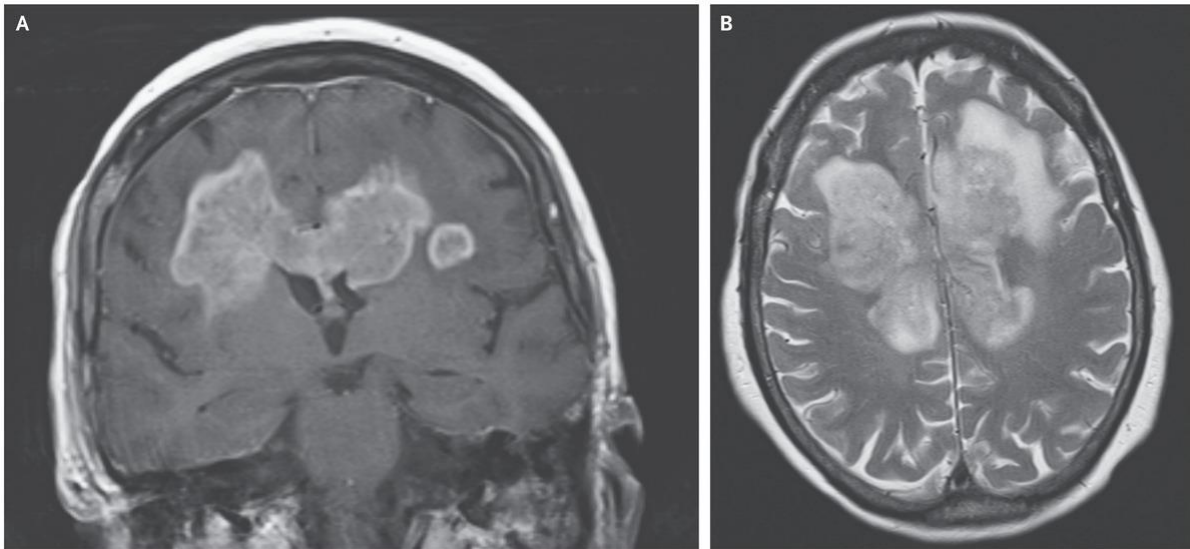
Primary and recurrent tumor material was sampled from 19 patients between 2006 and 2015. The expression rates of miRNA-21, -24, -26a and -181d were analyzed by quantitative real-time PCR, the methylation status of p15, p16 and MGMT by methylation-specific PCR. For miRNAs, miRNA-181d expression level in primary tumor was found to be significantly higher than in recurrent tumors and could be an epigenetic marker for disease progression. There were no significant changes in the expression levels of miRNA-21, -24, and -26 when comparing primary and recurrent tumors. For all other miRNAs correlation analysis of

expression rates and clinical progression was inconclusive. For methylation status, a methylated MGMT status was mostly stable during the progression of the disease. No significant correlations of the methylation status of p15 and p16 with the clinical course were found. Our results suggest that methylated p15 and p16 status convert to unmethylated status upon disease progression. This may open up new possibilities for monitoring the progression of glioblastoma disease.

## 2. Einleitung

### 2.1 Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme ist der häufigste maligne hirneigene Tumor des Menschen [1]. Er entsteht in der weißen Substanz des zentralen Nervensystems und ist am häufigsten im Großhirn lokalisiert, wo er sich infiltrativ wachsend ausbreitet. Dabei bevorzugt er vor allem den Frontal- und Temporallappen als Entstehungsort [2]. Von dort aus kann das GBM übergreifend auf die gegenüberliegende Seite des Großhirns wachsen. Aufgrund seiner Darstellung wird das GBM dann auch als „Schmetterlingsgliom“ bezeichnet (siehe Abbildung 1) [3].



**Abbildung 1 aus Siddiqui, Juveria, and Anant S. Krishnan. "Butterfly glioma." New England Journal of Medicine 378.3 (2018): Ein Glioblastom kann sich, im Aussehen an einen Schmetterling erinnernd, über beide Gehirnhemisphären ausbreiten.**

Das Glioblastom kann „de novo“ (primäres Glioblastom) entstehen oder sich aus niedrigmalignen Gliomen (sekundäres Glioblastom) entwickeln. Der Begriff „multiforme“ beschreibt, dass sich das Glioblastom in seiner Struktur und Zusammensetzung durch Blutgefäßinfiltration und Nekrosen auszeichnet. Es ist somit inhomogen und ohne einheitliche Gewebsstruktur. [4, 5]

Das mittlere Alter bei Erstdiagnose liegt typischerweise zwischen 60 und 70 Jahren [6]. Als gesicherter Risikofaktor zählt u.a. die Exposition durch ionisierende Strahlung [7].

Durch ein oftmals schnelles Wachstum des Tumors kann sich die Erkrankung klinisch innerhalb kürzester Zeit äußern. Die klinische Erscheinung ist dabei vielfältig. So treten neurologische Symptome wie Krampfanfälle, Wesensveränderungen, Aphasie, Lähmungen oder Sehstörungen abhängig von der Lokalisation des Tumorgewebes auf. [6]

Die Prognose bei Diagnose ist zum jetzigen Zeitpunkt infaust, eine Heilung ist nicht möglich. Ohne jegliche Behandlung beträgt das mittlere Überleben ca. drei Monate [8]. Unter Standardtherapie beträgt das mittlere Überlebensalter bei Erstdiagnose heutzutage im Durchschnitt 15 Monate [9, 10]. Mit einer Therapie möchte man eine möglichst lange Überlebenszeit bzw. ein langes rezidivfreies Intervall erreichen.

Als Standardtherapie ist die Kombination aus bestmöglich operativer Entfernung der Tumormasse, gefolgt von einer adjuvanten Radiotherapie in Kombination mit einer Chemotherapie mit Temozolomid etabliert [9, 10]. Weitere Therapiemöglichkeiten stellen unter anderem die Carmustin-Wafer-Implantation oder die Behandlung durch Tumortherapiefelder dar [9]. Eine operative Entfernung der sichtbaren Tumormasse kann, wenn Lage und Ausbreitung es erlauben, oft den Großteil des Tumors eliminieren. Jedoch infiltrieren einzelne Tumorzellen diffus das Gehirn, so dass Tumoranteile im Gehirn verbleiben. [11]

Häufig kommt es zum Auftreten eines Rezidivs. Das mediane Überleben nach Diagnose eines Rezidivs beträgt drei bis sechs Monate [12]. Die Progression der Erkrankung wird meist mittels MRT-Bildgebung alle zwei bis drei Monate überwacht. Eine Therapie kann unter anderem in Form einer erneuten Operation, Bestrahlung oder Chemotherapie erfolgen. In den letzten Jahren hat sich die Mono- oder Kombinationstherapie mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab als erfolgsversprechende Therapiemöglichkeit des rezidivierenden Glioblastoms entwickelt. Derzeit gibt es keinen etablierten Standard zur Therapie eines Rezidivs. [13-15]

## 2.2 Epigenetische Modifikation

Die DNA stellt den Träger der Erbinformationen jedes Lebewesens dar. Epigenetische Veränderungen beschreiben Mechanismen der Modifikation von Erbmaterial, ohne dass dabei die Nukleotidsequenz der DNA verändert wird. Das bedeutet, dass das Genom trotz gleicher DNA-Sequenzen verschiedene Modifikationen von Phänotypen und Genexpressionsprofilen aufweisen kann. Solche epigenetischen Modifikationen werden durch äußere Einflüsse reguliert bzw. induziert und besitzen die Fähigkeit, Abschnitte der DNA ein- oder auszuschalten. Zu den epigenetischen Mechanismen gehören unter anderem, neben der Methylierung von DNA, die Funktionen unterschiedlicher microRNAs. [16-18]

### 2.2.1 MicroRNA

#### 2.2.1.1 Synthese

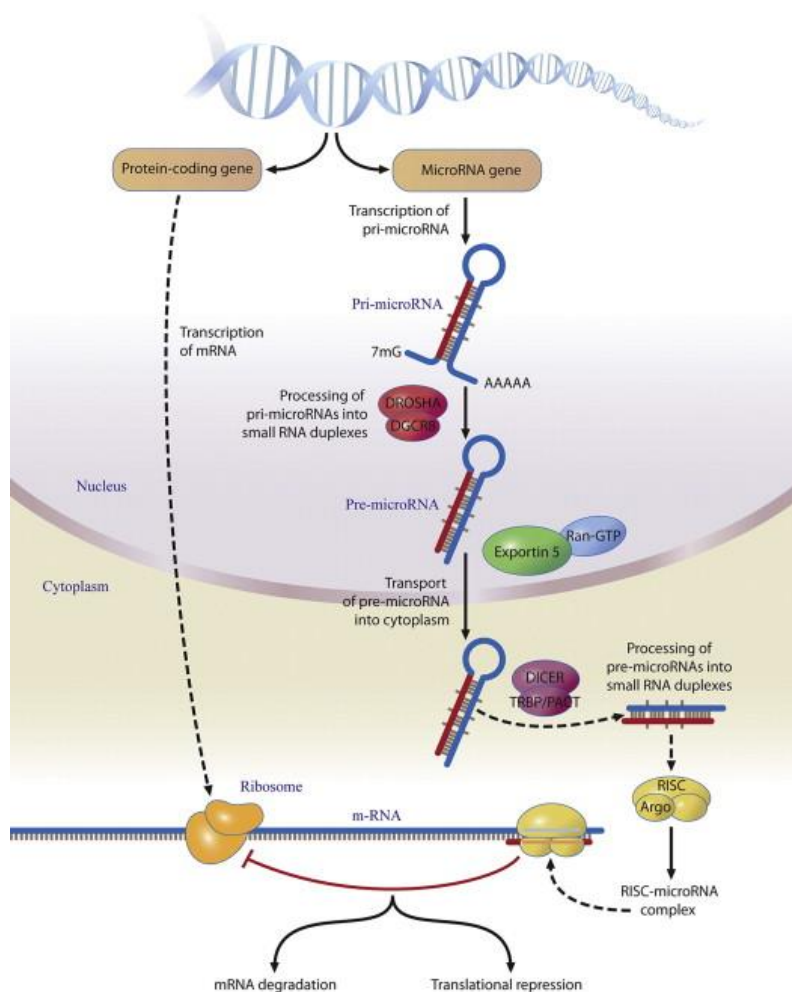
MicroRNAs spielen eine relevante Rolle in biologischen Vorgängen wie Zellproliferation, -differenzierung und -tod sowie bei Stoffwechselprozessen [19, 20]. Im Jahr 1993 wurde die erste miRNA identifiziert [21], bis heute ist eine genaue Anzahl nicht bekannt. Schätzungen belaufen sich auf mehrere hundert bis tausend verschiedene miRNAs. Nach der Erstentdeckung konnte gezeigt werden, dass sich miRNAs als gängig vorkommende Strukturen in allen eukaryotischen Zellen finden lassen. MiRNAs werden nach zeitlicher Reihenfolge der Sequenzierung nummeriert. Buchstaben-Präfixe bezeichnen die zugehörige Spezies der miRNA (z.B. „hsa-“ für Homo sapiens). Verwandte reife Sequenzen werden mit Buchstaben-Suffixen gekennzeichnet, wie z.B. miRNA-26a und miRNA-26b. Somit lassen sich miRNAs in familiäre Gruppen einteilen. Eine andere Einteilung ist die in verschiedene Cluster. Ein miRNA-Cluster ist ein Satz von zwei oder mehr miRNAs, die von physikalisch benachbarten miRNA-Genen transkribiert werden. [22-24]

MiRNAs sind kurzkettige, nicht-codierende RNA Moleküle aus ca. 22 Nukleotiden. Sie können Genexpressionen posttranskriptionell mittels Gen-Silencing regulieren, indem sie mit der mRNA interagieren. MiRNAs werden von der RNA-Polymerase II transkribiert. Zunächst wird eine pri-miRNA synthetisiert, an dessen 3' Ende sich ein Poly-A-Schwanz und am 5' Ende ein 7-Methylguanosin-Cap befindet. Diese wird über einen Enzymkomplex, bestehend aus der RNase „Drosha“ und dem dsRNA-Bindeprotein DGCR8 „Pasha“, in pre-miRNAs umgewandelt. Diese werden mittels Exportin-5 in das Zytoplasma exportiert. Die entstandenen pre-miRNAs weisen charakteristische Stamm-Loop-Haarnadel-Sekundärstrukturen auf (siehe Abbildung 2).

Im Zytoplasma werden die pre-miRNAs enzymatisch durch das Enzym „Dicer“ in ds-miRNAs geschnitten. Die entstandenen miRNA-Duplexes werden durch die Reaktion von „Dicer“ mit Hilfe des ds-RNA Bindeprotein TRBP und weiteren Co-Faktoren aufgespalten und zu Einzelsträngen entwunden. Der Einzelstrang, an dem sich das 5' Ende befindet, bildet die fertige miRNA. Die Verarbeitung durch „Dicer“ führt neben dem reifem miRNA-Strang zu einem gegenüberliegenden Strang, der abgebaut wird. Die miRNA kann jetzt in den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) integriert werden und die Genexpression modulieren. Dies geschieht durch Störung der Translation der Ziel-mRNA (siehe Abbildung 3). Die miRNAs regulieren ihre Targets durch komplementäre Sequenzpaarung an die 3'UTR, einem untranslatierten Bereich der mRNA, welcher sich an die codierende Region anschließt. [25-29]



**Abbildung 2:**  
Vereinfachte Darstellung der Haarnadelstruktur einer pre-miRNA



**Abbildung 3** aus Sand, M., et al., **MicroRNAs and the skin: tiny players in the body's largest organ.: miRNA Synthese und posttranskriptionelles Gensilencing**

### **2.2.1.2 Funktion**

Bereits veröffentlichte Studien zeigten, dass miRNAs am Tumorprozess beteiligt sind. Sowohl Über- als auch Unterexpressionen verschiedener miRNA-Expressionsmuster konnten mit der Entstehung bzw. der Hemmung maligner Zellveränderungen unterschiedlicher Organe in Verbindung gebracht werden. Zu den am besten erforschten onkogenen miRNA Clustern zählt das miRNA-17-92 Cluster [30]. Ihre Überexpression wurde in verschiedenen Tumorarten wie Brust-, Lungen-, Prostata- und Gastrointestinaltumoren nachgewiesen [31, 32]. Gleichzeitig werden einigen miRNAs auch Tumorsuppressor-Funktionen zugeschrieben, wenn sie vermehrt exprimiert werden. Die miRNA-34 Familie gehört zu den tumorsuppressiven miRNAs. MiRNA-34b und -c zeigten sich in einer Studie bei Lungentumoren vermindert exprimiert, wodurch es zu einem Anstieg der Tumorzellproliferation kam. Durch Transfektion dieser miRNAs konnte hingegen ein Rückgang des Wachstums beobachtet werden. MiRNAs werden so in zwei Typen unterteilt: Onkogene miRNA, wie das miRNA-17-92 Cluster, und tumorunterdrückende miRNA, wie miRNA-34. [33]

Ein im Jahr 2002 eingerichtetes miRNA-Register mit dem Namen „miRBase“ dient als primäre Online-Datenbank für alle potenziellen miRNA-Sequenzen und liefert Informationen wie Nomenklatur oder Gen-Lokalisation. Die Datenbank ist unter dem Namen „Rfam database“ (Rfam Version 14.1, January 2019, <http://rfam.xfam.org/>) zu erreichen [34].

### **2.2.1.3 MicroRNAs im Glioblastom**

Bisherige Studien konnten bereits die Auswirkung unterschiedlicher miRNA-Expressionsniveaus auf die Glioblastomerkrankung zeigen. Ein Beispiel ist die miRNA-182, für die bei Überexpression ein Zusammenhang mit einem niedrigeren Gesamtüberleben von Gliompatienten nachgewiesen werden konnte [35]. Beim GBM geht die vermehrte Expression einer miRNA nicht immer mit einer schlechteren Prognose einher. Untersuchungen zeigten, dass eine verminderte Expression der miRNA-328 bei Glioblastom-Patienten mit einem niedrigeren Gesamtüberleben assoziiert war [36]. In einer Studie mit der miRNA-34 Familie konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass die miRNA-34a im GBM vermindert exprimiert war und durch ihre Zugabe das Tumorstadium inhibiert werden konnte [37].

In der vorliegenden Arbeit wurden die miRNA-21, -24, -26a und -181d im Glioblastom untersucht. Im Jahr 2005 entdeckten Chan et al., dass die miRNA-21 im GBM stark überexprimiert war [38]. Diese miRNA gehört zu den mit am meisten untersuchten miRNAs im Glioblastom und gilt als die am häufigsten hochregulierte miRNA in verschiedenen menschlichen Krebsarten [39]. MicroRNA-21 wird durch das MIR21-Gen kodiert. Das

microRNA-21-Gen befindet sich auf dem Plus-Strang des Chromosoms 17q23.2. MicroRNA-21 hemmt den Zelltod in Tumoren und fungiert so vermutlich als eine Art Onkogen [38]. Die Überexpression wird mit einem schnelleren Tumorprogress nach Operation des GBM Primärtumors assoziiert. Einige Studien zeigten, dass die Überexpression im GBM mit einer schlechten Prognose verbunden ist [17, 40, 41]. Corsten et al. konnten nachweisen, dass der Knockdown von miRNA-21 die Bildung von Glioblastomzellen signifikant unterdrückte. Die kombinierte Suppression von miRNA-21 und NPC-S-TRAIL führte dazu, dass die Apoptose Aktivität erhöht und die Zellviabilität in menschlichen Gliomzellen in vitro erniedrigt wurde. Dies bestätigte sich in vivo im Tierversuch [42]. MicroRNA-21 wurde somit bereits als wertvoller Marker für epigenetische Prozesse im GBM identifiziert. Matos et al. untersuchten die miRNA-21 Expression in GBM Primärtumoren und Rezidiven. In ihrer Studie zeigte sich eine erhöhte Expression von miRNA-21 in primären und rezidivierenden GBM, obwohl die Hochregulierung in rezidivierenden Tumoren im Vergleich zu Primärtumoren deutlich geringer ausfiel. Auch Matos et al. zeigten, dass miRNA-21 an der Pathogenese des GBM beteiligt ist, indem es verschiedene Gene beeinflusst, die an der Invasion, der Proliferation, am Tumorwachstum oder in die Chemo-Resistenz involviert sind [43]. In einer Studie unseres neurochirurgischen Forschungslabors am Universitätsklinikum des Saarlandes konnte für die miRNA-21 eine signifikante Überexpression in GBM Proben im Vergleich zu Nicht-Gliom-Proben erkannt werden. Allerdings konnte keine Korrelation zwischen miRNA-21 Expression und progressionsfreiem Überleben oder Gesamtüberleben gefunden werden. Im Gegensatz dazu gibt es vereinzelt auch Literatur, die für miRNA-21 einen anti-onkogenen Effekt beschreibt [44, 45].

MicroRNA-181d ist eine im Vergleich zu miRNA-21 noch wenig untersuchte, vermutlich tumorsuppressive miRNA im Glioblastom. Unser neurochirurgisches Forschungslabor untersuchte die miRNA-181d Expression im Glioblastom und den Einfluss auf die Behandlungsreaktionen einer Carmustin-Wafer-Implantation. Glioblastompatienten mit niedriger miRNA-181d Expression, die mit einer Carmustin-Wafer-Implantation behandelt wurden, zeigten ein signifikant längeres Gesamt- und progressionsfreies Überleben als Patienten mit hoher miRNA-181d Expression, die ebenfalls diese Therapie erhielten. Wang et al. konnten in ihrer Studie Zusammenhänge von miRNA-181d und den Onkogenen Bcl-2 und K-Ras nachweisen. K-ras und Bcl-2 wurden als direkte Ziele der miRNA-181d identifiziert und waren in Gliomzellen hochreguliert. Die Ergebnisse zeigten einen Zusammenhang zwischen der Tumorsuppressor Aktivität von miRNA-181d in Gliomzellen und den K-ras-bezogenen PI3K/AKT- und MAPK/ERK-Signalwegen, die an der Regulation von Zelldifferenzierung, -wachstum und Apoptose beteiligt sind. Die Expression von miRNA-181d unterdrückte die Zellproliferation und löste Zellzyklus-Arrest und Apoptose in Gliom-Zelllinien aus. Zhang et al.



konnten in ihrer Studie mit 82 Glioblastomproben zeigen, dass MGMT posttranskriptionell durch miRNA-181d reguliert wird. Ihre Studie lässt vermuten, dass miRNA-181d direkt mit der MGMT 3'UTRI interagiert, um MGMT auf posttranskriptioneller Ebene zu regulieren. Die miRNA-181d wurde als ein wichtiger Regulator in posttranskriptionellen Prozessen von MGMT im GBM erkannt, indem sie den Abbau von MGMT-mRNA induziert. Kreth et al. bezeichneten diese Erkenntnis als neue Art des MGMT- Silencing. [46-51]

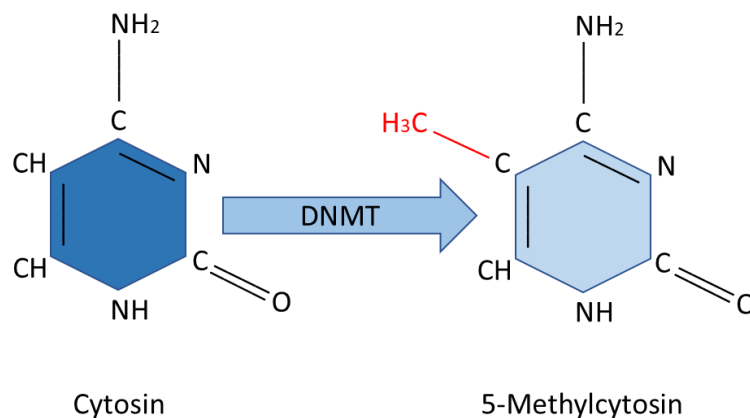
Zu der miRNA-24 Expression im Glioblastom ist die Datenlage im Vergleich zu den bisher genannten miRNAs geringer. Unsere neurochirurgische Arbeitsgruppe beschäftigte sich in einer Studie mit der miRNA-24 und ihrer Rolle im Glioblastom. Es zeigte sich zwischen der miRNA-24 Expression und dem Gesamt- und progressionsfreiem Überleben keine signifikante Korrelation. Eine hohe Expression war tendenziell mit einem verlängerten Gesamtüberleben assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass miRNA-24 zu den Regulatoren des P15/P16/RB1/E2F-Signalwegs gehört, der das Verhalten und die Prognose des GBM beeinflusst [52, 53]. Sippl et al. konnten das Ergebnis einer Studie von Giglio et al., in der miRNA-24 als ein Regulator des P15/P16/RB1/E2F-Signalweg fungiert, indem sie die Expression von P16 reguliert [54], nicht bestätigen. So konnte in der Studie unserer Arbeitsgruppe die miRNA-24 in eingeschränkter Weise als potenziellen Prädiktor für den klinischen Verlauf beim GBM identifiziert werden [55]. Chen et al. untersuchten die miRNA-24 Expression in malignen Gliomen. Sie hatten zuvor miRNA-27b als überexprimierte miRNA in malignen Gliomen identifiziert, die sich im gleichen Cluster wie miRNA-24 befindet. Sie konnten zeigen, dass miRNA-24 im GBM im Vergleich zu niedriggradigen und anaplastischen Gliomen hoch exprimiert wurde. Eine verminderte Zellebensfähigkeit konnte in Gliomzellen beobachtet werden, die eine niedrige miRNA-24 Expression aufwiesen. Chen et al. verwendeten ein As-miR-24 Oligonukleotid, um die miRNA-24 Expression zu unterdrücken. In zwei Gliom-Zelllinien verursachte die miRNA-24 Inhibition einen Zellzyklus-Arrest in der G0/G1-Phase. Darüber hinaus unterdrückte eine verminderte Expression von miRNA-24 signifikant die Tumorigenität von Gliomzellen im Tierversuch. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Deletion von miRNA-24 die Proliferation von Gliomzellen unterdrückt. [56, 57]. Eine weitere Studie von Xiuju et al. zeigte, dass ein Zusammenhang zwischen dem Tumorsuppressor SOX7 und der miRNA-24 besteht, indem miRNA-24 die Transkription dieses Tumorsuppressors negativ beeinflusste [58].

MicroRNA-26a zeigte in bisherigen Studien in unterschiedlichen Tumoren sowohl tumorfördernde als auch tumorhemmende Eigenschaften. Im Glioblastom gehört die miRNA-26a wie die miRNA-21 zu den überexprimierten, tumorfördernden miRNAs und fungiert somit ebenfalls als Onkogen [30, 59]. Qian et al. konnten in einem Tierexperiment zeigen, dass

miRNA-26a das Tumorwachstum und die Angiogenese des GBM fördert. Dazu wurden humane Glioblastomzellen in Mäuse injiziert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die TumorgroÙe und das Tumorwachstum der miRNA-26a Gruppe erhöht. Die Expressionsniveaus von VEGF, einem Signalmoleküle der Vaskulogenese und Angiogenese, waren in der miRNA-26a Gruppe erhöht. Darüber hinaus zeigten die Tumore aus der miRNA26a-Gruppe eine erhöhte Anzahl von MikrogefäÙen. Sie identifizierten zudem Prohibitin, einen Tumorsuppressor, welcher eine Rolle bei der Modulation der Gentranskription spielt, als ein Zielgen der miRNA-26a. Die Überexpression von miRNA-26a unterdrückte die Prohibitin Expression [60]. In unserer neurochirurgischen Forschungsgruppe am Universitätsklinikum des Saarlandes konnten Sippl et al. zeigen, dass die miRNA-26a Expression positiv mit der Effektivität einer Carmustin-Wafer-Implantation und einem progressionsfreien Tumorverlauf korreliert [55, 61]. Patienten mit hoher miRNA-26a Expression, die therapeutisch eine Radio-Chemotherapie mit Carmustin-Wafer-Implantation erhielten, zeigten ein signifikant längeres Gesamt- und progressionsfreies Überleben als Patienten mit niedriger miRNA-26a Expression. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe zeigte sich ein Zusammenhang von miRNA-26a und dem P15/P16/RB1/E2F-Signalweg, der eine entscheidende Rolle im Zellzyklus, der Progression und der Gesamtprognose des GBM spielt. Die miRNA-26a Expression korrelierte signifikant umgekehrt mit der mRNA-Expression von RB1. Dabei zeigte die mRNA-Expression von RB1 einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben. Gestützt wird dieses Ergebnis durch die Arbeit von Lopéz-Urrutia et al., die nachweisen konnten, dass RB1 ein direktes Ziel der miRNA-26a darstellt. [62]. Als Beispiel für einen Tumor, in dem miRNA-26a eine tumorsuppressive Wirkung nachgewiesen werden konnte, ist das nasopharyngeale Karzinom. Lu et al. fanden heraus, dass miRNA-26a die Expression des EZH2-Onkogens in Zellen des nasopharyngealen Karzinoms stark reduzierte. So führte die EZH2-Downregulation zu einer Hemmung des Zellwachstum und der Zellzyklusprogression. Ihre Ergebnisse deuten darauf hin, dass miRNA-26a als wachstumsunterdrückende miRNA im nasopharyngealen Karzinom fungiert und dass seine suppressiven Effekte hauptsächlich durch die Unterdrückung der EZH2-Expression vermittelt werden. [63]

## 2.2.2 DNA-Methylierung

Adenin und Cytosin sind Grundbausteine der DNA und können durch Methylierung enzymatisch modifiziert und damit chemisch verändert werden [64]. In der menschlichen DNA kommt es nahezu ausschließlich zur Methylierung von Cytosin [64]. Cytosin in der Basenfolge mit Guanin wird auch als CpG-Dinukleotide oder bei hoher Dichte als CpG-Inseln bezeichnet. Bei einer Methylierung wird Cytosin durch Übertragung einer Methylgruppe (CH<sub>3</sub>-Gruppe) zu 5-Methylcytosin verändert (siehe Abbildung 4). [65, 66]



**Abbildung 4: Darstellung der chemischen Veränderung von Cytosin zu 5-Methylcytosin**

Dieser Prozess erfolgt mit Hilfe von DNMT [67]. Durch diese Modifikation bekommt das entstandene methylierte Cytosin einen hemmenden Effekt: Durch Anlagern von Proteinen an die methylierten C-G Dinukleotide kommt es zu einer Verdichtung der Nukleosomen (Histon-DNA-Partikel). Daraus folgend kann die RNA-Polymerase die DNA an diesen Stellen nicht mehr ablesen. Diese inaktiven DNA Bereiche führen dazu, dass das zugehörige Gen ausgeschaltet wird. [68]

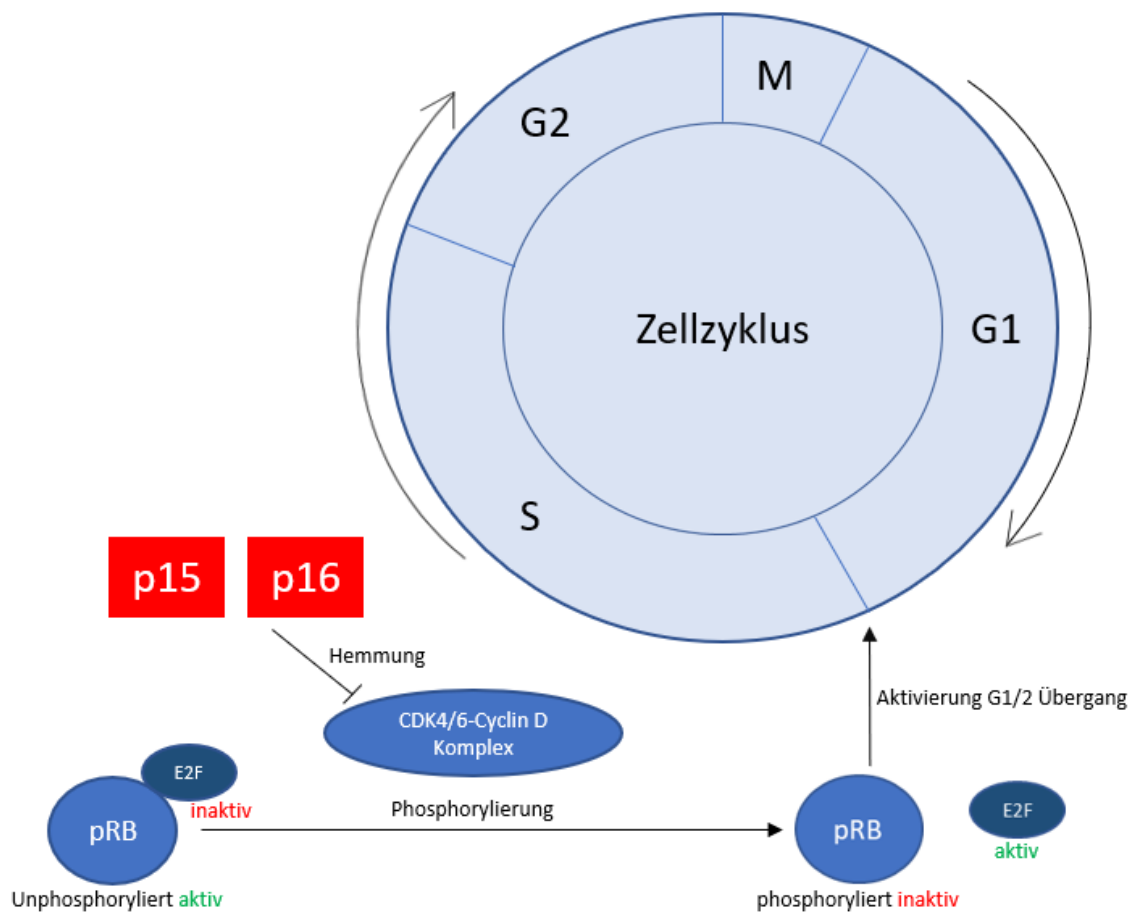
Die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, kurz MGMT, ist ein Reparaturprotein des Zellkerns und verhindert Fehler bei der DNA-Replikation und Transkription. MGMT bewirkt die Reparatur der in der Natur vorkommenden mutagenen DNA-Alkylierung des O6-Methylguanin zurück zu Guanin. Es überträgt die Methylgruppe auf sich und zerstört sich damit in der Folge selbst; man spricht deshalb von einer Selbstmordreaktion [69]. Der Methylierungsstatus der Promotorregion im Gen, das für die Expression des MGMT Proteins verantwortlich ist, entscheidet darüber, ob MGMT exprimiert wird. MGMT wird ausschließlich bei unmethylierten Status des entsprechenden Promotors gebildet; seine Methylierung verhindert die MGMT Expression. [70]

### **2.2.2.1 MGMT-Promotor-Methylierung im Glioblastom**

Die MGMT-Promotor-Methylierung konnte in mehreren Studien als therapierelevanter Marker identifiziert werden. Sie hat Auswirkung auf das Ansprechen der Behandlung von Glioblastomen mit dem alkylierenden Chemotherapeutikum Temozolomid. Dieses Chemotherapeutikum stört die Replikation der DNA. Temozolomid bindet an DNA und verursacht so den Zelltod von Glioblastomzellen. Dabei werden Quervernetzungen an der O6-Position des Guanins zwischen benachbarten DNA-Strängen gebildet. Diese Quervernetzungen werden durch MGMT gehemmt, indem MGMT die Alkylierung umkehrt. MGMT hemmt so den Zelltod von Tumorzellen durch Temozolomid und wirkt somit dem gewollten Effekt der Chemotherapie entgegen. Wenn die Promotor-Region für MGMT im Gen methyliert ist, wird MGMT nicht exprimiert. Dadurch zeigt sich die Bedeutung eines methylierten MGMT-Status für die Therapie: Temozolomid kann ungehindert wirken, weil methyliertes MGMT in seiner Funktion nicht entgegenwirken kann. Hegi et. al. konnten zeigen, dass es bei GBM Patienten zu einem längeren Überleben unter Behandlung von Temozolomid kam, bei denen ein methylierter MGMT-Status vorlag. Damit hat der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors eine entscheidende Bedeutung für die Therapie und stellt einen Prädiktor für das Ansprechen auf eine Temozolomid-Chemotherapie dar. [71-73]

### **2.2.2.2 Methylierung der Tumorsuppressoren p15 und p16**

Die Tumorsuppressoren p15 und p16 sind wichtige Bestandteile des Zellzyklus. In den einzelnen Zellzyklusphasen werden Kontrollpunkte durchlaufen, in denen mögliche Ablaufstörungen erkannt werden können. Die Tumorsuppressoren können so Zellteilungen verhindern und einer Krebsentstehung vorbeugen. Die Kontrollpunkte werden u.a. reguliert durch Cyclin-abhängige Kinasen, Cycline (Proteine, die Aktivitäten der CDK kontrollieren), das Retinoblastom-Protein sowie durch die Proteine p15 und p16, die als CDK-Inhibitoren die Cycline hemmen. Das pRB als zentrales Tumorsuppressor-Protein kontrolliert den Übergang der G1 zur S-Phase des Zellzyklus, indem es im aktiven, unphosphorylierten Status den Transkriptionsfaktor E2F hemmt. Durch Wachstumsfaktoren werden CDKs wie bspw. CDK 4/6 im Komplex mit Cyclin D aktiviert, die pRB phosphorylieren und damit inaktivieren, so dass pRB das E2F wieder freisetzt. Dieser Prozess aktiviert die S-Phase. Die Proteine p15 und p16 hemmen den Komplex von CDK 4/6 mit Cyclin D (siehe Abbildung 5). Dadurch kommt es nicht zur Inaktivierung des pRB und somit zum Block des G1/S Übergangs des Zellzyklus. [74-76]



**Abbildung 5: Stark vereinfachte Darstellung eines Ausschnittes der Zellzyklusregulierung: Funktion von p15 und p16.**

Die Tumorsuppressorgene CDKN2b und CDKN2a, die das p15 bzw. p16 Protein (p15INK4b bzw. p16INK4a) codieren, sind die am häufigsten deletierten Gene bei menschlichen Krebserkrankungen. Diese Stilllegung tritt häufig aufgrund von DNA-Methylierung der Promotorregionen auf [77]. Die Stilllegung der Tumorsuppressorgene führt zu einer fehlenden Funktion der entsprechenden Tumorsuppressorproteine. Die Methylierung des p15 bzw. p16 Gens stellt damit implizit eine Störung der physiologischen Kontrollmechanismen dar. Aufgrund der Stilllegung kommt es nicht zur Hemmung des CDK 4/6-Cyclin D Komplexes, woraufhin es zur Inaktivierung von pRB kommt. Dadurch entfällt die Kontrolle des Zellzyklus durch pRB.

Die Tumorsuppressorproteine p15 und p16 wurden im Jahr 1993 als Inhibitoren der CDK 4/6 identifiziert [78, 79]. Hermann et al. beschrieben kurz darauf in ihrer experimentellen Studie aus dem Jahr 1996 eine selektive Inaktivierung des p15-Gens durch Methylierung der

Promotorregion in Tumor-DNA von Leukämien [80]. Liggett et al. beschrieben in ihrer Studie bei Krebsarten des Verdauungstrakts (Lungen-, Speiseröhren- und Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich) bei fast 100 % aller Primärtumoren eine genetische oder epigenetische Veränderung in mindestens einer der Komponenten des p16/Cyclin D/CDK4-6/pRb-Stoffwechselweges [81]. Aktuelle Studien bestätigen den Zusammenhang einer, durch Methylierung verursachten, fehlenden Expression der Tumorsuppressorgene und den Einfluss auf Tumorerkrankungen. Lv et al. führten eine Meta-Analyse durch, um die Korrelation zwischen der p16-Methylierung und dem HCC zu bewerten. In der Meta-Analyse wurden 3105 HCCs und 808 Kontrollproben von Leberzellen untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere p16-Promotor-Methylierung im HCC als in gesunden Leberzellen. Die p16-Expression korrelierte signifikant mit einer schlechten Prognose im OS und PFS. Interessanterweise wurde aber keine Assoziation zwischen der p16-Methylierung und der Prognose von Patienten mit HCC in Bezug auf Gesamtüberleben und krankheitsfreiem Überleben gefunden [82]. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Metaanalyse von Xia et al. aus dem Jahr 2019 mit Ovarialtumoren. Die p15- und p16-Promotor-Methylierung war bei Ovarialkarzinomen höher als in normalem Ovarialgewebe. Die p16-Promotor-Methylierung war dabei nicht mit dem OS assoziiert, korrelierte jedoch mit einer schlechten Prognose beim PFS. Die Daten zeigten keine Korrelationen zwischen der p15- und p16-Methylierung und dem OS. Die Studie beschreibt die p16-Promotor-Methylierung als möglichen prognostischen Biomarker für die Vorhersage des progressionsfreien Überlebens bei Ovarialkarzinomen [83]. Zusammenfassend konnte epigenetisches Silencing von p15 und p16 in einer Variation von menschlichen Neoplasien nachgewiesen werden.

Die Methylierung von p15 und p16 im Glioblastom und die Auswirkung auf die Erkrankung wurde in Studien ebenfalls betrachtet. Die Deletion oder Mutation des Genlokus von p15 und p16 ist eine der häufigsten Veränderungen bei Gliomen [52, 53, 84, 85]. Wemmert et al. untersuchten die Methylierungsstatus von p15 und p16 in 27 Glioblastomen und korrelierten diese mit klinischen Daten. Eine Methylierung von p15 zeigte sich dabei in 37 % der Glioblastomproben, während die Methylierung von p16 eher selten (4.3 %) beobachtet wurde. Die Methylierung von p15 zeigte sich als ein signifikanter Prädiktor für ein kürzeres Gesamtüberleben der Patientin um fast 7 Monate. [86]

In einer Studie unseres neurochirurgischen Forschungslabors untersuchten Urbschat et al. den Methylierungsstatus von p15 und p16 und analysierten ihren Einfluss auf die Überlebenszeit sowie das Ansprechen auf die Radio- und Chemotherapie. Dabei wurden zwei Gruppen betrachtet: Die eine Gruppe erhielt als Therapie eine operative Resektion und eine kombinierte Standard-Chemoradiotherapie, die andere eine operative Resektion, kombinierte

Standard-Chemoradiotherapie sowie eine Carmustin-Wafer-Implantation. Ihre Ergebnisse zeigten, dass Patienten aus der Gruppe der Carmustin-Wafer-Implantation mit methylierten p15-Status ein signifikant kürzeres OS aufwiesen. Eine Promotormethylierung von p16 zeigte in keiner der beiden Gruppen einen signifikanten Einfluss auf klinische Daten. Somit konnte p15 bereits als prognoserelevanter Marker identifiziert werden. [87]

### 3. Fragestellung

Die Bedeutung von miRNA-Expressionsmustern und die DNA-Methylierung für den Krankheitsverlauf, die Prognose und den Einfluss auf die Therapie einer Glioblastomerkkrankung gehören zu den aktuellen Schwerpunkten in der Glioblastomforschung. Verschiedene Autoren diskutieren die Bedeutung einer Vielzahl verschiedener miRNAs und ihre Auswirkungen auf die Erkrankung [30, 41, 48]. Einzelne miRNAs haben unterschiedliche Relevanzen für klinische Verläufe und zellbiologische Veränderungen. Bisherige Arbeiten untersuchten hauptsächlich miRNA-Expressionsmuster und DNA-Methylierungsprozesse von Proben eines einzelnen Tumors. Das Verständnis dafür, wie Genetik und Epigenetik den Verlauf der Tumorerkrankung beeinflussen, ist in großen Teilen noch unvollständig. [43, 88] Um Erkenntnisse über longitudinale Effekte zu erlangen, wurden in dieser experimentellen Studie Tumorproben von Glioblastompatienten untersucht, bei denen zwei Tumorproben als Untersuchungsmaterial vorlagen: Die Tumorprobe eines Primärtumors und die des dazugehörigen Rezidivs.

Für die molekulargenetischen Analysen wurden in der vorliegenden Arbeit miRNA-21, miRNA-24, miRNA-26a und miRNA-181d ausgewählt. Zum longitudinalen Verhalten von miRNA-21 im Glioblastom Primärtumor und Rezidiv gibt es bereits, wenn auch wenige, veröffentlichte Studien [43, 89], so dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit bisherigen Erkenntnissen verglichen werden können. Die miRNA-24, -26a und -181d wurden in verschiedenen Studien in einzelnen Glioblastomproben untersucht [46-49, 55, 58, 60, 61]. Nach aktuellem Kenntnisstand gibt es bislang keine Studien, welche die Rolle dieser miRNAs im Hinblick auf ihr longitudinales Verhalten im Krankheitsverlauf des GBM untersucht. Die bereits erwähnten Studien zu MGMT, p15 und p16 haben gezeigt, dass diese eine bedeutende Rolle im Krankheitsverlauf des GBM spielen [86, 87, 90]. Unsere Ergebnisse sollen zu der aktuellen Forschungslage beitragen und die aktuelle Datenlage zum longitudinalen Verhalten des Methylierungsstatus von MGMT, p15 und p16 erweitern.

Die vorliegende Studie soll Antworten auf verschiedene Kernfragen liefern. Zunächst stellte sich die Frage, ob sich Glioblastom-Primärtumore und Rezidive im Hinblick auf die Expression der miRNA181d, -21, -24, und -26a bzw. auf den Methylierungsstatus von MGMT, p15 und p16 signifikant unterscheiden. Des Weiteren wurde in dieser Studie untersucht, welchen Einfluss die unterschiedlichen miRNA-Expressionen bzw. die DNA-Methylierungsstatus auf die klinische Progression der Erkrankung haben. Außerdem fragten wir uns, ob es Zusammenhänge zwischen einer Änderung des miRNA-Expressionsstatus bzw. der DNA-Methylierung und der klinischen Progression des Glioblastoms gibt. Die Ergebnisse dieser



Arbeit zielten darauf ab, mögliche neue epigenetische Marker zu identifizieren, die zur Vorhersage des Verlaufs einer Glioblastom Erkrankung von Nutzen sein könnten.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Tumormaterial**

Die experimentellen Untersuchungen wurden alle an tiefgefrorenem Tumornativmaterial, gelagert in der von Prof. Dr. med. Ralf Ketter geleiteten Tumorbank der Neurochirurgie des Universitätsklinikum des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Oertel), vorgenommen. Die verwendeten Tumorproben wurden alle in der Abteilung für Neurochirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes entnommen. Die Gewinnung der verwendeten Proben erfolgte im Zeitraum von 2006 bis 2015. Der Entnahmezeitpunkt während der Operation und die Lokalisation der Probe innerhalb des Tumors erfolgte zufällig. Die Größe der Tumorproben variierte, dabei betrug die Durchschnittsgröße ca. 0,5 cm<sup>3</sup>. Die Proben wurden unmittelbar nach Entnahme in einem Gefrierschrank bei -80 °C gelagert. Jegliche Transporte und Lagerung des Materials während der experimentellen Arbeiten wurden in dafür vorgesehenen Behältern mit flüssigem Stickstoff durchgeführt, um die Qualität des Tumormaterials nicht zu beeinträchtigen. Die klinischen Angaben zu jedem Patienten wurden dem klinikinternen ERP-System entnommen. Alle in dieser Studie durchgeführten Verfahren entsprachen den ethischen Standards der Erklärung von Helsinki aus dem Jahr 1964. Eine Genehmigung zur Verwendung des Tumormaterials wurde von der Ethikkommission eingeholt (Nr. 93/16). Jede Tumorprobe wurde hinsichtlich des MGMT-, p15- und p16-Methylierungsstatus sowie der Expressionen der miRNA-181d, -21, -24 und -26a untersucht. Die Erhebung erster Rohdaten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Luisa Braun und Frau Lisa Bohr, denen ich an dieser Stelle schonmal herzlich danken möchte.

## 4.2 MicroRNA-Analyse

### 4.2.1 RNA Isolation

Die Gewinnung von RNA (inklusive miRNA) aus Tumornativmaterial erfolgte mithilfe des miRNeasy Mini Kit nach Herstellerprotokoll (siehe Tabelle 1).

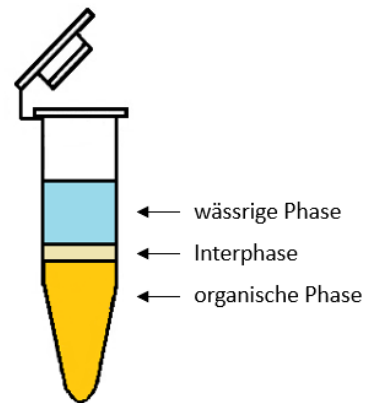
**Tabelle 1: Inhalt des miRNeasy Mini Kit**

|   |
|---|
| <b>miRNeasy Mini Kit</b>  |
| QIAGEN <sup>®</sup> , Hilden, Germany                                       |
| RNeasy™ Mini Spin Columns<br>(each packaged with a 2 ml<br>Collection Tube) |
| Collection Tubes (1.5 ml)   |
| Collection Tubes (2 ml)   |
| QIAzol <sup>®</sup> Lysis Reagent   |
| Buffer RWT  |
| Buffer RPE  |
| RNase-Free Water  |
| Handbook  |

Zur Vorbereitung wurden 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 700 µl QIAzol<sup>®</sup> Lysis Reagent sowie die gleiche Anzahl Zentrifugenröhrchen mit ca. 5 ml Aqua dest. befüllt. Von der Tumornativprobe wurde in einer Petrischale ein ca. 0,2 cm<sup>3</sup> großes Stück mit einem Skalpell abgetrennt und unter einem Abzug in den mit QIAzol<sup>®</sup> Lysis Reagent gefüllten Zentrifugenröhrchen gegeben. Nun wurde der Ansatz mithilfe eines Dispergiergeräts homogenisiert und anschließend mit einem der Aqua dest. befüllten Zentrifugenröhrchen gesäubert. Anschließend folgte die Inkubation des Ansatzes bei Raumtemperatur (15-25 °C) für fünf Minuten. Nach Überführung des Ansatzes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde 140 µl Chloroform hinzugegeben und für 15 Sekunden mit einem Vortexmischer vermischt. Danach erfolgte eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur für 180 Sekunden mit anschließender Zentrifugierung bei 12000 rpm bei 4 °C für 15 Minuten. Die wässrige Phase des Ansatzes, die sich nun als oberste Schicht im Reaktionsgefäß abgesetzt hat, wurde anschließend in ein

neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es war darauf zu achten, dass die Interphase des Ansatzes nicht mit übernommen wurde (vgl. Abbildung 6).

Es folgte die Zugabe von 525 µl Ethanol und Durchmischung des Ansatzes. Darauffolgend wurde 700 µl Probe, einschließlich jeglichen Niederschlags, in ein RNeasy™ Mini Spin Column mit zugehörigem 2 ml Collection Tube überführt und bei 8000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Collection Tube wurde verworfen und ersetzt. Dieser Schritt wurde



anschließend mit dem Rest der Probe wiederholt. Im Folgenden erfolgte die Zentrifugierung immer bei gleicher Geschwindigkeit und immer mit anschließender Verwerfung des Collection Tube. Dem Ansatz wurden

**Abbildung 6: Darstellung der Phasen des Ansatzes im Reaktionsgefäß**

700 µl Buffer RWT in den RNeasy™ Mini Spin Column zugegeben und zentrifugiert. Danach wurden 500 µl Buffer RPE in den RNeasy™ Mini Spin Column gegeben und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal hintereinander durchgeführt, beim zweiten Mal erfolgte die Zentrifugierung für zwei Minuten. Anschließend wurde der RNeasy™ Mini Spin Column auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 40 µl RNase-free Water direkt auf die Membran pipettiert und dann für die Eluierung bei 8000 rpm für 60 Sekunden zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 15 µl RNase-free Water wiederholt und dabei dasselbe Reaktionsgefäß verwendet. Das fertige RNA Konzentrat wurde schlussendlich bei -20 °C gelagert und die Konzentration anschließend photometrisch bestimmt.

Für die Verdünnung der zuvor isolierten RNA wurde die Konzentration mittels Spectrophotometer photometrisch bestimmt. Dazu wurde das Gerät zunächst mittels RNase-freiem Wasser kalibriert und mit VWR Light-Duty Tissue Wipers gereinigt. Von der isolierten RNA wurden je 1,5 µl zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Die Konzentration lag zwischen 17 ng/µl – 23 ng/µl. Die Reinheit der RNA wurde aus dem Absorptionsverhältnis der Wellenlängen 260 nm und 280 nm ermittelt.

## 4.2.2 Reverse Transkription

### 4.2.2.1 Prinzip

Die reverse Transkription (RT) beschreibt den umgekehrten Prozess der Transkription, die durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) katalysiert wird. Dabei wird die zuvor isolierte RNA in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Die synthetisierte cDNA wird anschließend für die quantitative Real-Time PCR (qPCR) verwendet. Die Kombination aus reverser Transkription und anschließender qPCR wird auch als quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR) bezeichnet. [91, 92]

### 4.2.2.2 Durchführung

Die reverse Transkription wurde mit Hilfe des TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit durchgeführt (siehe Tabelle 2). Bei der nachfolgenden Methodenbeschreibung wurden fünf Proben parallel untersucht.

**Tabelle 2: Inhalt des TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit**

|   |
|---|
| <b>TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit<br/>Applied Biosystems® Life Technologies,<br/>Darmstadt, Germany</b> |
| RT Buffer   |
| dNTP  |
| RNase Inhibitor   |
| MultiScribe™ RT Enzyme  |

In der Vorbereitung wurden die Bestandteile des Kits sowie die fünf RT-Primer der miRNAs (siehe Tabelle 3) auf Eis aufgetaut.

**Tabelle 3: miRNA Primer**

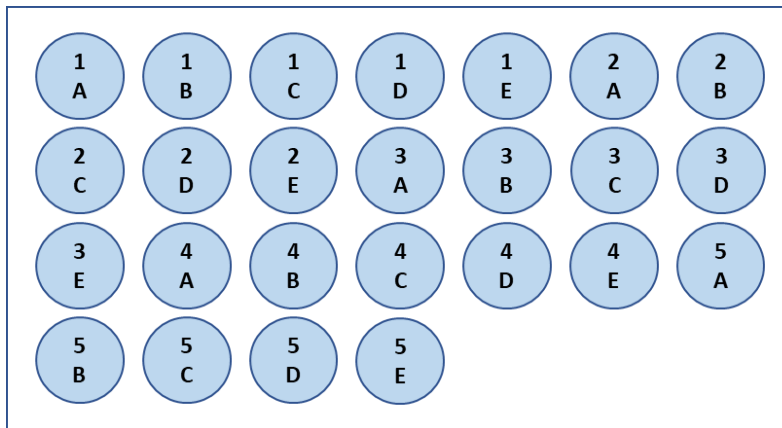
| <b>TaqMan™ MicroRNA Assay</b><br>ThermoFisher Scientific, USA | <b>Assay ID</b> |
|---|-----------------|
| RNU48   | 001006          |
| hsa-miR-181d  | 001099          |
| hsa-miR-21  | 000397          |
| hsa-miR-24  | 000402          |
| hsa-miR-26a   | 000404          |

Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis. Aufgrund der Temperaturempfindlichkeit wurde die reverse Transkriptase (MultiScribe™ RT Enzyme) erst unmittelbar vor Verwendung aus der Kühlung genommen. Die einwandfreie Sauberkeit des Arbeitsplatzes sowie der verwendeten Pipetten war Voraussetzung für verwertbare Ergebnisse der RT, sodass diese vor Arbeitsbeginn mittels RNaseZAP™ gründlich desinfiziert worden sind. Obligat war das Tragen eines Mundschutzes. Anschließend erfolgte die Erstellung des Mastermix für die RT, die für fünf Tumorproben ausreichend war (siehe Tabelle 4). Zuletzt wurde die reverse Transkriptase hinzu pipettiert und der Mastermix für zehn Sekunden gevortext.

**Tabelle 4: Mastermix für die reverse Transkription**

| <b>Mastermix RT</b>    | <b>Mengenangabe</b> | <b>Mengenangabe für 5 Proben in µl</b> |
|------------------------|---------------------|--|
| dNTP                   | 0,15                | 4,125                                  |
| RT-Puffer              | 1,5                 | 41,25                                  |
| RNase Inhibitor        | 0,19                | 5,23                                   |
| PCR Wasser             | 4,16                | 114,4                                  |
| MultiScribe™ RT Enzyme | 1                   | 27,5                                   |

Es wurden 25 von 0,2 ml PCR-Gefäße mit dem jeweiligen RNA Isolat-Probennamen und zugehörigem Primer beschriftet (siehe Schema Abbildung 7). In diese wurden nun je 7 µl Mastermix, 5 µl RNA-Probenisolat und 3 µl RT-Primer pipettiert. Wichtig war das anschließende vortexen der PCR-Gefäße für wenige Sekunden.



A = RNU48  
 B = miRNA181d  
 C = miRNA21  
 D = miRNA24  
 E = miRNA26a

1-5 = RNA Probennamen

**Abbildung 7: Pipettierschema der 0,2 ml PCR-Gefäße für die RT**

Zuletzt wurden die fertig versetzten RNA Isolate im Thermal Cycler inkubiert (siehe Tabelle 5). Die fertige miRNA-cDNA wurde anschließend bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

**Tabelle 5: Schritte der reversen Transkription im Thermal Cycler**

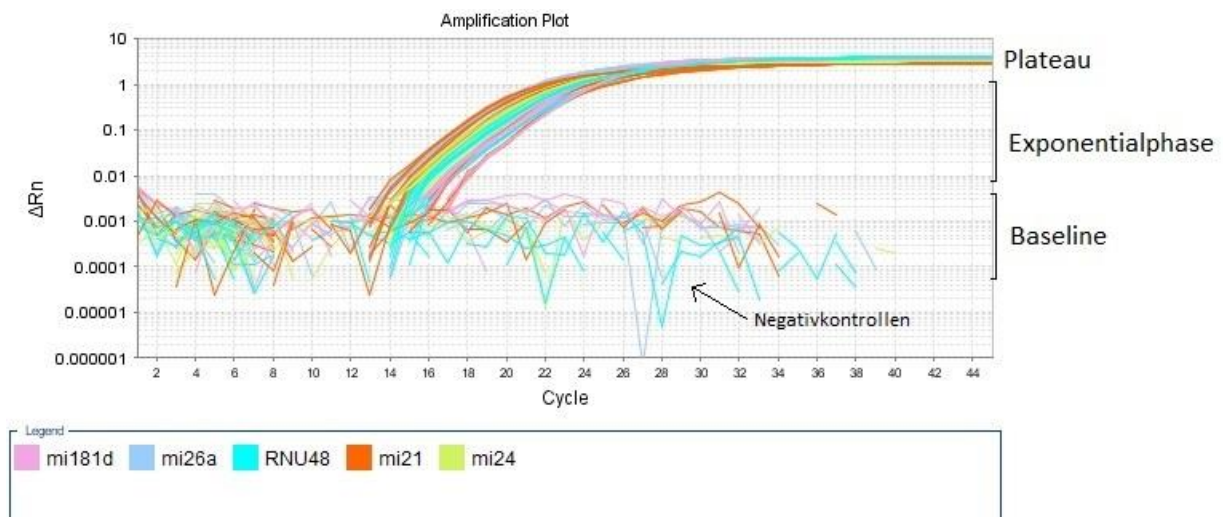
| Schritt       | Zeit [min] | Temperatur [°C] | Zyklen |
|---------------|------------|-----------------|--------|
| Annealing     | 30         | 16              | 1      |
| Extension     | 30         | 42              | 1      |
| Denaturierung | 5          | 85              | 1      |
| Lagerung      | ∞          | 4               | 1      |

## 4.2.3 Quantitative Real-Time PCR

### 4.2.3.1 Prinzip

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) stellt eine Variante der PCR dar und dient der Vervielfältigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Hier wird die in der reversen Transkription hergestellte cDNA als Ausgangsmaterial verwendet. Die Quantifizierung erfolgt mittels Fluoreszenz-Messungen, die im Verlauf von PCR-Zyklen in Echtzeit gemessen werden. Der Fluoreszenzanstieg verhält sich dabei proportional zur Menge der PCR-Produkte. Die Quantifizierung erfolgt schließlich anhand der detektierten Fluoreszenzsignale am Ende mehrerer Zyklen eines Laufs in der exponentiellen Phase der PCR. [93]

Zur Quantifizierung von qPCR Ergebnissen stehen zwei Methoden zur Verfügung: Absolute Quantifizierung und relative Quantifizierung. Die in dieser Studie verwendete Quantifizierungsmethode ist die relative Quantifizierung. Relative Expressionsniveaus einer miRNA werden relativ zu einer Referenzkontrolle berechnet. Die hier vorliegenden miRNA Expressionsdaten wurden mit RNU48, als nachweislich stabile Referenz-miRNA, normalisiert [94]. Die Menge der miRNA in einer Probe wird durch  $FC = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct-miRNA - Ct-RNU48)}$  angegeben ( $\Delta Ct = Ct-miRNA - Ct-RNU48$ ). Der Ct-Wert (Schwellenwertzyklus) beschreibt ein relatives Maß für die Konzentration des Targets in der PCR-Reaktion. Er entspricht der Menge an PCR-Zyklen, bei der das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert überschreitet. [93]



**Abbildung 8: Beispiel eines Amplifikationsplots einer qPCR aus der vorliegenden Studie.**

Abbildung 8 zeigt beispielhaft einen Amplifikationsplot einer quantitativen Real-Time PCR. Die y-Achse ( $\Delta Rn$ ) bezeichnet das Fluoreszenzsignal, die x-Achse (Cycle) die Anzahl der PCR-Zyklen. Die Baseline stellt die PCR-Zyklen dar, in denen sich ein Fluoreszenzsignal



akkumuliert, welches aber unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Bei Überschreitung des Schwellenwertes (Ct) beginnt die Exponentialphase. Dort findet die Verdopplung unter optimalen Bedingungen statt und wird deshalb zur Quantifizierung genutzt. In der Plateauphase findet keine Verdopplung mit exponentieller Rate mehr statt und das PCR-Produkt nimmt nur noch wenig oder gar nicht mehr zu. [93]

#### 4.2.3.2 Durchführung

Für die Durchführung einer jeden qPCR wurde eine MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml) verwendet. Von jeder cDNA der zugehörigen miRNA wurden dreifach Ansätze (Triplets) vorgelegt. Zusätzlich lief H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle zu jedem Primer-Assay mit. Es wurden insgesamt 5 x 1,5 ml Reaktionsgefäße für je einen Mastermix des zugehörigen Primers beschriftet (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6: Beschriftung der Mastermixe der Primer**

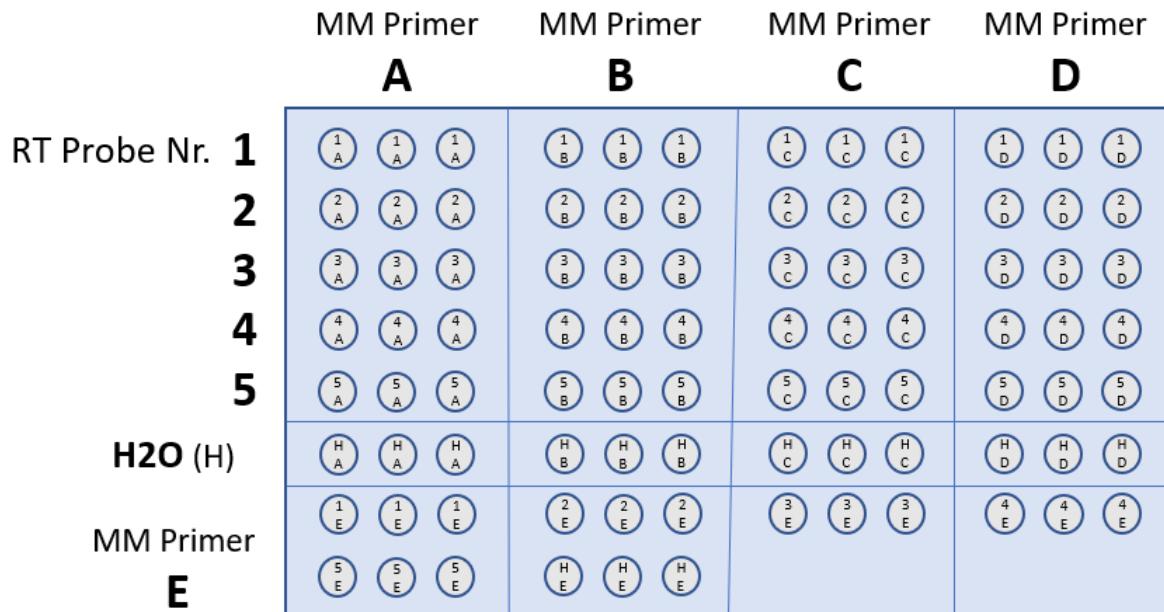
| Mastermix<br>Primer Assay | Beschriftung |
|---------------------------|--------------|
| RNU 48                    | A            |
| miRNA181d                 | B            |
| miRNA21                   | C            |
| miRNA24                   | D            |
| miRNA26a                  | E            |

Alle nachfolgenden Schritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, auf Eis. Die einwandfreie Sauberkeit des Arbeitsplatzes sowie der verwendeten Materialien war analog zu der Arbeitsweise im Schritt der reversen Transkription sicherzustellen. Es erfolgte die Herstellung der Mastermixe (siehe Tabelle 7) in die jeweilig dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße A-E.

**Tabelle 7: Mastermix für die qPCR**

| Mastermix qPCR<br>Thermo Fisher<br>Scientific, USA | Mengenangabe<br>pro Reaktion<br>[µl] | Mengenangabe<br>für 5 RT-Proben<br>[µl] |
|--|--------------------------------------|---|
| TaqMan® Gene<br>Expression Master Mix              | 5                                    | 99                                      |
| PCR Wasser   | 3,5                                  | 69,3                                    |
| TaqMan® Primer                                     | 0,5                                  | 9,9                                     |

Der TaqMan® Gene Expression Master Mix und die TaqMan® Primer wurden zuvor auf Eis aufgetaut. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend gevortext und für wenige Sekunden abzentrifugiert. Die 96-Well Reaction Plate wurde nach einem festgelegten Schema (siehe Abbildung 9) pipettiert: In jeden Well der 96-Well Reaction Plate wurde 9 µl des entsprechenden Mastermix (MM Primer A-E) und je 1 µl der jeweiligen miRNA-cDNA (RT-Probe Nr.1-5) pipettiert.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des Pipettierschemas auf der 96-Well Reaction Plate**

Anschließend wurde die 96-Well Reaction Plate mit einer Folie verschlossen und für 60 Sekunden bei 4 °C bei 1000 rpm abzentrifugiert. Die Reaktion und Auswertung erfolgte mit StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems und der StepOne Software v2.3. Das Programm ist in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8: Programm der qPCR**

| Schritt                 | Zeit   | Temperatur [°C] | Zyklen |
|-------------------------|--------|-----------------|--------|
| Enzymaktivierung        | 10 min | 95              | 1      |
| Denaturierung           | 15 s   | 95              | 45     |
| Annealing/<br>Extension | 1 min  | 60              | 45     |

## 4.3 DNA-Methylierungsanalyse

### 4.3.1 DNA Isolation

Die Gewinnung von DNA aus Tumornativmaterial erfolgte unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kit nach Herstellerprotokoll (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9: Inhalt des QIAamp DNA Mini Kit**

|   |
|---|
| <b>QIAamp DNA Mini Kit</b><br><b>QIAGEN®, Hilden, Germany</b> |
| QIAamp Mini Spin Columns                                      |
| Collection Tubes (2 ml)                                       |
| Buffer AL   |
| Buffer ATL  |
| Buffer AW1 (concentrate)                                      |
| Buffer AW2 (concentrate)                                      |
| Buffer AE   |
| QIAGEN® Protease  |
| Protease Solvent  |
| Proteinase K  |
| Selection Guide   |

Das Tumorgewebe wurde in einer Petrischale mit einer sterilisierten Schere mechanisch zerkleinert und anschließend zusammen mit 180 µl Buffer ATL und 20 µl Proteinase K in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde anschließend für 15 Sekunden mit Hilfe eines Vortexmischers durchmischt. Die versetzte Probe wurde bei 56 °C im Wasserbad über Nacht inkubiert, bis das gesamte Tumormaterial lysiert war.

Am darauffolgenden Tag wurde die Probe für wenige Sekunden zentrifugiert. In den folgenden Arbeitsschritten der DNA Isolation erfolgte die Zentrifugierung aller Proben, wenn nicht anders angegeben, stets bei 8000 rpm für wenige Sekunden. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl AL Buffer. Die Probe wurde anschließend für 15 Sekunden mit dem Vortexmischer durchmischt. Danach wurde die Probe bei 70 °C für zehn Minuten im Wasserbad inkubiert und erneut zentrifugiert. Es wurden 200 µl Ethanol hinzugefügt, die Probe durchmischt und erneut zentrifugiert. Der komplette Ansatz wurde anschließend in ein QIAamp Mini Spin Column mit

2 ml Auffangröhrchen (Collection Tubes) überführt und für 60 Sekunden zentrifugiert. Das Auffangröhrchen wurde daraufhin verworfen und ersetzt. Es wurden 500 µl AW1 Buffer (zuvor mit Ethanol verdünnt) hinzu pipettiert und erneut für 60 Sekunden zentrifugiert. Erneut wurde das Auffangröhrchen verworfen, ersetzt und 500 µl AW 2 Buffer (zuvor mit Ethanol verdünnt) dem Spin Column hinzugegeben. Nach der anschließenden Zentrifugierung bei 14000 rpm für drei Minuten war darauf zu achten, dass der gesamte Inhalt des Spin Columns durch den Filter filtriert wurde. Nun wurde das Spin Column in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 200 µl AE Buffer auf den Filter pipettiert, bei Raumtemperatur für 60 Sekunden inkubiert und anschließend für 60 Sekunden zentrifugiert.

Die Konzentration des Isolats konnte anschließend durch ein Spectrophotometer, analog zur Bestimmung der RNA Konzentration, photometrisch bestimmt werden. Von der isolierten DNA wurde je 1,5 µl zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Die Konzentration wurde auf 25 ng/µl eingestellt. Gegebenenfalls wurde die DNA mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Reinheit der DNA wurde aus dem Absorptionsverhältnis der Wellenlängen 260 nm und 280 nm ermittelt. Das fertige DNA Isolat wurde bei 4 °C gelagert.

## **4.3.2 Methylierungsspezifische PCR und Bisulfitmarkierung**

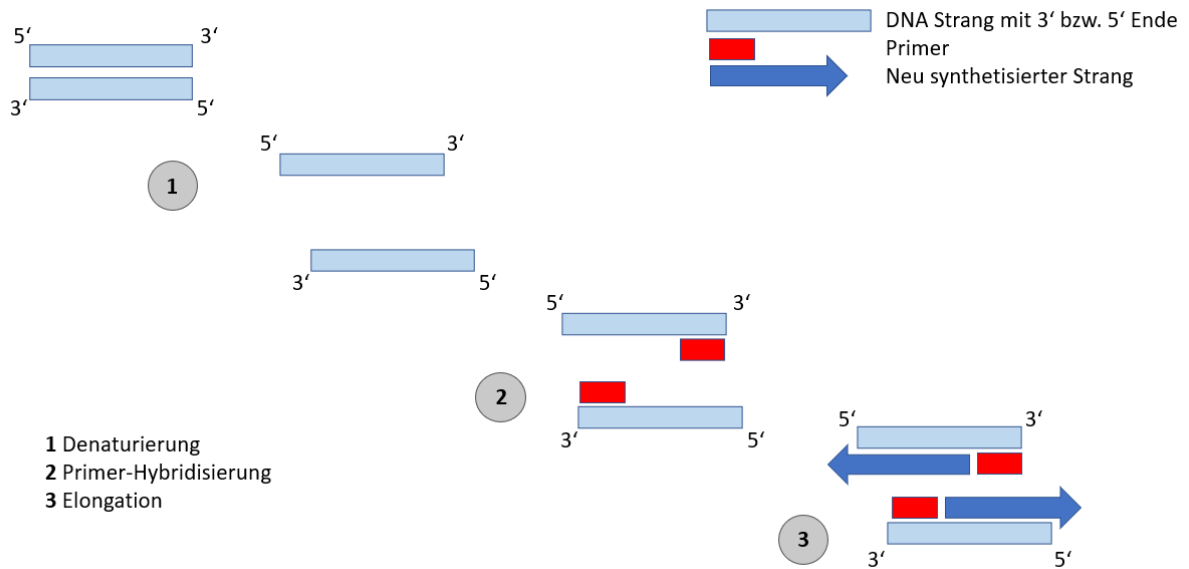
### **4.3.2.1 Prinzip**

Die Polymerasekettenreaktion dient der Vervielfältigung von DNA. Für dieses Verfahren benötigt man verschiedene Komponenten:

- DNA, dessen Abschnitt man verdoppeln möchte (sog. Template)
- Zwei Primer, welche die Startpunkte auf beiden DNA Einzelsträngen bestimmen
- Taq-Polymerase, ein Enzym welches den Replikationsvorgang ermöglicht
- Desoxyribonucleosidtriphosphate als Bausteine
- Pufferlösung, die für die Polymerase geeignet ist

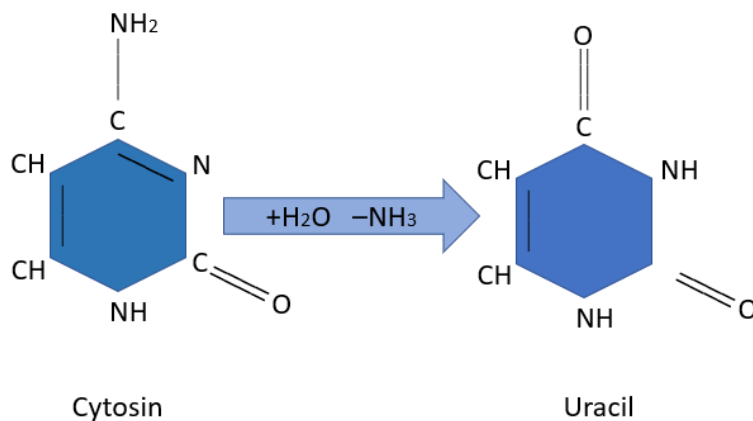
Die PCR besteht aus mehreren Zyklen, die in einem Thermocycler durchlaufen werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten.

Im ersten Schritt (1, siehe Abbildung 10), der Denaturierung, wird die doppelsträngige DNA bei ca. 97 °C in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Darauf folgt die Primerhybridisierung (2, siehe Abbildung 10), in der sich die Primer bei ca. 68 °C an die DNA anlagern. So dienen sie als Startpunkte für die Synthetisierung eines zugehörigen Einzelstrangs. Schlussendlich werden in der Elongationsphase (3, siehe Abbildung 10) mit Hilfe der DNA-Polymerase bei ca. 56 °C die Einzelstränge gebildet, sodass zwei neue doppelsträngige DNA Sequenzen vorliegen. [95]



**Abbildung 10: Stark vereinfachte schematische Darstellung der PCR**

Eine Variation der klassischen PCR stellt die methylierungsspezifische PCR (MS-PCR) dar, bei der zuvor bisulfitmarkierte DNA verwendet wird. Die Bisulfitmarkierung beschreibt eine Methode zur Bestimmung von DNA-Methylierungen mit meist anschließender DNA-Amplifikation mittels PCR. Durch Bisulfitmarkierung wird DNA denaturiert und mit Natriumbisulfit behandelt. Dabei kommt es zu einer Desaminierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil (siehe Abbildung 11), während 5-Methylcytosin unverändert bleibt.



**Abbildung 11: Bisulfitkonversion: Desaminierung und Hydrolyse von Cytosin zu Uracil**

Die MS-PCR ermöglicht zwischen methylierten und unmethylierten Cytosin in der DNA zu unterscheiden und somit methylierte DNA und unmethylierte DNA zu vervielfältigen. Bei der Bisulfitkonversion wird aus dem unmethylierten Cytosin zunächst Uracil. 5-Methylcytosin bleibt

als methyliertes Cytosin bestehen (siehe Abbildung 12). In der MS-PCR wird die DNA anschließend amplifiziert, wobei Uracil in Thymin umgewandelt wird [96, 97]. Durch zwei verschiedene Primerarten für methylierte (MF/MR = methylierte DNA, Forward-Primer/Reverse-Primer, siehe Abbildung 12) und für unmethylierte DNA (UF/UR = unmethylierte DNA, Forward-Primer/Reverse-Primer, siehe Abbildung 12) können die unterschiedlichen Stränge separat voneinander amplifiziert werden.

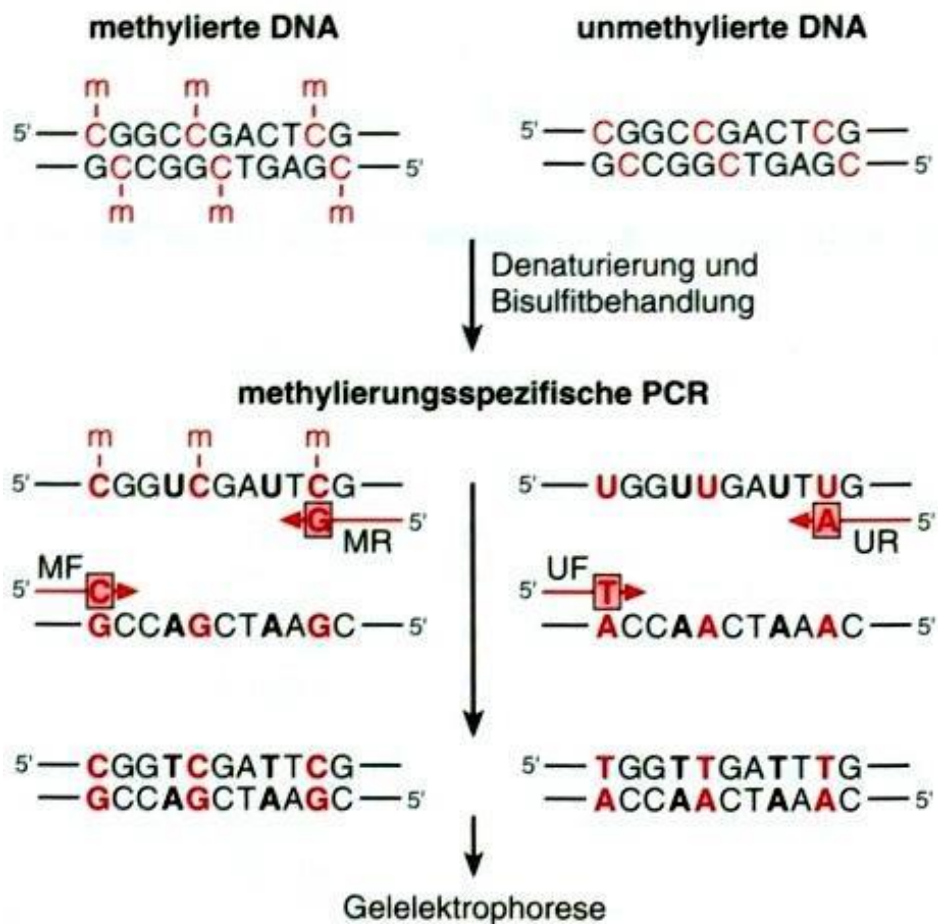


Abbildung 12 aus Dammann R (2006) Analyse der genomischen DNA-Methylierung, Seite 823, Abbildung 31.2. In: Lottspeich F, Engels JW (Eds.): Bioanalytik. 2. Ed Springer Akademischer Verlag, Heidelberg: 821-832

#### 4.3.2.2 Durchführung

Zur Vorbereitung für die PCR und die anschließende Agarosegelelektrophorese wurde das EZ DNA Methylation-Gold™ Kit nach Herstellerprotokoll für die Bisulfitkonversion verwendet (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10: Inhalt des EZ DNA Methylation-Gold™ Kit**

| <b>EZ DNA Methylation-Gold™ Kit</b><br>Zymo Research, Freiburg,<br>Germany |
|--|
| CT Conversion Reagent  |
| M-Dilution Buffer  |
| M-Dissolving Buffer  |
| M-Binding Buffer   |
| M-Wash Buffer  |
| M-Desulphonation Buffer  |
| M-Elution Buffer   |
| Zymo-Spin™ IC Columns  |
| Collection Tubes   |
| Instructions Manual  |

Als Positivkontrolle wurde chemisch global methylierte DNA (bisulfitkonvertierte humane DNA) verwendet. Als Negativkontrolle wurde eine genomische DNA, die aus einem nicht-neoplastischen Dura mater-Gewebe isoliert wurde, verwendet. Die DNA-Konzentration wurde vor Beginn der Bisulfitmarkierung erneut photometrisch mit einem Spectrophotometer bestimmt und anschließend die benötigte Konzentration für die Methylierung berechnet. Die Zielkonzentration lag bei 25 ng/μl. Alle DNA Isolate mit einer Konzentration über 25 ng/μl wurden mit H<sub>2</sub>O verdünnt. DNA Isolate unter 25 ng/μl wurden unverdünnt verwendet. Die Positiv- und Negativkontrollen sollten stets eine Konzentration von mindestens 20 ng/μl aufweisen.

Zur Herstellung der CT Conversion Reagenz (nach Herstellerprotokoll) wurde ein Tube CT Conversion Reagent mit 900 μl Aqua dest., 300 μl M-Dilution Buffer und 50 μl Dissolving Buffer versetzt und für insgesamt zehn Minuten mit Hilfe eines Vortexmischers durchmischt. Die fertige CT Conversion Reagenz reichte für insgesamt 10 Proben aus und konnte bei -20 °C für

einen Monat gelagert und verwendet werden. Für jedes DNA Isolat wurde 130 µl der vorbereiteten CT Conversion Reagent in ein 0,2 ml PCR-Gefäß pipettiert. Hinzu wurde 20 µl der ggf. verdünnten DNA gegeben, anschließend mittels Vortexmischer durchmischt und bei 8000 rpm für wenige Sekunden abzentrifugiert. Die Probe durchlief anschließend im Thermal Cycler ein Programm (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11: Thermal Cycler Programm**

| Temp. (°C) | Zeit (min) |
|------------|------------|
| 98         | 10         |
| 64         | 150        |

Die Probe konnte anschließend bis zur Weiterverarbeitung für 20 Stunden bei 4 °C im Thermal Cycler belassen werden. Nach Ablauf des Programms wurden 600 µl M-Binding Buffer in ein Zymo-Spin™ Column vorgelegt. Die Probe wurde hinzu pipettiert, mehrfach auf Kopf geschwenkt und anschließend zentrifugiert. Die Zentrifugierung erfolgte bei den nachfolgenden Schritten der Bisulfitkonversion, wenn nicht anders angegeben, stets bei 14000 rpm für 30 Sekunden. Der Überstand wurde stets verworfen. Anschließend wurden 100 µl M-Wash Buffer, der zuvor mit 24 ml Ethanol aufbereitet wurde, hinzu pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl M-Desulphonation Buffer. Nach diesem Schritt wurde die Probe 15-20 Minuten bei Raumtemperatur (15-25 °C) inkubiert. Darauffolgend wurde 200 µl M-Wash Buffer dazugegeben und zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde wiederholt.

Danach erfolgte die Eluierung der DNA, indem die Matrix in 1,5 ml Tubes überführt und 10 µl M-Elution Buffer auf die Matrix pipettiert wurde. Nach 60 Sekunden Einwirkzeit und Zentrifugierung für 30 Sekunden wurde dieser Schritt ein zweites Mal durchgeführt.

Die bisulfitmarkierte DNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Für die Vorbereitung der MS-PCR wurden zunächst die einzelnen Bestandteile des Mastermix (siehe Tabelle 12) auf Eis aufgetaut sowie entsprechend der Anzahl der bisulfitmarkierten DNA (i.d.R. wurden 6 Proben gleichzeitig untersucht) 0,2 ml PCR-Gefäß vorbereitet; je zwei für die Tumorseite (methyliert und unmethyliert), je zwei für die Positiv- und Negativkontrolle und zwei für H<sub>2</sub>O (i.d.R. 18 PCR-Gefäße).

Zuerst erfolgte die Erstellung des Mastermix. Dabei wurde ein Mastermix (siehe Tabelle 12) mit methylierten Primern und ein Mastermix mit unmethylierten Primern für MGMT, p15 und p16 (Primer Sequenzen vgl. Tabelle 25 siehe Anhang) in je einem 1,5 ml Reaktionsgefäß



angesetzt. Es war darauf zu achten, dass die HotStar-Taq® Polymerase zuletzt hinzu pipettiert wurde. Anschließend wurden in die Hälfte der vorbereiteten 0,2 ml PCR-Gefäße je 23 µl methylierter und in die andere Hälfte 23 µl unmethylierter Mastermix mit je 2 µl bisulfitmarkierter DNA bzw. 2 µl Negativkontrolle pipettiert. Von der Positivkontrolle wurden 0,5 µl mit 1,5 µl H<sub>2</sub>O pipettiert.

**Tabelle 12: Bestandteile des Mastermix für die MS-PCR**

| <b>Mastermix MS-PCR</b>                                      | <b>Mengenangabe in µl</b> |
|--|---------------------------|
| H <sub>2</sub> O   | 17,80                     |
| Taq-Puffer 10x   | 2,50                      |
| dNTP   | 0,50                      |
| Primer forward<br>• methyliert (PFM)<br>• unmethyliert (PRU) | 1,00                      |
| Primer reverse<br>• methyliert (PRM)<br>• unmethyliert (PRU) | 1,00                      |
| HotStarTaq® Polymerase                                       | 0,20                      |

Nach vollständiger Vorbereitung durchliefen die Proben, getrennt nach ihrem methylierten bzw. unmethylierten Status, in zwei Thermal Cyclern auf die Primer angepasste Programme (siehe Tabelle 26 im Anhang).

### 4.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

#### 4.3.3.1 Prinzip

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Form der Elektrophorese und dient der Auftrennung von Molekülen. Dabei wird ein Gel aus Agarose als Trägermedium verwendet, um DNA-Proben bzw. PCR-Produkte durch ein elektrisches Feld aufzutrennen. Das Gel befindet sich in einer herausnehmbaren Kammer, die in einer Vorrichtung platziert ist. Die Vorrichtung besitzt einen negativen Pol (Kathode) und einen gegenüberliegenden positiven Pol (Anode) (vgl. Abbildung 13). An der Seite der Kathode wird zu Beginn ein Plastikamm in das noch flüssige Gel gesetzt, um Probetaschen für die DNA-Proben zu generieren. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die DNA-Fragmente durch das Gel im elektrische Feld. Dadurch, dass die DNA durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen sind, bewegen sie sich in Richtung der Anode. Damit die DNA sichtbar wird, wird das Agarosegel mit einem interkalierenden Farbstoff versetzt, wodurch anschließend unter UV-Licht die entstehenden Banden sichtbar werden. [95]

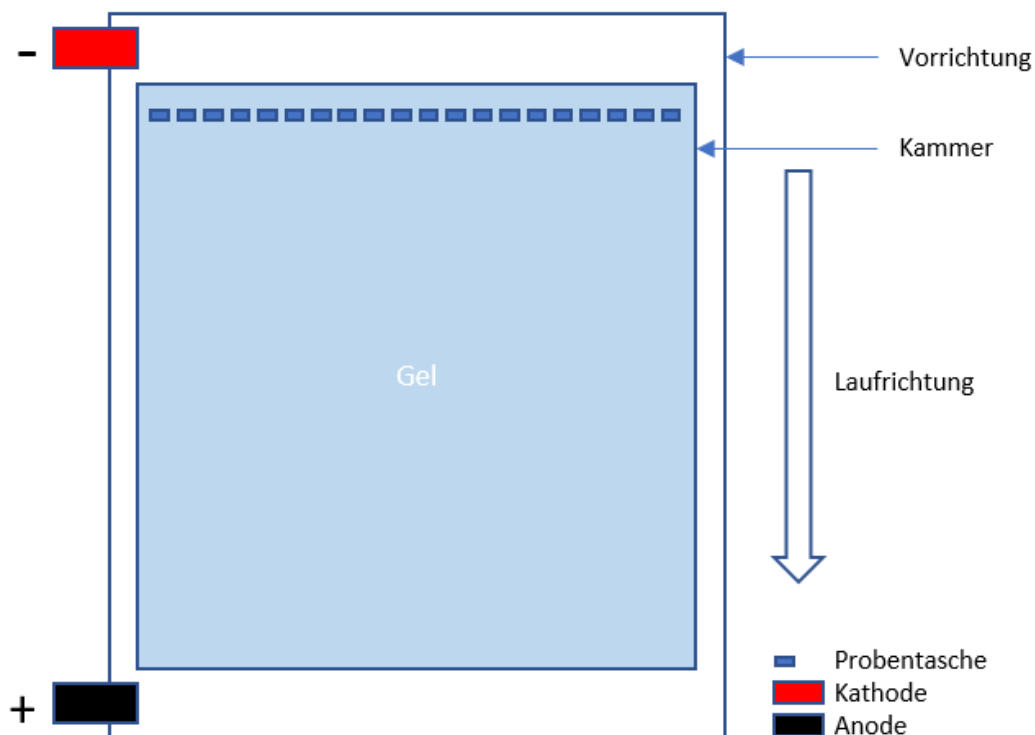


Abbildung 13: Schematische Darstellung einer Gelelektrophoresevorrichtung

### 4.3.3.2 Durchführung

Für die Agarosegelelektrophorese wurde zunächst ein individueller Pipettierplan nach einem Einheitsschema (siehe Abbildung 14) erstellt. Mit einem Gel und 20 Probestaschen konnten sechs Tumorseiten gleichzeitig analysiert werden.

|   |     |   |       |   |       |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |   |
|---|-----|---|-------|---|-------|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|---|
| L | H2O |   | + DNA |   | - DNA |   | P01 |   | P02 |   | P03 |   | P04 |   | P05 |   | P06 |   | L |
|   | M   | U | M     | U | M     | U | M   | U | M   | U | M   | U | M   | U | M   | U | M   | U |   |

L = Leiter  
 + DNA = Positivkontrolle  
 - DNA = Negativkontrolle  
 P01-P06 = Proben

**Abbildung 14: Pipettierplan eines Gels mit 20 Kammern für die Agarosegelelektrophorese**

Um das Gel anzufertigen, wurde zunächst TBE Puffer Lösung angesetzt (siehe Tabelle 13). 200 ml dieser unverdünnten Lösung wurde anschließend mit 800 ml Aqua dest. verdünnt und mittels Magnetrührer bis zur vollständigen Auflösung gerührt.

**Tabelle 13: TBE Puffer Ansatz**

| TBE Puffer | Mengenangabe |
|------------|--------------|
| H2O        | 1 l          |
| Borsäure   | 27,5 g       |
| Trizmabase | 54 g         |
| EDTA       | 1,86 g       |

Um ein Gel für sechs Proben anzufertigen, wurden 150 ml der verdünnten TBE Puffer Lösung mit 3,5 g Agarose versetzt. Dieser Ansatz wurde anschließend in einem Glaskolben für 15 Sekunden erhitzt, bis die Agarose sich vollständig aufgelöst hat. Weitere 50 ml der verdünnten TBE Puffer Lösung wurden zu der erhitzten Lösung hinzugegeben. Nachdem der Ansatz etwas abgekühlt ist, wurden 8 µl Ethiumbromid hinzu pipettiert.

Nun wurde die fertig versetzte Lösung in die Gelelektrophoresekammer gegeben. Im Anschluss, bevor das Gel sich verfestigte, wurde der Kamm für die Probestaschen an der Seite der Kathode in die Kammer eingesetzt. Nach 15 Minuten wurde die Lösung zu einem festen Gel und der

Kamm wurde entfernt. Die Vorrichtung wurde anschließend mit verdünnter TBE Puffer Lösung befüllt.

Die vorbereiteten Proben, welche die MS-PCR durchlaufen hatten, wurden nun mit je 3 µl Loading Dye versetzt. Für die Leiter wurden zwei Ansätze mit je 3,5 µl Gelelektrophorese Leiter (50 bp DNA Ladder), 2 µl Loading Dye und 10,5 µl H<sub>2</sub>O angesetzt.

Schlussendlich wurden 18 µl einer Probe gemäß des erstellten Pipettierplans (siehe Abbildung 14) in je eine Probestasche des Gels pipettiert. Dabei war darauf zu achten, dass der Ansatz so in eine Tasche pipettiert wurde, dass sie nicht aus dieser hinauslief.

Die Agarosegelelektrophorese wurde nun bei 120 Volt – 260 mA gestartet und lief für 120 Minuten. Nach Ablauf der Zeit wurde die Kammer aus der Vorrichtung herausgelöst. Die Auswertung des Gels erfolgte bei UV-Licht (302 nm) mithilfe eines UV-Transilluminators und einer Kamera. Die Bilder wurden digital erfasst. Die Einstufung der Gelbanden als methyliert oder unmethylierte Bande erfolgte durch die Qualität der Darstellung: War ein Signal im Bereich der methylierten Bande zu sehen, wurde diese als positiv methyliert bewertet. Wenn zugleich ein positives Signal bei der unmethylierten zugehörigen Bande erkennbar war, wurde dieses Ergebnis trotzdem als positiv methyliert eingestuft [98]. Bei unzureichend interpretierbaren Signalen wurde der Versuch wiederholt. Die Abbildung 15 zeigt beispielhaft ein Ergebnis eines Gels.



| L | H <sub>2</sub> O |   | + DNA |   | - DNA |   | P01 |   | P02 |   | P03 |   | P04 |   | P05 |   | P06 |   | L |
|---|------------------|---|-------|---|-------|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|---|
|   | M                | U | M     | U | M     | U | M   | U | M   | U | M   | U | M   | U | M   | U | M   | U |   |

**Abbildung 15: Foto eines Gels (p15-Lauf).** Die roten Kreise markieren das positive Signal im Bereich der methylierten Proben. Damit sind diese als positiv methyliert einzustufen.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1 Deskriptive Statistik**

Die Datenerhebung zu den ausgewählten Patienten erfolgte auf Basis der Tumordatenbank des neurochirurgischen Forschungslabors des Universitätsklinikums Homburg. Folgende Parameter wurden für die Analysen von den ausgewählten Patienten verwendet: Geschlecht, Geburtsdatum, Todestag, Erstdiagnose (d.h. bestätigter Pathologiebefund eines GBM), Anzahl der Gesamtoperationen, Datum der 1. und 2. Operation, Karnofsky Index zum Zeitpunkt der 1. und 2. Operation, Datum des 1. Tumorprogresses nach der 1. Operation und Resektionsausmaß der 1. und 2. Operation. In der vorliegenden Arbeit wurde Glioblastommaterial von n = 19 Patienten untersucht. Insgesamt wurden 38 Tumornativproben analysiert: 19 Primärtumore und 19 zugehörige Rezidive. Alle deskriptiven Parameter wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

#### **5.1.1 Patientenkollektiv und Krankheitsverlauf**

Folgende Kriterien mussten zur Aufnahme in das Kollektiv erfüllt werden:

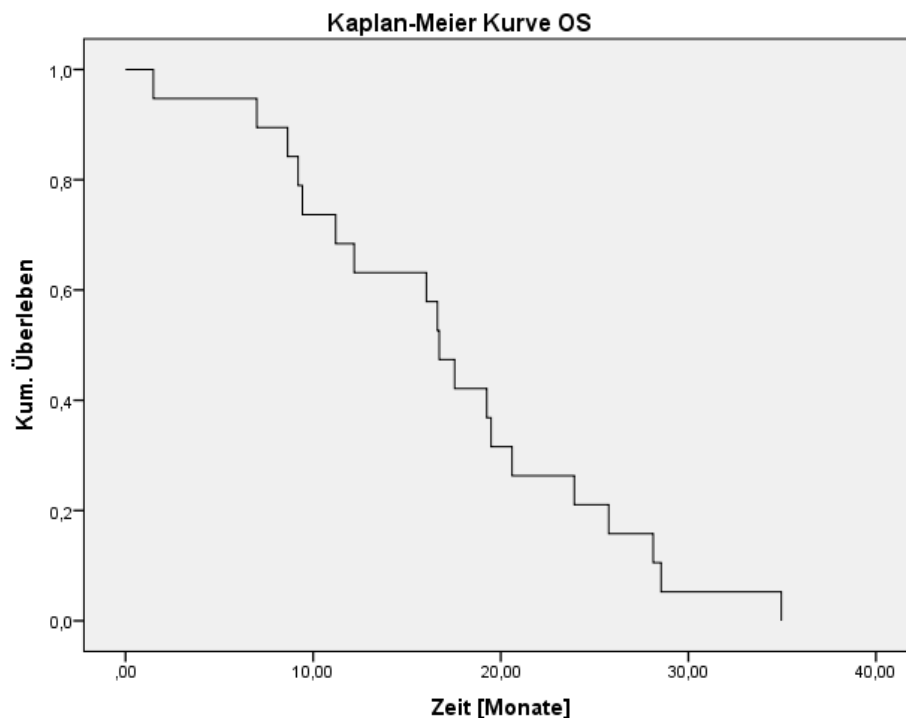
- Die Diagnose eines Glioblastoms war bei jedem untersuchten Tumor histologisch gemäß neuropathologischer Klassifizierung der WHO-Klassifikation gesichert.
- Bei jedem Patienten war eine Operation therapeutisch indiziert. Das verwendete Tumormaterial wurde ausschließlich während dieser therapeutischen Operationen gewonnen.
- Die Operationen der Patienten erfolgte in der Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes.
- Es war ausreichend Tumornativmaterial für die RNA- und DNA-Analysen vorhanden.
- Es kam zum erneuten Auftreten eines Glioblastoms (Rezidiv) im Krankheitsverlauf des einzelnen Patienten.
- Die Proben des Primärtumors und des Rezidivtumors lagen zum Durchführungszeitpunkt der Studie vor.

Bei zwei Patienten war eine detaillierte Tumorphorie nicht bekannt, da die vorherigen Behandlungen nicht im Universitätsklinikums des Saarlandes erfolgten. Das Tumormaterial, das in einer ersten operativen therapeutischen Resektion in unserer Klinik für Neurochirurgie diesen beiden Patienten entnommen wurde, ist in der Klinik für Neurochirurgie der Universität des Saarlandes erstmalig als GBM histologisch klassifiziert worden. Aufgrund des vorherigen unbekanntes Krankheitsverlaufs wurde daher bei diesen beiden Patienten der erste im

Universitätsklinikum des Saarlandes operierte Tumor in unserer Studie als Primärtumor klassifiziert.

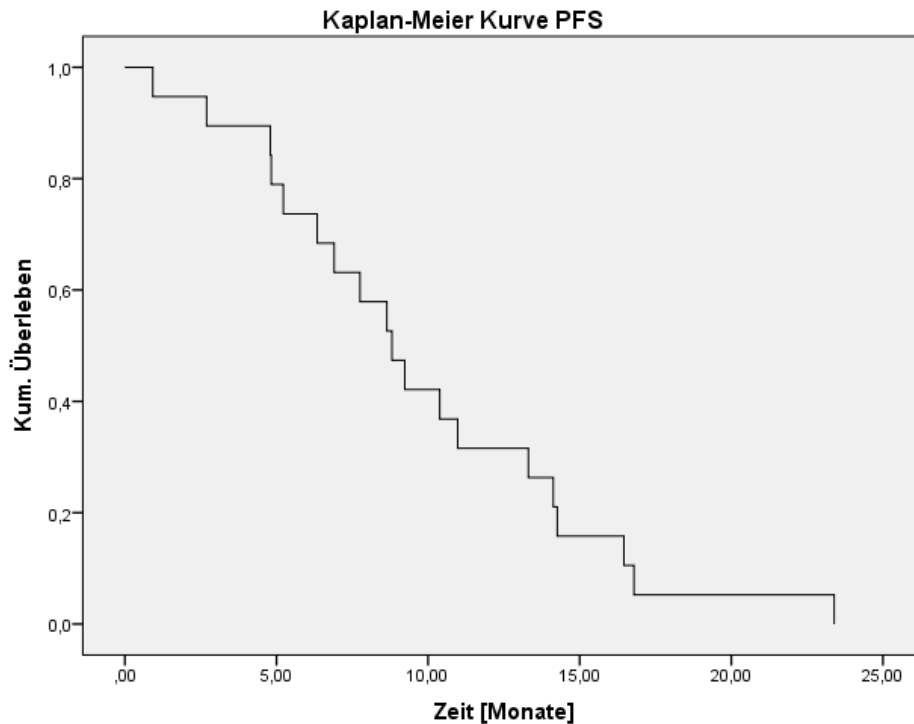
Vom untersuchten Patientenkollektiv waren zwölf männlichen (63,2 %) und sieben weiblichen (36,8 %) Geschlechts. Alle Patienten (100 %) waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen bereits verstorben. Das Alter bei Erstdiagnose lag bei  $55,5 \pm 9,5$  Jahren und reichte von 35 Jahren bis 74 Jahren. Das mittlere Alter bei Versterben der Patienten lag bei  $57,1 \pm 8,9$  Jahren und reichte von 40 Jahren bis 75 Jahren.

Das OS lag bei  $17,2 \pm 8,5$  Monaten. Die kürzeste Zeitspanne zwischen Erstdiagnose und Todeszeitpunkt lag bei einem Monat, die Längste bei 35 Monaten (vgl. Abbildung 16).



**Abbildung 16: Kaplan-Meier Kurve für OS**

Das PFS betrug  $9,8 \pm 5,6$  Monate. Das kürzeste PFS lag bei 0,9 Monaten, das längste PFS bei 23,4 Monaten (vgl. Abbildung 17). Der Zeitraum zwischen der ersten und zweiten Operation lag im Mittel bei 11,2 Monaten.



**Abbildung 17: Kaplan-Meier Kurve für PFS**

Bei der ersten Operation erfolgte eine GTR in 42 % der Fälle (58 % STR), bei der zweiten Operation eine GTR in 37 % der Fälle (53 % STR, 10 % nicht bestimmbar).

Der Karnofsky Index zum Zeitpunkt der ersten Operation betrug im Durchschnitt  $87,4 \pm 9,3$  %. Der niedrigste Karnofsky Index zu diesem Zeitpunkt lag bei 60 %, der höchste bei 100 %. Der Karnofsky Index zum Zeitpunkt der zweiten Operation betrug im Durchschnitt  $80,5 \pm 12,2$  %. Der niedrigste Karnofsky Index zu diesem Zeitpunkt lag bei 60 %, der höchste bei 100 %.

## 5.2 MicroRNA-Expressionsanalyse

In der Analyse wurden die miRNA-Expressionsraten der miRNA-21, -24, -26a und -181d als FC für alle Tumorproben bestimmt. Die Expressionsraten wurden dabei in Relation zum miRNA-Standard RNU48 gesetzt. Wir untersuchten, wie sich die miRNA-Expressionsraten im zeitlich Verlauf verhalten. Dabei wurde in zwei verschiedene Fälle unterschieden: Wenn die miRNA-Expressionsrate im Primärtumor höher war als im Rezidiv, wurde die Veränderung als „abfallend“ deklariert. Wenn die miRNA-Expressionsrate im Rezidiv höher war als im Primärtumor, wurde die Veränderung als „ansteigend“ deklariert. Eine ansteigende oder absteigende Expressionsrate wurde anschliessend in der Variable „VES“ (Veränderung der Expressionsrate) zusammengefasst. Diese Variable wurde für jede untersuchte miRNA bestimmt. Die Variable VES nahm den Wert 0 an, wenn die Expression der miRNAs „ansteigend“ war. Die Variable VES nahm den Wert 1 an, wenn die Expression der miRNAs „abfallend“ war. Da für keinen Patienten die miRNA-Expressionsraten im Tumorverlauf gleich waren, wurde keine eigenständige Variable für den Fall definiert, in dem die Expressionsraten der miRNA im Primärtumor und Rezidiv gleich wären.

$$VES = \begin{cases} 0, & \text{Expression miRNA Primärtumor} < \text{Expression miRNA Rezidiv} \\ 1, & \text{Expression miRNA Primärtumor} > \text{Expression miRNA Rezidiv} \end{cases}$$



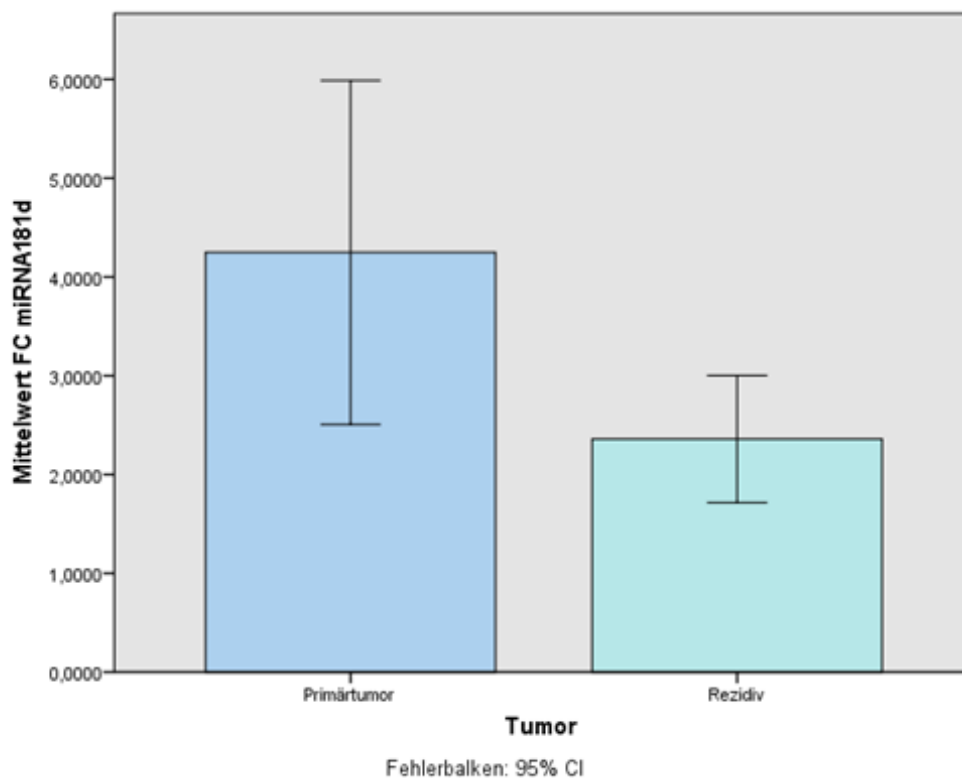
## 5.2.1 MicroRNA-Expression im Primärtumor und Rezidiv

Die Expressionsraten der miRNAs im Primärtumor und Rezidiv wurden mithilfe eines zweiseitigen t-Test für paarige Stichproben verglichen (siehe Tabelle 14; Tabelle 27, Tabelle 28 im Anhang).

|        |   | Paarige Differenzen |                    |                           |                                      |           | t     | df | Sig. (2-seitig) |
|--------|---|---------------------|--------------------|---------------------------|--------------------------------------|-----------|-------|----|-----------------|
|        |   | Mittelwert          | Standardabweichung | Standardfehler Mittelwert | 95% Konfidenzintervall der Differenz |           |       |    |                 |
|        |   |                     |                    |                           | Unterer                              | Oberer    |       |    |                 |
| Paar 1 | FC miRNA181d Primärtumor - FC miRNA181d Rezidiv | 1,8887750           | 2,9820199          | ,6841223                  | ,4514874                             | 3,3260626 | 2,761 | 18 | ,013            |
| Paar 2 | FC miRNA21 Primärtumor - FC miRNA21 Rezidiv     | -,0089977           | ,3225999           | ,0740095                  | -,1644858                            | ,1464905  | -,122 | 18 | ,905            |
| Paar 3 | FC miRNA24 Primärtumor - FC miRNA24 Rezidiv     | ,1681713            | ,6292212           | ,1443533                  | -,1351036                            | ,4714462  | 1,165 | 18 | ,259            |
| Paar 4 | FC miRNA26a Primärtumor - FC miRNA26a Rezidiv   | ,0572029            | ,3220707           | ,0738881                  | -,0980302                            | ,2124360  | ,774  | 18 | ,449            |

**Tabelle 14: zweiseitiger t-Test der mittleren miRNA-Expressionen**

**MicroRNA-181d:** In einer ersten Analyse wurden die Mittelwerte der miRNA-181d Expressionsraten für die Primärtumore und Rezidive auf Unterschiedlichkeit überprüft. Im Primärtumor zeigte sich eine signifikant höhere miRNA-181d Expression als im Rezidiv ( $\alpha = 0,05$ ) (siehe Tabelle 14, Abbildung 18).



**Abbildung 18: Durchschnittliche miRNA181d Expression in Primärtumor und Rezidiv**

In einer zweiten Analyse wurde die Höhe der miRNA-181d Expressionsrate der Primärtumore und Rezidive mit der Veränderungsrichtung der Expressionsraten (VES, siehe Kapitel 5.2) verglichen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge.

In einer linearen Regression wurde zudem der Zusammenhang zwischen der Expressionsrate im Primärtumor und der Expressionsrate im Rezidiv untersucht (vgl. Tabelle 15). Der gefundene Zusammenhang lässt sich wie folgt charakterisieren: Je höher die Expression im Primärtumor war, desto höher war die Expression im Rezidiv. Dabei zeigte sich für die Primärtumore mit hoher miRNA-181d Expressionsrate im Rezidiv ebenfalls eine hohe Expressionsrate ( $\alpha = 0,01$ ). Die Expressionsrate im Primärtumor stellt somit einen signifikanten Prädiktor für die miRNA Expressionsrate im Rezidiv dar. Die miRNA-181d Expressionsrate im Rezidiv war dabei allerdings signifikant geringer als die Expressionsrate im Primärtumor ( $\alpha = 0,05$ ) (vgl. Tabelle 15; Tabelle 29, Abbildung 25 siehe Anhang).

**Tabelle 15: Lineare Regression miRNA-181d Primärtumor - Rezidiv**

| Modell |                          | Nicht standardisierte Koeffizienten |                | Standardisierte Koeffizienten | t     | Sig. |
|--------|--------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|-------|------|
|        |                          | B                                   | Standardfehler | Beta                          |       |      |
| 1      | (Konstante)              | 1,394                               | ,389           |                               | 3,580 | ,002 |
|        | FC miRNA181d Primärtumor | ,227                                | ,071           | ,615                          | 3,218 | ,005 |

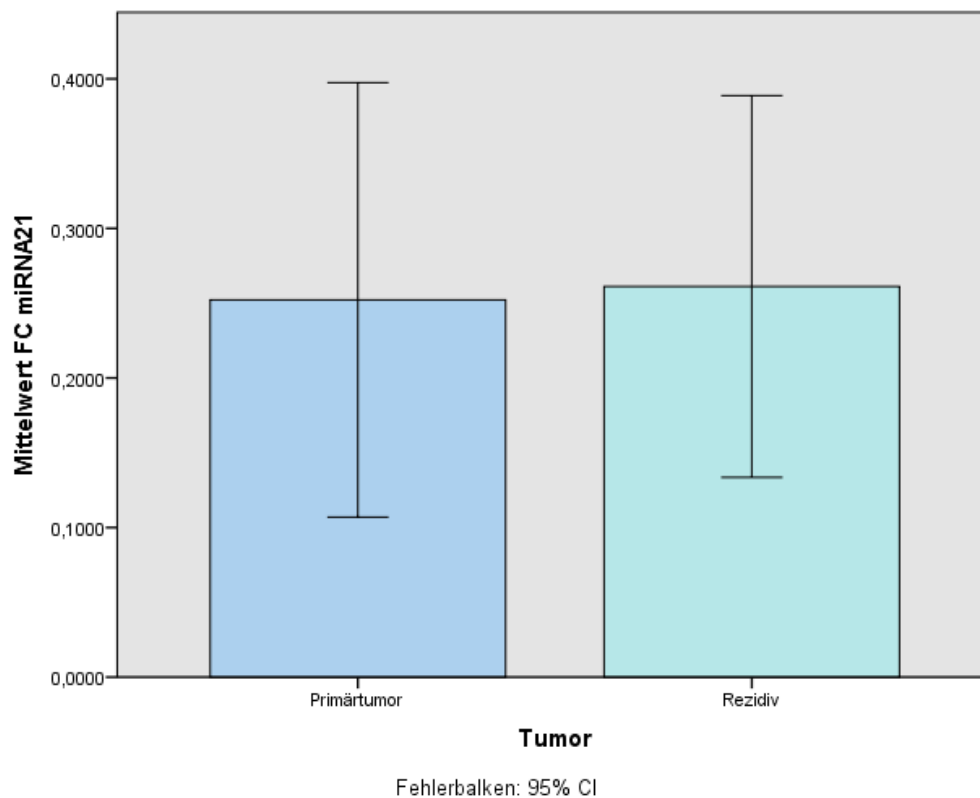
a. Abhängige Variable: FC miRNA181d Rezidiv

**MicroRNA-21:** In einer ersten Analyse wurden die Mittelwerte der miRNA-21 Expressionsraten für die Primärtumore und Rezidive auf Unterschiedlichkeit überprüft. Beim Vergleich dieser Mittelwerte zeigte sich keine signifikante Veränderung der Höhe der Expressionsraten zwischen Primärtumor und Rezidiv (vgl. Tabelle 14, Tabelle 16, Abbildung 19; Tabelle 30 siehe Anhang).

**Tabelle 16: Lineare Regression miRNA-21 Primärtumor - Rezidiv**

| Modell |                        | Koeffizienten <sup>a</sup>          |                |                               | t     | Sig. |
|--------|------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|-------|------|
|        |                        | Nicht standardisierte Koeffizienten |                | Standardisierte Koeffizienten |       |      |
|        |                        | B                                   | Standardfehler | Beta                          |       |      |
| 1      | (Konstante)            | ,182                                | ,077           |                               | 2,364 | ,030 |
|        | FC miRNA21 Primärtumor | ,313                                | ,199           | ,356                          | 1,572 | ,134 |

a. Abhängige Variable: FC miRNA21 Rezidiv



**Abbildung 19: miRNA-21 Expression im Primärtumor und Rezidiv**

In einer zweiten Analyse wurde die Höhe der miRNA-21 Expressionsrate der Primärtumore und Rezidive mit der Veränderungsrichtung der Expressionsraten (VES, siehe Kapitel 5.2) verglichen. Es zeigte sich dabei ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen der miRNA-21 Expressionsrate des Primärtumors und der VES: Auf eine hohe miRNA-21 Expressionsrate im Primärtumor folgte meist eine niedrigere miRNA-21 Expressionsrate im Rezidiv ( $\alpha = 0,01$ ) (vgl. Tabelle 17, Tabelle 35 im Anhang).

**Tabelle 17: Auszug Korrelationsmatrix miRNA-21**

|                   |                          | <b>Korrelationen</b> |                   |              |
|-------------------|--------------------------|----------------------|-------------------|--------------|
|                   |                          | FC miRNA-21 1. OP    | FC miRNA-21 2. OP | VES miRNA-21 |
| FC miRNA-21 1. OP | Korrelation nach Pearson | 1                    | 0,356             | 0,661**      |
|                   | Signifikanz (2-seitig)   |                      | 0,134             | 0,002        |
|                   | N                        | 19                   | 19                | 19           |
| FC miRNA-21 2. OP | Korrelation nach Pearson | 0,356                | 1,000             | 0,156        |
|                   | Signifikanz (2-seitig)   | 0,134                |                   | 0,522        |
|                   | N                        | 19                   | 19                | 19           |
| VES miRNA-21      | Korrelation nach Pearson | 0,661**              | -0,156            | 1,000        |
|                   | Signifikanz (2-seitig)   | 0,002                | 0,522             |              |
|                   | N                        | 19                   | 19                | 19           |

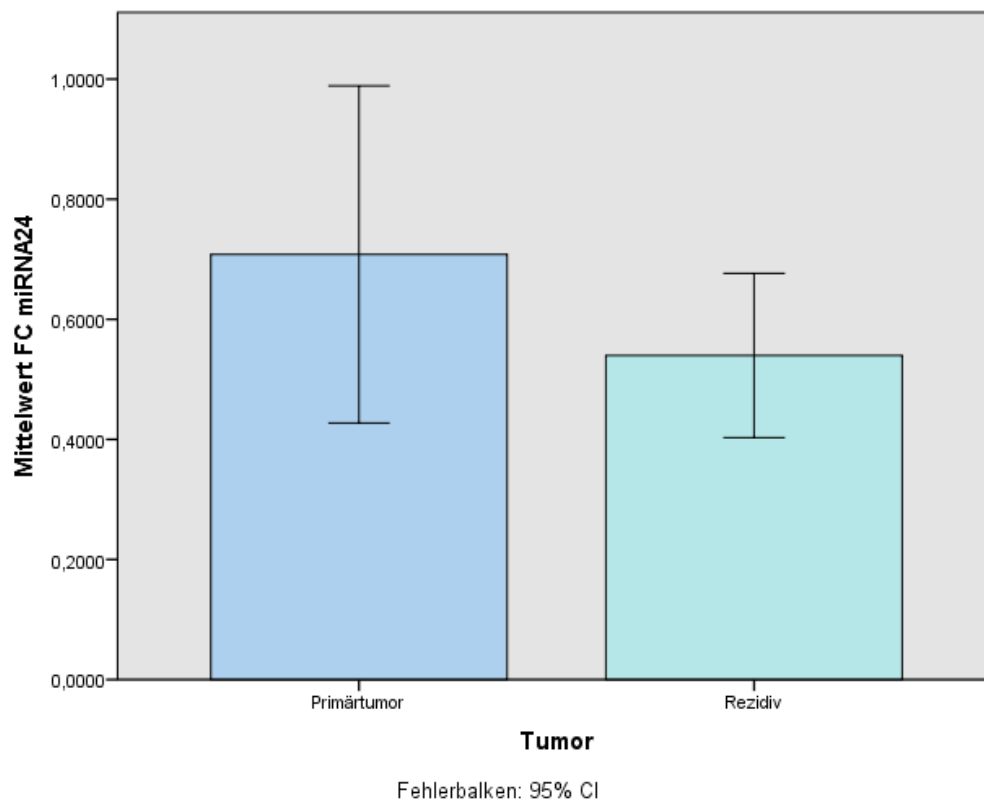
\*\* , Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

**MicroRNA-24:** In einer ersten Analyse wurden die Mittelwerte der miRNA-24 Expressionsraten für die Primärtumore und Rezidive auf Unterschiedlichkeit überprüft. Beim Vergleich dieser Mittelwerte zeigte sich keine signifikante Veränderung der Höhe der Expressionsraten zwischen Primärtumor und Rezidiv (vgl. Tabelle 14, Tabelle 18, Abbildung 20; Tabelle 31 siehe Anhang).

**Tabelle 18: Lineare Regression miRNA-24 Primärtumor - Rezidiv**

| Modell |                        | Nicht standardisierte Koeffizienten |                | Standardisierte Koeffizienten | t     | Sig. |
|--------|------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|-------|------|
|        |                        | B                                   | Standardfehler | Beta                          |       |      |
| 1      | (Konstante)            | ,515                                | ,107           |                               | 4,812 | ,000 |
|        | FC miRNA24 Primärtumor | ,035                                | ,118           | ,073                          | ,300  | ,768 |

a. Abhängige Variable: FC miRNA24 Rezidiv



**Abbildung 20: miRNA-24 Expression im Primärtumor und Rezidiv**

In einer zweiten Analyse wurde die Höhe der miRNA-24 Expressionsrate der Primärtumore und Rezidive mit der Veränderungsrichtung der Expressionsraten (VES, siehe Kapitel 5.2) verglichen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expressionsrate des Rezidivtumors und der VES. Eine hohe miRNA-24 Expressionsrate im Rezidivtumor

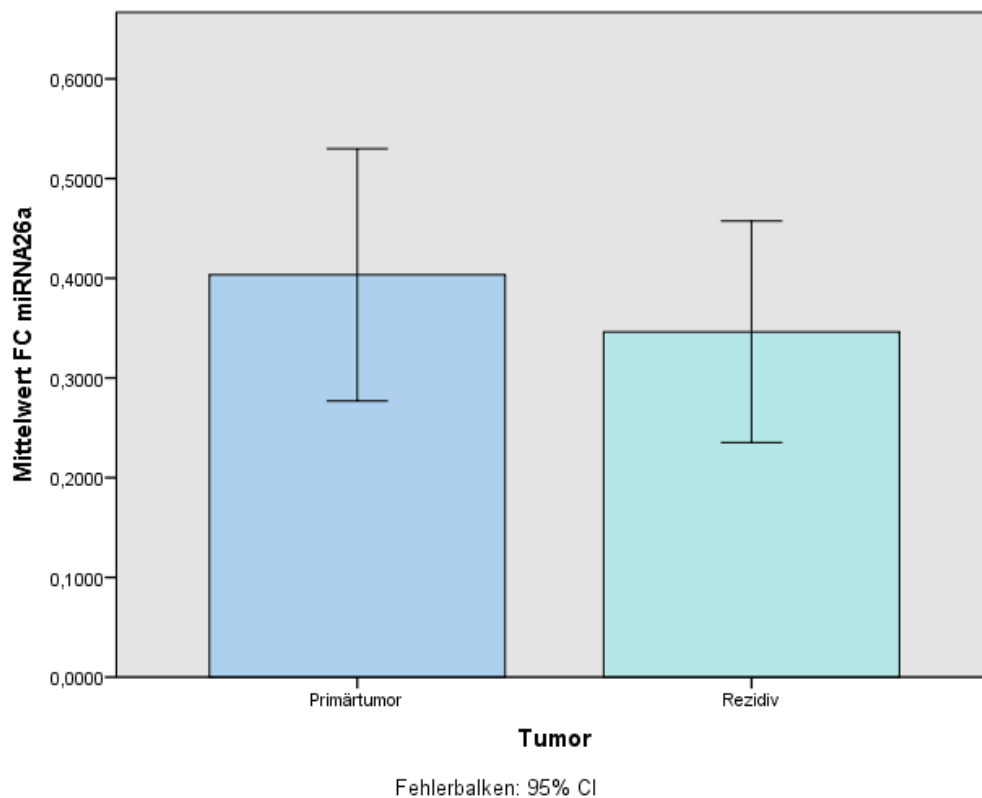
korrelierte signifikant negativ mit der VES ( $\alpha = 0,05$ ): Ein Anstieg der Expressionsrate von Primärtumor zu Rezidiv lag in den Fällen vor, in denen das Rezidiv eine hohe Expressionsrate hatte (vgl. Tabelle 36 im Anhang).

**MicroRNA-26a:** In einer ersten Analyse wurden die Mittelwerte der miRNA-26a Expressionsraten für die Primärtumore und Rezidive auf Unterschiedlichkeit überprüft. Beim Vergleich dieser Mittelwerte zeigte sich keine signifikante Veränderung der Höhe der Expressionsraten zwischen Primärtumor und Rezidiv (vgl. Tabelle 14, Tabelle 19, Abbildung 21; Tabelle 32 siehe Anhang).

**Tabelle 19: Lineare Regression miRNA-26a Primärtumor - Rezidiv**

| Modell |                         | Nicht standardisierte Koeffizienten |                | Standardisierte Koeffizienten | t     | Sig. |
|--------|-------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|-------|------|
|        |                         | B                                   | Standardfehler | Beta                          |       |      |
| 1      | (Konstante)             | ,293                                | ,101           |                               | 2,911 | ,010 |
|        | FC miRNA26a Primärtumor | ,133                                | ,211           | ,151                          | ,631  | ,537 |

a. Abhängige Variable: FC miRNA26a Rezidiv

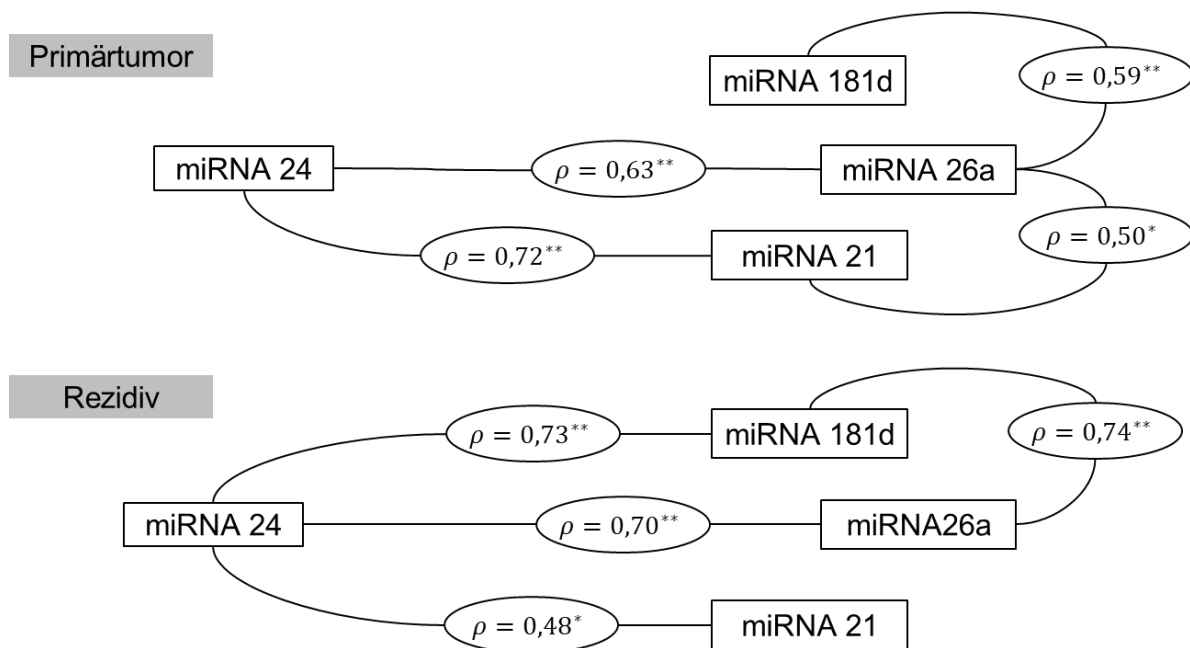


**Abbildung 21: miRNA-26a Expression im Primärtumor und Rezidiv**

In einer zweiten Analyse wurde die Höhe der miRNA-26a Expressionsrate der Primärtumore und Rezidive mit der Veränderungsrichtung der Expressionsraten (VES, siehe Kapitel 5.2) verglichen. Eine hohe Expressionsrate im Primärtumor korrelierte positiv mit der VES: Auf eine

hohe miRNA-26a Expressionsrate im Primärtumor folgte meist eine niedrigere Expressionsrate im Rezidiv. Analog korrelierte die Expressionsrate im Rezidiv signifikant negativ mit der VES ( $\alpha = 0,05$ ) (vgl. Tabelle 37 im Anhang). Zudem zeigt sich für die miRNA-26a eine signifikant negative Korrelation zwischen der miRNA-26a Expressionsrate im Rezidiv und dem Geschlecht: Männer wiesen eine signifikant niedrigere miRNA-26a Expressionsrate im Rezidiv auf.

Eine Pearson-Korrelationsanalyse zeigte starke positive Korrelationen zwischen den Expressionsraten der miRNAs (vgl. Tabelle 33 im Anhang). Dabei korrelierte die miRNA-24 Expression im Primärtumor signifikant positiv mit der Expression von miRNA-21 und miRNA-26a des Primärtumors ( $\alpha = 0,01$ ). Die miRNA-24 Expression im Rezidiv korrelierte signifikant positiv mit der Expression der miRNA-21 ( $\alpha = 0,05$ ), -26a ( $\alpha = 0,01$ ) und -181d ( $\alpha = 0,01$ ) im Rezidiv. Die miRNA-26a Expression im Primärtumor korrelierte signifikant positiv mit der Expressionsrate von miRNA-181d im Primärtumor ( $\alpha = 0,01$ ) sowie mit der miRNA-21 Expressionsrate im Primärtumor ( $\alpha = 0,05$ ). Zudem korrelierte die miRNA-26a Expression im Rezidiv signifikant positiv mit der Expressionsrate der miRNA-181d im Rezidiv ( $\alpha = 0,01$ ) (siehe Abbildung 22).



**Abbildung 22: Korrelationen der einzelnen miRNAs;  $\rho$  = Pearson-Korrelationskoeffizient; Signifikanz zum Niveau  $\alpha = 0,05/0,01$  durch \*/\*\***



## 5.2.2 Einfluss von microRNA-Expressionen auf klinische Parameter

Für die einzelnen Expressionsraten und die VES der einzelnen miRNAs wurden Zusammenhänge für folgende Parametern untersucht: Alter bei ED, Geschlecht, OS, PFS nach 1. OP, Karnofsky Index bei 1. OP und 2. OP und Resektionsausmaß der 1. OP und 2. OP.

**MicroRNA-181d:** Pearson-Korrelationsanalyse zeigte eine signifikante Korrelation der miRNA-181d Expression des Rezidivs und des Resektionsausmaß der 2. OP: Eine hohe miRNA-181d Expressionsrate war meist bei den Tumorproben von Patienten zu finden, die eine STR erhalten hatten ( $\alpha = 0,05$ ) (vgl. Tabelle 20). Für alle anderen Parameter zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge (vgl. Tabelle 34 siehe Anhang). Die Relevanz der miRNA-181d Expression für OS und PFS wurde mithilfe einer linearen Regression untersucht. Dabei wurde die Expressionsrate des Primärtumors, des Rezidivs sowie der VES in das Modell aufgenommen. Keine der drei Größen zeigte einen signifikanten Einfluss auf OS und PFS (vgl. Tabelle 38 siehe Anhang).

**Tabelle 20: Korrelationsanalyse Resektionsausmaß Rezidiv – miRNA-181d Rezidiv**

|                                     |                     | Korrelationen           |                                     |
|-------------------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------------------|
|                                     |                     | FC miRNA181d<br>Rezidiv | Resektionsausmaß<br>2. OP (Rezidiv) |
| FC miRNA181d Rezidiv                | Pearson-Korrelation | 1                       | -,466*                              |
|                                     | Sig. (2-seitig)     |                         | ,045                                |
|                                     | N                   | 19                      | 19                                  |
| Resektionsausmaß 2.<br>OP (Rezidiv) | Pearson-Korrelation | -,466*                  | 1                                   |
|                                     | Sig. (2-seitig)     | ,045                    |                                     |
|                                     | N                   | 19                      | 19                                  |

\*. Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

**MicroRNA-21, -24, -26a:** Für die miRNA-21, -24, und -26a Expressionen zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge mit den ausgewählten Parametern (vgl. Tabelle 35, Tabelle 36, Tabelle 37 siehe Anhang). Die Relevanz der miRNA-21, -24, und -26a Expressionsraten auf das OS und PFS wurde mithilfe einer linearen Regression untersucht. Dabei wurde die Expressionsraten des Primärtumors, des Rezidivs sowie der VES der einzelnen miRNAs in das Modell aufgenommen. Keine der drei Größen zeigte einen signifikanten Einfluss auf OS und PFS (vgl. Tabelle 39, Tabelle 40, Tabelle 41 siehe Anhang).

## 5.3 DNA-Methylierungsanalyse

In der vorliegenden Analyse wurden die Methylierungsstatus von MGMT, p15 und p16 bestimmt. Bei der Datenauswertung der Methylierungsstatus wurden methylierte von unmethylierten Status unterschieden. Ein methylierter Status wurde mit der Variable 1 kodiert und ein unmethylierter Status mit der Variable 0 kodiert. Zudem wurde eine Veränderung des Methylierungsstatus (VMS) von Primärtumor zu Rezidiv für die einzelnen Proteine bestimmt: Die binäre Variable VMS nahm den Wert 1 an, wenn Primärtumor und Rezidiv unterschiedliche Methylierungsstatus aufwiesen, unabhängig von der Richtung der Veränderung. Bei gleichbleibendem Methylierungsstatus von Primärtumor zu Rezidiv nahm die Variable VMS den Wert 0 an.

$$VMS = \begin{cases} 0, & \text{Methylierungsstatus von Primärtumor zu Rezidiv unverändert} \\ 1, & \text{Methylierungsstatus von Primärtumor zu Rezidiv verändert} \end{cases}$$

### 5.3.1 DNA-Methylierungen im Primärtumor und Rezidiv

Tabelle 21: Übersicht Methylierungsstatus

| Methylierungsstatus (N=19)                | MGMT methyliert | P15 methyliert | P16 methyliert |
|---|-----------------|----------------|----------------|
| Primärtumor                               | 36,8% (n=7)     | 10,5% (n=2)    | 15,8% (n=3)    |
| Rezidiv                                   | 57,9% (n=11)    | 26,3% (n=5)    | 26,3% (n=5)    |
| Veränderung des Methylierungsstatus (VMS) | 31,6% (n=6)     | 36,8% (n=7)    | 42,1% (n=8)    |

**MGMT** (vgl. Tabelle 21): Ein methylierter MGMT-Status im Primärtumor fand sich in sieben von 19 Tumorproben. Im Rezidiv zeigte sich ein methylierter MGMT-Status in elf von 19 Tumorproben. Es kam zu einer VMS in sechs der 19 Fällen (31,6 %). In einem Fall war der Primärtumor methyliert und das Rezidiv unmethyliert. In fünf Fällen war der Primärtumor unmethyliert und das Rezidiv methyliert (siehe Tabelle 22). Dabei ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge ( $\alpha = 0,05$ ) zwischen dem Methylierungsstatus des Primärtumors und des Rezidivs sowie der VMS feststellen (vgl. Tabelle 42 siehe Anhang).

Bei methyliertem MGMT-Status im Primärtumor wies auch das Rezidiv in sechs von insgesamt sieben Fällen, in dem MGMT im Primärtumor methyliert war, einen methylierten MGMT-Status auf (siehe Tabelle 22). Lineare Regression zeigte zudem, dass ein Wechsel des Methylierungsstatus signifikant hin zu einem methylierten Status im Rezidiv verlief ( $\alpha = 0,05$ ) (vgl. Tabelle 43 siehe Anhang).

**Tabelle 22: Übersicht über die Dynamik des MGMT-Methylierungsstatus**

| <b>MGMT (N = 19)</b>          | Primärtumor methyliert | Primärtumor unmethyliert | Gesamtzahl Status Rezidiv |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Rezidiv methyliert            | n = 6                  | n = 5                    | 11                        |
| Rezidiv unmethyliert          | n = 1                  | n = 7                    | 8                         |
| Gesamtzahl Status Primärtumor | 7                      | 12                       |                           |

**p15** (vgl. Tabelle 21): Ein methylierter p15-Status im Primärtumor fand sich in zwei von 19 Tumorproben. Im Rezidiv zeigte sich ein methylierter p15-Status in fünf von 19 Tumorproben. In insgesamt sieben der 19 Fälle (36,8 %) waren der Methylierungsstatus in Primärtumor und Rezidiv unterschiedlich; es kam zu einem Wechsel (VMS = 1). In zwei dieser Fälle war p15 im Primärtumor methyliert und im Rezidiv unmethyliert. In den anderen fünf Fällen war p15 im Primärtumor unmethyliert und im Rezidiv methyliert (siehe Tabelle 23).

**Tabelle 23: Übersicht über die Dynamik des p15-Methylierungsstatus**

| <b>p15 (N = 19)</b>           | Primärtumor methyliert | Primärtumor unmethyliert | Gesamtzahl Status Rezidiv |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Rezidiv methyliert            | n = 0                  | n = 5                    | 5                         |
| Rezidiv unmethyliert          | n = 2                  | n = 12                   | 14                        |
| Gesamtzahl Status Primärtumor | 2                      | 17                       |                           |

Eine Korrelationsanalyse zeigte daher einen hochsignifikanten Zusammenhang ( $\alpha = 0,01$ ) zwischen dem p15-Methylierungsstatus des Rezidivs und dem VMS (vgl. Tabelle 44 siehe Anhang). Ein Wechsel erfolgte in der Mehrzahl hin zu einem methylierten p15-Status (Primärtumor unmethyliert, Rezidiv methyliert). Für den Primärtumor zeigte sich zudem ein Trend ( $\alpha = 0,1$ ) zwischen dem p15-Methylierungsstatus des Primärtumors und dem VMS. In

allen Fällen veränderte sich der Methylierungsstatus im Rezidiv: Wenn der p15-Status im Primärtumor methyliert war, war er im Rezidiv unmethyliert (vgl. Tabelle 23).

**p16** (vgl. Tabelle 21): Ein methylierter p16-Status im Primärtumor fand sich in drei von 19 Tumorproben. Im Rezidiv zeigte sich ein methylierter p16-Status in fünf von 19 Tumorproben. In insgesamt acht der 19 Fälle (42,1 %) waren der Methylierungsstatus in Primärtumor und Rezidiv unterschiedlich; es kam zu einem Wechsel (VMS = 1). In drei dieser Fälle war p16 im Primärtumor methyliert und im Rezidiv unmethyliert. In den anderen fünf Fällen war p16 im Primärtumor unmethyliert und im Rezidiv methyliert (vgl. Tabelle 24).

**Tabelle 24: Übersicht über die Dynamik des p16-Methylierungsstatus**

| <b>p16 (N = 19)</b>           | Primärtumor methyliert | Primärtumor unmethyliert | Gesamtzahl Status Rezidiv |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Rezidiv methyliert            | <b>n = 0</b>           | n = 5                    | 5                         |
| Rezidiv unmethyliert          | n = 3                  | n = 11                   | 14                        |
| Gesamtzahl Status Primärtumor | 3                      | 16                       |                           |

Für das Rezidiv zeigte die Korrelationsanalyse daher einen signifikanten Zusammenhang ( $\alpha = 0,01$ ) zwischen dem p16-Methylierungsstatus und dem VMS. Ein Wechsel erfolgte in der Mehrzahl hin zu einem methylierten p16-Status (Primärtumor unmethyliert, Rezidiv methyliert). Für den Primärtumor zeigte sich zudem ein signifikanter Zusammenhang ( $\alpha = 0,05$ ) zwischen dem p16-Methylierungsstatus des Primärtumors und dem VMS. In allen Fällen veränderte sich der Methylierungsstatus im Rezidiv: Auf einen methylierten p16-Status im Primärtumor folgte stets ein unmethylierter p16-Status im Rezidiv (vgl. Tabelle 24; Tabelle 45 siehe Anhang).

Im untersuchten Kollektiv wies für p15 und p16 kein Patient einen methylierten Status sowohl im Primärtumor als auch im Rezidiv auf. Auf eine p15- oder p16-Methylierung im Primärtumor folgte immer ein VMS = 1,  $P(VMS | \text{Primär methyl.}) = 100\%$ , insgesamt bei n = 2 für p15 und n = 3 für p16. Dabei war bei keinem einzelnen Patienten sowohl p15 als auch p16 im Primärtumor methyliert und anschließend im Rezidiv unmethyliert, es handelte sich um fünf verschiedene Patienten.

### 5.3.2 Einfluss von DNA-Methylierungen auf klinische Parameter

Die Methylierungsstatus und die VMS wurden mit folgenden Parametern korreliert: Alter bei ED, Geschlecht, OS, PFS nach 1. OP, Karnofsky Index bei 1. OP und 2. OP und Resektionsausmaß der 1. OP und 2. OP.

**MGMT:** Eine Korrelationsanalyse zeigte einen signifikanten Zusammenhang ( $\alpha = 0,05$ ) zwischen dem Methylierungsstatus des MGMT im Primärtumor und dem Alter bei ED: Ein methylierter MGMT-Status trat signifikant häufiger bei jüngeren Patienten auf. Für den MGMT-Status im Primärtumor und das PFS nach 1. OP zeigte sich ein Trend ( $\alpha = 0,09$ ): Bei einem methylierten MGMT-Status im Primärtumor zeigte sich ein erhöhtes PFS. Bei einem methylierten MGMT-Status im Primärtumor lag das mittlere PFS um  $5,1 \pm 2,4$  Monate höher als bei unmethylierten MGMT-Status. Ein methylierter MGMT-Status im Rezidivtumore korrelierte signifikant ( $\alpha = 0,05$ ) mit einem erhöhten PFS nach der 1. OP sowie mit einem erhöhten OS ab der 1. OP (siehe Abbildung 23). Patienten mit einem methylierten MGMT-Status im Rezidivtumore hatten ein signifikant höheres PFS ( $p = 0,022$ ) und OS ( $p = 0,033$ ). Dabei war das mittlere PFS  $5,7 \pm 2,2$  Monate höher und das OS  $8,3 \pm 3,6$  höher für Patienten mit einem methylierten MGMT-Status im Rezidiv. Es war keine signifikante Korrelation zwischen den einzelnen MGMT-Status und den restlichen Parametern zu erkennen (vgl. Tabelle 46 siehe Anhang). Zur genaueren Analyse des Einflusses des MGMT-Methylierungsstatus auf PFS und OS wurden die Patienten in drei Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe wurden all die Patienten gruppiert, die in Primärtumore und Rezidiv einen unmethylierten MGMT-Status aufwiesen (U – U, siehe Abbildung 24). In einer zweiten Gruppe wurden alle Patienten zusammengefasst, bei denen entweder nur Primär- oder nur Rezidivtumore methyliert waren (M – U und U – M, siehe Abbildung 24). Die dritte Gruppe bestand aus Proben mit konstant methylierten MGMT-Status (M – M, siehe Abbildung 24). Eine Korrelationsanalyse zeigte, dass ein konsistent methylierter MGMT-Status signifikant positiv mit höherem PFS korrelierte ( $\alpha = 0,05$ ); für das OS konnte eine solche Aussage nicht bestätigt werden. Darüber hinaus wiesen die Patienten mit konstant unmethylierten MGMT-Status ein signifikant niedrigeres PFS auf ( $\alpha = 0,05$ ); bei diesen Patienten zeigte sich zudem ein Trend für eine negative Korrelation mit dem OS. Für die Patienten der zweiten Gruppe zeigten sich keine signifikanten Korrelationen mit PFS oder OS (vgl. Abbildung 24; Tabelle 47 siehe Anhang).

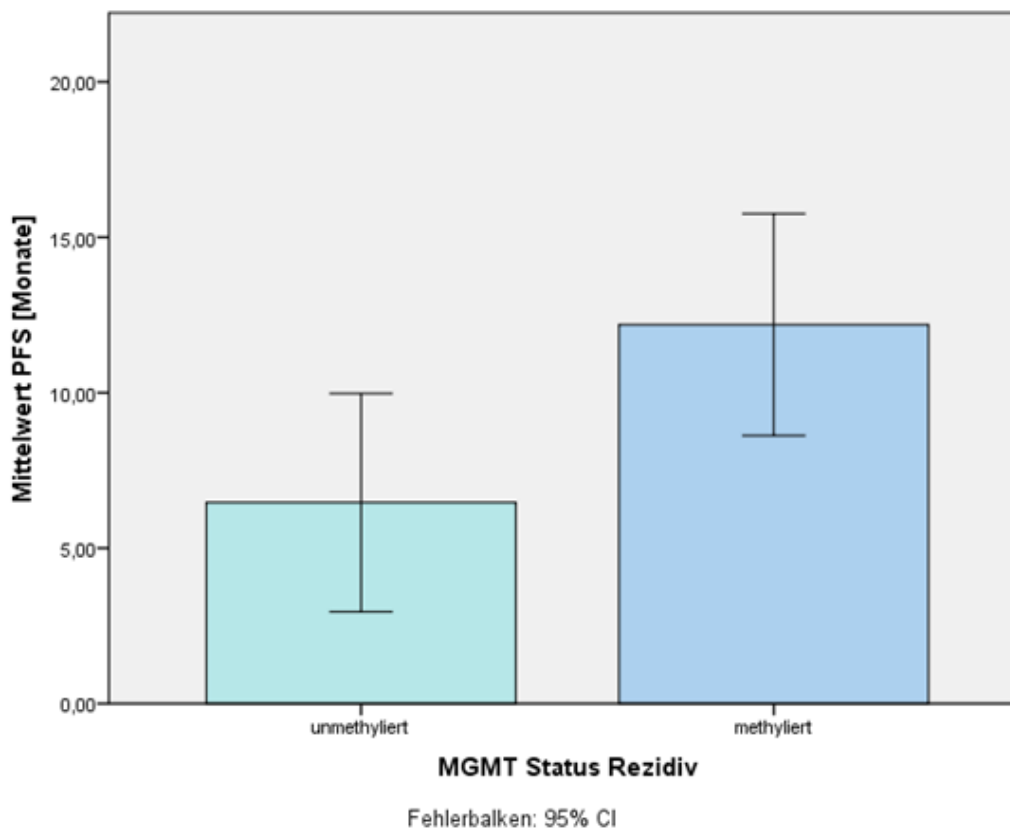
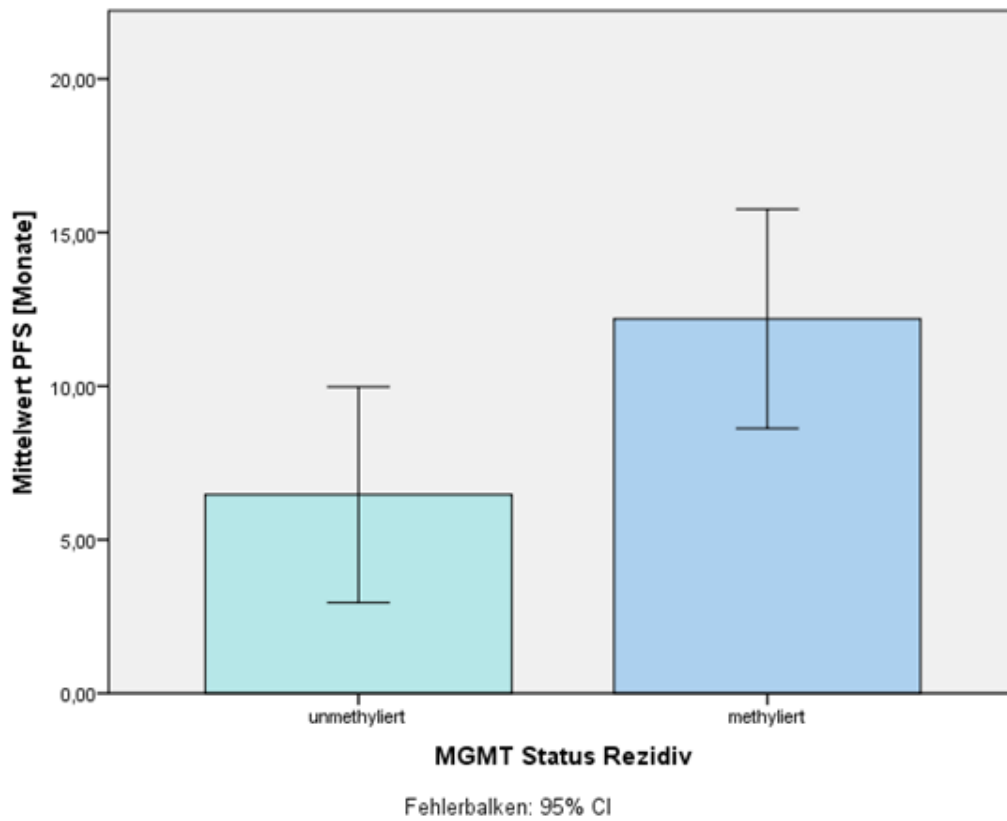


Abbildung 23: Korrelation MGMT-Status Rezidiv mit PFS und OS

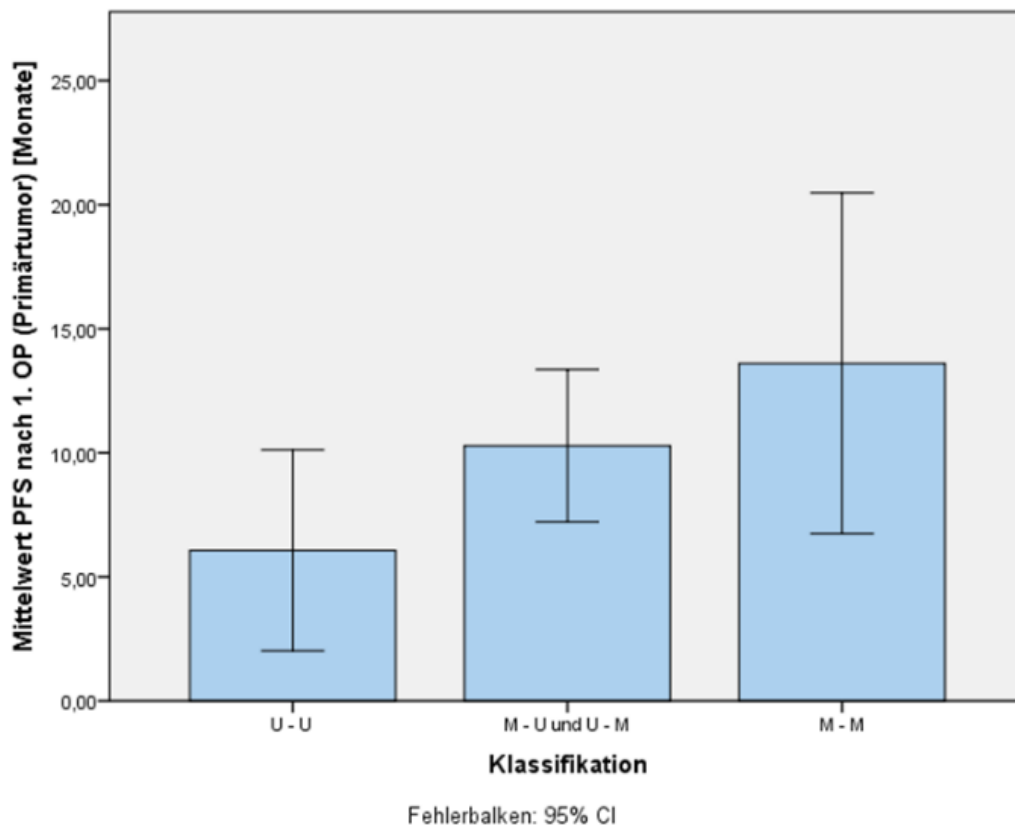
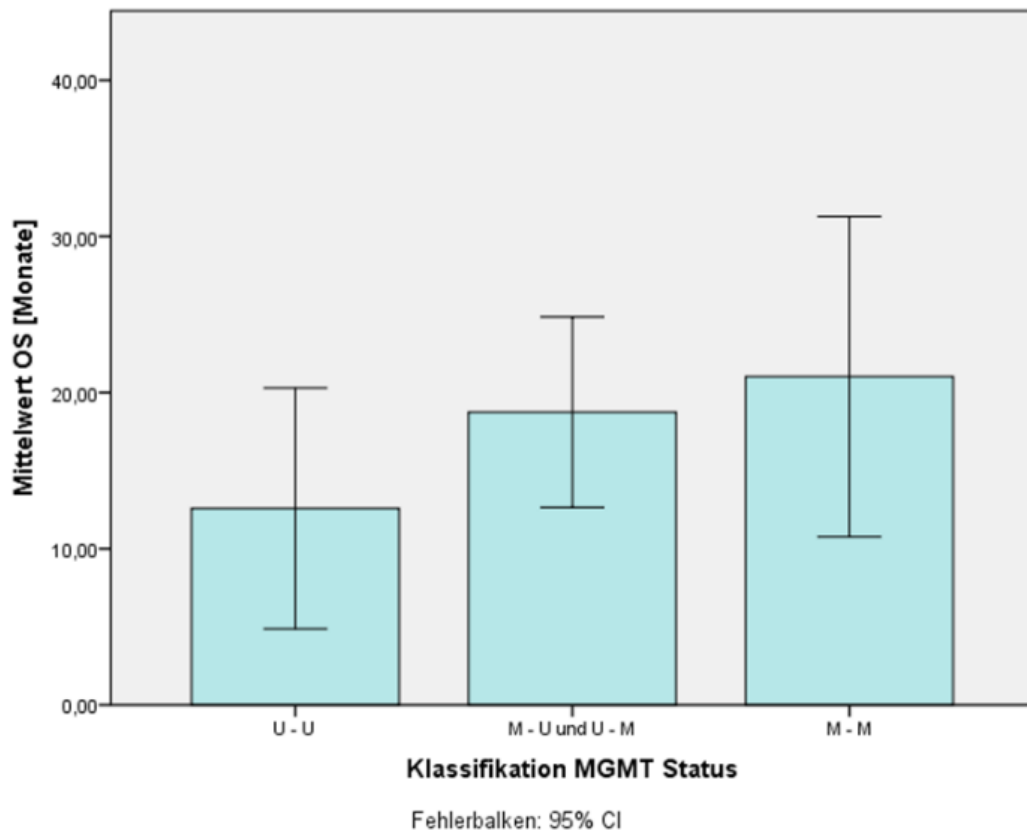


Abbildung 24: Dynamik des MGMT-Status und Auswirkung auf OS/PFS

**p15:** Es zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation ( $\alpha = 0,01$ ) zwischen dem Karnofsky Index zum Zeitpunkt der 1. OP und dem p15-Status des Rezidivs: Bei einem hohen Karnofsky Index zum Zeitpunkt der 1. OP war der p15-Status im Rezidiv meist unmethyliert. Zudem korrelierte der Karnofsky Index zum Zeitpunkt der 1. OP signifikant negativ mit VMS. Bei einem hohen Karnofsky Index erfolgte meist kein Wechsel des Methylierungsstatus ( $\alpha = 0,05$ ). Zwischen dem Methylierungsstatus von p15 und dem OS und PFS ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge feststellen (vgl. Tabelle 48 siehe Anhang).

**p16:** Es zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zwischen dem p16-Status von Primärtumor und Rezidiv und allen untersuchten Parametern (vgl. Tabelle 49 siehe Anhang).



## 6. Diskussion

Das Glioblastoma multiforme ist der häufigste maligne hirneigene Tumor des Menschen [1]. Bis heute ist die Prognose von Patienten, die an einem Glioblastom erkranken, sehr schlecht. Sie beträgt im Durchschnitt ohne Therapie nur wenige Monate [8]. Durch ein etabliertes Therapieverfahren aus operativer Resektion des Tumors und nachfolgender Radio-Chemotherapie können die Patienten heute ein mittleres Überlebensalter von durchschnittlich 15 Monaten erreichen [9, 10].

Ein aktueller Schwerpunkt der Forschung liegt in der Untersuchung von epigenetischen Prozessen im Glioblastom, darunter die Analyse von miRNAs und DNA Methylierungsprozessen. Hegi et al. machten in diesem Forschungsbereich bereits eine bedeutsame Entdeckung: Glioblastompatienten mit methylierten MGMT-Status, die mit Temozolomid behandelt werden, zeigen ein längeres Überleben [71-73]. So stellt dieser epigenetische Mechanismus heute einen Prädiktor für das Ansprechen auf eine Temozolomid Chemotherapie dar. Darüber hinaus können epigenetische Marker auch für eine genauere Abschätzung des klinischen Verlaufs wichtig sein. Einige Studien identifizierten bereits die Überexpression von miRNA-21 als Indikator für eine schlechtere Prognose im GBM [17, 40, 41]. Der Schwerpunkt dieser Studien lag dabei meist auf der Analyse epigenetischer Mechanismen einzelner Glioblastome in einem Patientenkollektiv. Eine longitudinaler Vergleich rezidivierender Glioblastome erfolgte dabei meist jedoch nicht. Das ist erstaunlich, da es trotz operativer Resektion und multimodaler Therapie bei etwa 70 % der Patienten innerhalb eines Jahres nach der Diagnose zu der Entstehung eines Rezidivs kommt [2, 99]. So stellt sich die berechtigte Frage, welche epigenetischen Prozesse im Krankheitsverlauf des Glioblastoms stattfinden.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Analyse der Veränderung epigenetischer Marker im Krankheitsverlauf des Glioblastoms und ihre Auswirkung auf die klinische Progression zu untersuchen. Dafür wurde natives Tumormaterial von GBM Primärtumoren und Rezidiven eines ausgewählten Patientenkollektivs untersucht. Der Fokus lag dabei auf der Analyse zweier unterschiedlicher epigenetischer Mechanismen, der miRNA-Expression und der DNA-Methylierung. Für beide Mechanismen wurden Expressionsraten und Methylierungsstatus separat für GBM Primärtumore und Rezidive bestimmt. Für die miRNAs wurden die Expressionsraten der miRNA-21, -24, -26a und -181d untersucht. Für die Methylierungsanalyse wurden die Methylierungsstatus von MGMT, p15 und p16 bestimmt. Anschließend wurden die Ergebnisse mit klinischen Parametern verglichen. Die für die Arbeit angewandten Untersuchungsmethoden waren im eigenen neurochirurgischen

Forschungslabor des Universitätsklinikums des Saarlandes etablierte Verfahren, die in vergleichbaren Studien ebenfalls angewandt worden sind. [49, 55, 61, 100]

Ein Grund für die Auswahl der hier untersuchten miRNAs sind frühere Studien, die ihre Expressionen im Glioblastom nachweisen konnten und sie für das GBM als potenziell relevant einstufen (siehe Kapitel 2.2.1.3). Auch die Methylierungsstatus von MGMT, p15 und p16 wurden bereits als relevante Marker für das GBM identifiziert (siehe Kapitel 2.2.2.1 und 2.2.2.2). Mit dem Verhalten von Expressionsraten verschiedener miRNAs im Verlauf einer Glioblastomerkrankung beschäftigten sich bislang nur wenige Studien [43, 89]. Sowohl Matos et al. als auch Ilhan-Mutlu et al. untersuchten die Expressionsraten von miRNAs im GBM Primärtumor und Rezidiv. Ein eingehender Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erfolgt in Kapitel 6. In beiden Studien lag ein Fokus auf einem möglichen Zusammenhang zwischen klinischen Parametern wie OS und PFS und der miRNA-Expression. Unser Forschungsprojekt unterscheidet sich jedoch in der Auswahl der untersuchten miRNAs. Darüber hinaus gibt es in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Rolle einzelner miRNAs. Beispielsweise kamen Matos et al. und Ilhan Mutlu et al. bei der Analyse von miRNA-21 zu unterschiedlichen Ergebnissen, die in Kapitel 6.2 ausführlich diskutiert werden.

Zusammenfassend stellt die vorliegende Arbeit somit eine Ergänzung zum bisher spärlichen Wissen über das Verhalten verschiedener miRNAs im Krankheitsverlauf des Glioblastom dar. Die in dieser Arbeit ausgewählte Kombination an miRNAs ist nach aktuellem Kenntnisstand bisher nicht untersucht worden. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse ergänzen bisherigen Arbeiten zu MGMT und liefern neues Wissen zu der Dynamik der Methylierungsstatus von p15 und p16 im Glioblastom.

## 6.1 Patientenkollektiv

Männer erkranken in der Regel häufiger an einem Glioblastom als Frauen [2]. In der vorliegenden Arbeit waren die Mehrzahl der Patienten ebenfalls männlichen Geschlechts ( $n = 12$ ). Das Durchschnittsalter bei Erkrankung beträgt in der aktuellen Literatur 64 Jahre [2, 6]. Das Durchschnittsalter des vorliegenden Patientenkollektivs war im Vergleich niedriger und betrug 55 Jahre. Dies überrascht nicht, da sich auch Studien finden lassen, die in großen Kollektiven ebenfalls niedrigere Erkrankungsalter bei Erstdiagnose zeigten. Das untersuchte Kollektiv ( $n = 80$ ) von Felsberg et al. zeigte ein medianes Alter bei Erstdiagnose von 57,4 Jahren [101]. Ein möglicher Erklärungsansatz eines im Vergleich jüngeren Erkrankungsalters der Patienten in der vorliegenden Studie ist der Einschluss einiger junger Patienten (Alter bei ED  $< 45$  Jahre;  $n = 3$ ) bei einer gleichzeitig geringen Gesamtfallzahl von  $n = 19$ .

Das gegenwärtige Overall Survival ist in der Literatur bei erhalten einer Standardtherapie mit ca. 15 Monaten beschrieben [9]. Im untersuchten Patientenkollektiv verhielt sich die Zahl des OS ähnlich: Es zeigte sich ein durchschnittliches OS von ca. 17 Monaten. Bis auf einen Patienten erhielt das Kollektiv bei der Behandlung des Primärtumors neben der operativen Resektion des Tumors noch die Standardtherapie mit Radiatio und Temozolomid-Chemotherapie. Fünf Patienten wurden zusätzlich mit einer Carmustin-Wafer-Implantation behandelt. Dadurch kann das erreichte durchschnittliche OS erklärt werden. Das mediane progressionsfreie Überleben in der vorliegenden Patientenpopulation lag bei acht Monaten. In der Literatur zeigte sich unter der Standardtherapie ein ähnliches medianes PFS von 6,9 Monaten [10]. Die Größe der Tumorresektion durch die Operation steht in Zusammenhang mit der Überlebenszeit. Eine GTR wurde nachweislich mit einem längeren Überleben von GBM Patienten assoziiert [102]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Es fand sich kein signifikant besseres Überleben bei den Patienten, die eine GTR ihres Tumors erhielten. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem progressionsfreien Überleben und dem Resektionsausmaß. Möglicherweise ließe sich bei Erhöhung des Kollektivs ein solcher Zusammenhang feststellen.

## 6.2 Verhalten von microRNAs im Krankheitsverlauf des Glioblastoms

Im Folgenden geben wir einen Überblick über die Ergebnisse der miRNA-Expressionsanalyse, bevor sie im Anschluss mit Hilfe der bisherigen Literatur diskutiert werden.

Im Mittelwertvergleich der miRNA-Expressionen von GBM Primärtumor und Rezidiv fand sich bei der miRNA-181d ein Unterschied. Im Primärtumor zeigte sich dabei eine signifikant höhere Expression als im Rezidiv. Die Höhe der miRNA-181d Expressionsrate im Primärtumor stellte zudem einen signifikanten Prädiktor für die miRNA-Expressionsrate im Rezidiv dar. Für die miRNA-21, -24, und -26a zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Rezidiven im Mittelwertvergleich oder linearer Regression.

Im zweiten Analyseschritt wurde die Höhe der miRNA-Expressionsraten mit der Veränderungsrichtung der Expressionsraten von Primärtumor zu Rezidiv verglichen (VES, vergleiche Kapitel 5.2). Für miRNA-181d ließen sich keine Korrelationen zwischen Primär- und Rezidivtumor und der Variable VES feststellen. Sowohl für miRNA-21 als auch miRNA-26a korrelierte die Expressionsrate des Primärtumors signifikant positiv mit VES: Auf eine hohe Expressionsrate im Primärtumor folgte meist eine niedrigere Expressionsrate im Rezidiv. Zusätzlich korrelierte analog die miRNA-26a Expressionsrate im Rezidiv signifikant negativ mit der VES. Für die miRNA-24 zeigte sich ebenfalls ein signifikant negativer Zusammenhang zwischen der Expressionsrate des Rezidivtumors und der VES: Ein Anstieg der miRNA-24 Expressionsrate von Primärtumor zu Rezidiv lag in den Fällen vor, in denen das Rezidiv eine hohe Expressionsrate hatte.

Bei der Untersuchung der Expressionsraten und der klinischen Parameter ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge feststellen. Lediglich für die miRNA-181d zeigte sich eine signifikant positive Korrelation der Expressionsrate des Rezidivs mit dem Resektionsausmaß der zweiten Operation: Eine hohe miRNA-181d Expressionsrate war meist bei den Tumorproben von Patienten zu finden, die eine STR erhalten hatten.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die hier ausgewählten miRNAs untereinander signifikant positiv korrelierten. Dabei korrelierte die miRNA-24 Expression im Primärtumor signifikant positiv mit der Expression von miRNA-21 und miRNA-26a des Primärtumors. Die miRNA-24 Expression im Rezidiv korrelierte signifikant positiv mit der Expression der miRNA-21, -26a, und -181d im Rezidiv. Die miRNA-26a Expression im Primärtumor korrelierte signifikant positiv mit der Expressionsrate von miRNA-181d und miRNA-21 im Primärtumor.

Zudem korrelierte die miRNA-26a Expression im Rezidiv signifikant positiv mit der Expressionsrate der miRNA-181d im Rezidiv.

**MicroRNA-21:** Für die miRNA-21 finden sich bereits Studien, die zum Vergleich herangezogen werden können. Matos et. al. untersuchten die miRNA-21 als eine von elf verschiedene miRNAs im GBM Primärtumor und zugehörigen Rezidiv (miRNA-7, miRNA-9, miRNA-15b, miRNA-21, miRNA-26b, miRNA-124a, miRNA-199a, let-7a, let-7b, let-7d, let-7f). Die Autoren fanden für sieben miRNAs eine signifikante Veränderung der Expression zwischen primärem und rezidivierendem GBM. Die miRNA-21 war im Rezidiv herunterreguliert im Vergleich zum Primärtumor [43]. Ilhan-Mutlu et al. untersuchten die miRNA-21 als eine von sieben verschiedene miRNAs im GBM Primärtumor und zugehörigen Rezidiv (miRNA-10b, -21, -181b, -181c, -195, -221 und -222). Der Vergleich aller untersuchten miRNA-Expressionsraten zwischen Erst- und Zweitresektion zeigten in ihrer Studie dabei keine signifikante Veränderung [89]. Somit kommen diese beiden Studien auf unterschiedliche Ergebnisse zu dem Expressionsverhalten der miRNA-21 im GBM. In der vorliegenden Studie wurden, wie bei den Autoren Ilhan-Mutlu et al., keine signifikante Veränderung der Expressionsrate gefunden. Die niedrigen Fallzahlen beider Studien könnten dabei Grund für fehlende signifikante Effekte sein. Hinsichtlich klinischer Parameter konnten keine signifikanten Korrelation zwischen der miRNA-21 Expressionsraten und dem OS sowie PFS festgestellt werden. Damit bestätigen wir die Ergebnisse von Ilhan et. al. und Matos et al., die ebenfalls keine Korrelationen zwischen der Expressionsrate der miRNA-21 und dem OS und PFS fanden [43, 89].

**MicroRNA-181d:** Der signifikante Abfall der Expressionsrate von miRNA-181d von GBM Primärtumor zu Rezidiv stellt aus unserer Sicht ein interessantes Ergebnis da. Dieser Expressionsunterschied könnte ein Hinweis auf die Rolle der miRNA-181d als epigenetischer Marker der Krankheitsprogression sein. Die vorliegende Arbeit ist nach aktuellem Kenntnisstand die erste Studie, die sich mit dem Verhalten der miRNA-181d im Krankheitsverlauf des Glioblastoms beschäftigt hat. Ein direkter Vergleich mit anderen wissenschaftlichen Studien ist damit nicht möglich. Eine alternative Vergleichsmöglichkeit könnten miRNAs sein, die eine ähnliche Sequenzfolge aufweisen. Ilhan-Mutlu et al. untersuchten bereits die miRNA-181b und -181c Expression im Verlauf von GBM Primärtumor zu Rezidiv. MicroRNA-181d und -181c sind zusammen geclustert und liegen auf dem Chromosom 19 (37.p5). Hierbei ist zu betonen, dass miRNA-181b und -181c zwar eine ähnliche Sequenzfolge aufweisen und sich nur durch einige wenige Nukleotide unterscheiden, in ihrer Funktion aber nicht identisch mit der hier untersuchten miRNA 181d sind [103, 104]. Für diese verwandten miRNAs konnten die Autoren jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Expressionsniveaus feststellen [89]. Weiterhin könnte die geringe Stichprobengröße bei

Ilhan-Mutlu et al. (n = 15) für eine fehlende Signifikanz der Ergebnisse sorgen. Für die miRNA-181d Expressionsraten sowie die Änderung der Expressionsraten (VES) von Primärtumor zu Rezidiv zeigten sich in unserem Patientenkollektiv keine signifikanten Auswirkungen auf das OS und PFS. Ilhan et. al. fanden ebenfalls keine Korrelationen zwischen den Expressionsraten von miRNA-181b und -c im Primärtumor und Rezidiv im Zusammenhang mit dem OS und PFS [89].

**MicroRNA-24:** In der vorliegenden Studie zeigten sich für die miRNA-24 Expressionsraten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Rezidiven. Zudem zeigten sich keine signifikanten Hinweise auf einen Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf. Unsere Studie ist nach aktuellem Kenntnisstand die erste Studie, die sich mit der miRNA-24 im longitudinalen Verlauf dieser Erkrankung beschäftigt hat. In einer früheren Studie mit dem Fokus auf die miRNA-24 Expression im einzelnen GBM zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Gesamt- und progressionsfreiem Überleben und der Expressionsrate [55]. Die vorliegende Arbeit bestätigt damit die Ergebnisse dieser Studie zu der noch eher unerforschten miRNA-24 im GBM.

**MicroRNA-26a:** Für miRNA-26a zeigten sich in unserer Studie keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Rezidiven sowie keine signifikanten Hinweise auf einen Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf. Eine Analyse des Verhaltens von miRNA-26a im GBM Krankheitsverlauf ist nach aktuellem Kenntnisstand bislang nicht vorgenommen worden. Wie bei der miRNA-181d könnten miRNAs mit ähnlicher Sequenzfolge eine Vergleichsmöglichkeit sein. Matos et al. fanden beispielsweise für die miRNA-26b eine signifikant herunterregulierte Expressionsrate im Rezidiv im Vergleich zum Primärtumor [43]. Die miR-26-Familie besteht aus miR-26a-1, miR-26a-2 und miR-26b, die auf den Chromosomen 3, 12 bzw. 2 lokalisiert sind. Dabei muss erneut betont werden, dass trotz verwandter Sequenzfolge die miRNA-26a und -26b in ihrer Funktion nicht identisch sind. Für die miRNA-26a Expressionsraten sowie die Änderung der Expressionsraten (VES) von Primärtumor zu Rezidiv zeigten sich in unserem Patientenkollektiv keine signifikanten Auswirkungen auf das OS und PFS. Matos et. al. berichten, dass eine geringere Expression der miRNA-26b mit einem längeren progressionsfreien Überleben korreliert [43]. Ein entsprechendes Ergebnis für miRNA-26a konnte in unserer Studie nicht bestätigt werden.

In einer Korrelationsanalyse der Expressionsraten pro Tumorprobe, wiesen die miRNAs eine hohe Korrelation untereinander auf (vgl. Abbildung 22). Dabei waren zwei Aspekte besonders interessant. Erstens, die miRNAs zeigten meist hochsignifikante Korrelationen untereinander in Bezug auf ihre Expressionsrate. Dies galt sowohl im Primärtumor als auch im Rezidiv. Zweitens, die Expressionsraten im Primärtumor waren fast vollständig unabhängig von den

Expressionsraten im Rezidiv. Beispielsweise konnte für die Expressionsraten von miRNA-24 in Primärtumor und Rezidiv keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Bei dem Vergleich der jeweiligen Expressionsraten von miRNA-24 und miRNA-21 im Primärtumor fanden wir jedoch eine signifikant positive Korrelation ( $\rho = 0,72$ ;  $\alpha = 0,01$ ). Diesen Effekt fanden wir ebenfalls für den Vergleich der beiden gleichen miRNAs im Rezidiv ( $\rho = 0,48$ ;  $\alpha = 0,05$ ). Für die anderen untersuchten miRNAs konnten ähnliche Effekte festgestellt werden (vgl. Abbildung 22). Der Zusammenhang der miRNAs innerhalb eines Tumors war damit deutlich stärker ausgeprägt als der Zusammenhang der gleichen miRNA im Krankheitsverlauf.

### 6.3 DNA-Methylierungsstatus im Krankheitsverlauf des Glioblastoms

Zusätzlich wurden in dieser Studie der epigenetische Mechanismus der DNA-Methylierung untersucht. Der Methylierungsstatus von MGMT, p15 und p16 wurden in den Primärtumoren und Rezidiven der Tumore bestimmt und auf signifikante Zusammenhänge mit der VMS (Wechsel des Methylierungsstatus) untersucht. Anschließend wurde ausgewertet, wie sich die Methylierungsstatus und die VMS Variable auf die Progression der Erkrankung auswirken. Im Folgenden geben wir einen Überblick über die wichtigen Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalyse, bevor sie im Anschluss mit Hilfe der bisherigen Literatur diskutiert werden.

Ein methylierter MGMT-Status im Primärtumor fand sich in sieben von 19 Tumorproben. In sechs dieser sieben Fälle wies auch das Rezidiv einen methylierten MGMT-Status auf. Im Rezidiv zeigte sich ein methylierter MGMT-Status in elf von 19 Tumorproben. Insgesamt blieb der Methylierungsstatus zwischen Primärtumor und Rezidiv in 13 Fällen konstant, zu VMS kam es in den restlichen sechs Fällen. Lediglich in einem Fall war der Primärtumor methyliert und das Rezidiv unmethyliert. In allen anderen Fällen ( $n = 5$ ) erfolgte VMS in die andere Richtung, dabei war der Primärtumor unmethyliert und das Rezidiv methyliert. Allerdings korrelierte der Methylierungsstatus nicht signifikant mit der VMS, weder für den Primärtumor noch für das Rezidiv. VMS erfolgte signifikant hin zu einem methylierten Status im Rezidiv. Für den MGMT-Status im Primärtumor und das PFS nach 1. OP zeigte sich ein Trend ( $p = 0,052$ ): Bei einem methylierten MGMT-Status im Primärtumor lag das mittlere PFS um  $5,1 \pm 2,4$  Monate höher als bei unmethylierten MGMT-Status. Patienten mit einem methylierten MGMT-Status im Rezidivtumor hatten zudem ein signifikant höheres PFS ( $p = 0,022$ ) und OS ( $p = 0,033$ ). Dabei war das mittlere PFS  $5,7 \pm 2,2$  Monate höher und das OS  $8,3 \pm 3,6$  höher für Patienten mit einem methylierten MGMT-Status im Rezidiv. Darüber hinaus gab es keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem MGMT-Status und anderen klinischen Parametern.

Ein methylierter p15-Status im Primärtumor fand sich in zwei von 19 Tumorproben. In beiden Fällen war der p15-Status im zugehörigen Rezidiv unmethyliert, es kam damit zu einem Wechsel des Methylierungsstatus im Verlauf. Ein unmethylierter p15-Status im Primärtumor fand sich hingegen in 17 von 19 Tumorproben. Von diesen 17 blieb in zwölf Fällen der p15-Status im Rezidiv unmethyliert. In den verbleibenden fünf Fällen zeigte sich ein Wechsel des Methylierungsstatus, der p15-Status war damit im Rezidiv methyliert. Folglich zeigte keiner der 19 Patienten in beiden Tumoren einen methylierten p15-Status. Es zeigte sich zudem ein



signifikanter Zusammenhang zwischen dem p15-Methylierungsstatus des Rezidivs und dem VMS. Ein Wechsel erfolgte in der Mehrzahl von einem unmethylierten p15-Status im Primärtumor hin zu einem methylierten p15-Status im Rezidiv. Zwischen dem Methylierungsstatus von p15 und dem OS und PFS ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge feststellen.

Ein methylierter p16-Status im Primärtumor fand sich in drei von 19 Tumorproben. In allen drei Fällen war der p16-Status im zugehörigen Rezidiv unmethyliert, es kam damit zu einem Wechsel des Methylierungsstatus im Verlauf. Ein unmethylierter p16-Status im Primärtumor fand sich hingegen in 16 von 19 Tumorproben. Von diesen 16 blieb in elf Fällen der p16-Status auch im Rezidiv unmethyliert. In den restlichen fünf Fällen zeigte sich ein Wechsel des Methylierungsstatus, der p16-Status war damit im Rezidiv methyliert. Folglich zeigte keiner der 19 Patienten in beiden Tumoren einen positiven p16-Methylierungsstatus. Es zeigte sich zudem ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem p16-Methylierungsstatus des Rezidivs und dem VMS. Ein Wechsel erfolgte in der Mehrzahl von einem unmethylierten p16-Status im Primärtumor hin zu einem methylierten p16-Status im Rezidiv. Es zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zwischen dem p16-Methylierungsstatus von Primärtumor und Rezidiv und allen untersuchten klinischen Parametern.

**MGMT.** In unserer Studie konnten wir zeigen, dass sich ein methylierter MGMT-Status im Verlauf des Krankheitsprogresses meist konstant zeigte. Wenn es zu einem Wechsel des MGMT-Methylierungsstatus von Primärtumor zu Rezidiv kam, dann war dieser signifikant hin zu einem methylierten MGMT, während der methylierte p15- und p16-Status im Verlauf hin zu einem unmethylierten Status wechselte. Die Untersuchung des MGMT-Methylierungsstatus im Glioblastomverlauf sowie die Untersuchung ihrer Konstanz zwischen Primärtumor und Rezidiv ist nicht neu. Es lassen sich einige Studien finden, die bereits den Wechsel des Methylierungsstatus von MGMT im Krankheitsverlauf des Glioblastom und seine klinische Relevanz untersuchten [88, 101, 105-107]. Bisherige Ergebnisse zeigten, dass der MGMT-Methylierungsstatus im Krankheitsverlauf meist konstant bleibt und in einem nennenswerten, kleineren prozentualen Anteilen wechselte: In einer Studie von Brandes et al. zeigte sich ein Wechsel bei 37 % ihres Patientenkollektivs von insgesamt 44 der mit Radiotherapie und Temozolomid-Chemotherapie behandelten Glioblastompatienten. Dabei wechselte der Status meist von methyliert zu unmethyliert [105]. Im Jahr 2017 erweiterten die Autoren ihre Studie und analysierten den Methylierungsstatus bei 108 Patienten. MGMT war bei beiden Operationen bei 38 Patienten (35,2 %) methyliert, während es bei 43 Patienten (39,8 %) unmethyliert war. Sie fanden heraus, dass der MGMT-Methylierungsstatus bei 75 % dieser Patienten stabil war [107]. Felsberg et al untersuchten, ob ein Glioblastomrezidiv mit

Veränderungen des Promotor-Methylierungsstatus und der Expression von MGMT in Paaren von primären und rezidivierenden Glioblastomen von 80 Patienten verbunden war [101]. Dabei zeigte sich ein Wechsel bei 11 % bei insgesamt 80 Patienten, bei 89 % blieb der MGMT-Methylierungsstatus konstant. Der Großteil zeigte dabei eine Änderung des Methylierungsstatus von methyliert zu unmethyliert.

Die in unserer Studie ermittelte Wechselrate des MGMT-Methylierungsstatus von Primärtumor zu Rezidiv von 36,8 % ähnelt damit den Ergebnissen bisheriger Veröffentlichungen, die zeigten, dass der MGMT-Methylierungsstatus bei den meisten Patienten beim Rezidiv identisch mit dem des Initialtumors blieb. Jedoch unterscheiden sich die Ergebnisse unserer Studie mit der meist beobachteten Methylierungsänderung von methyliert zu unmethyliert. Zusammenfassend lässt sich kein abschließendes einheitliches Urteil über die Höhe der Wechselrate des MGMT-Status in der Literatur finden. So ist trotz der geringen Fallzahl unserer Studie anzunehmen, dass die Signifikanz der Ergebnisse durchaus vertretbar ist und sich die hier gezeigten Beobachtungen zur Dynamik des MGMT-Methylierungsstatus im GBM Krankheitsverlauf in der Literatur widerspiegeln.

Die Auswirkung auf die klinische Progression der Erkrankungen zeigte bei den Analysen zu MGMT signifikante Ergebnisse. Patienten, die sowohl im Primärtumor als auch Rezidiv einen methylierten MGMT-Status aufwiesen, hatten ein signifikant höheres PFS. Analog dazu wiesen die Patienten mit konstant unmethylierten MGMT-Status ein signifikant niedrigeres PFS auf. Diese Beobachtung spricht für die Validität unserer Ergebnisse, da bis auf einen Patienten das gesamte Kollektiv bei der Behandlung des Primärtumors eine Temozolomid-Chemotherapie erhielt. Wie bereits berichtet, zeigen Patienten mit methylierten MGMT-Status unter einer Temozolomid-Therapie ein verlängertes Überleben [72].

Bei einem methylierten MGMT-Status im Primärtumor lag das mittlere PFS um  $5,1 \pm 2,4$  Monate höher als bei unmethylierten MGMT-Status. Bei Patienten mit einem methylierten MGMT-Status im Rezidiv war das mittlere PFS  $5,7 \pm 2,2$  Monate höher und das OS  $8,3 \pm 3,6$  höher als bei unmethylierten MGMT-Status im Rezidiv. Wir bestätigen die Ergebnisse von Felsberg et al., die eine prognostische Relevanz des methylierten MGMT-Status sowohl bei Primärtumor als auch bei Rezidiv feststellten. Die MGMT-Promotor-Methylierung war mit einem längeren progressionsfreien Überleben, Gesamtüberleben und Post-Rezidiv-Überleben (PRS) assoziiert [101]. Unsere Ergebnisse unterscheiden sich jedoch auch von anderen Studien. Brandes et al. beschreiben, dass das OS signifikant mit dem MGMT-Methylierungsstatus des Primärtumors korreliert war, dies galt jedoch nicht für das Rezidiv. In einer Analyse korrelierte das mediane Überleben nach der zweiten Operation nicht mit der bei der zweiten Operation erhaltenen MGMT-Methylierung (10,3 bzw. 9,5 Monate bei Patienten

mit methyliertem MGMT-Status bzw. unmethyliertem MGMT-Status), obwohl es mit der bei der ersten Operation erhaltenen MGMT-Methylierung korreliert war (11,9 und 9,3 Monate bei Patienten mit methyliertem MGMT-Status bzw. unmethyliertem MGMT-Status) [105, 107]. Ebenso berichten Feldheim et al. in ihrer Studie, dass sie keine Korrelation zwischen dem MGMT-Promotor-Methylierungsstatus im Rezidiv und dem OS der Patienten feststellen konnten [106]. Damit kann keine eindeutige Aussage über den Einfluss der MGMT Promoter-Methylierung auf den klinischen Progress getroffen werden. Weitere Studien werden dafür nötig sein.

**p15 und p16.** Die Anzahl der in dieser Studie methylierten p15- (10,5 %) und p16-Promotoren (15,8 %) in Primärtumoren waren verglichen mit methylierten MGMT-Status (36,8 %) gering. Es ist bekannt, dass das Glioblastom, insbesondere im Vergleich zum MGMT-Methylierungsstatus, seltener einen methylierten p15- und p16-Promoter aufweist [86, 87]. Hegi et al. beschrieben in ihrer Studie einen methylierten MGMT-Promotor in 45 % von 206 untersuchten Tumoren [72]. Wemmert et al. untersuchten in einer Studie den Methylierungsstatus von p15, p16 und MGMT in Glioblastomen (n = 27) mittels MS-PCR und korrelierten die Ergebnisse mit klinischen Daten. Sie fanden einen methylierten p15-Status im GBM in 37 % der Fälle, einen methylierten p16-Status nur lediglich in 4,3 % der Fälle. Dabei erwies sich die Methylierung von p15 als ein signifikanter Prädiktor für ein kürzeres Gesamtüberleben (16,9 vs. 23,8 Monate, p = 0,025) [86]. Auch Urbschat et al. zeigten, dass die Methylierung von p15 mit einem signifikant niedrigeren OS einherging. Für die Wirkung von methylierten p16-Status fanden sie hingegen keine stichhaltige Evidenz [87]. Diese Auswirkung eines methylierten p15-Status auf klinische Parameter wie OS und PFS konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Das hier ausgewählte Kollektiv umfasst 19 Patienten, von denen lediglich zwei Patienten einen methylierten p15-Status im Primärtumor aufwiesen. Bei Erhöhung des Patientenkollektivs sind mehr Tumore mit methylierten p15-Status zu erwarten. So könnten sich bei Erhöhung des Patientenkollektivs signifikante Ergebnisse zeigen.

Nach aktuellem Kenntnisstand gehört diese Studie zu den ersten Arbeiten, die Methylierungsstatus des p15- und p16-Promoters im Glioblastomverlauf untersuchte. Interessant dabei ist, dass sich sowohl im Primärtumor als auch im Rezidiv seltener ein methylierter p15- (n = 5) und p16-Promoter-Status (n = 5) nachweisen ließ als ein unmethylierter Status (n = 14 für p15 und p16). Das Ergebnis unserer Studie deutet an, dass ein konstant methylierter p15- und p16-Status im GBM Krankheitsprogress selten bleibt. Besonders hervorzuheben ist, dass keiner der untersuchten Tumore mit methylierten p15- oder p16-Status im Primärtumor, einen entsprechend methylierten Zustand im Rezidiv hatte.

Sollte es sich in weiterführenden Studien bestätigen, dass methylierte p15- und p16-Status bei Krankheitsprogression zu unmethylierten Status konvertieren, könnten sich neue Möglichkeiten für die Verlaufskontrolle einer Glioblastomerkrankung ergeben. Für methylierte Primärtumore könnte damit ein Wechsel auf unmethylierte p15- oder p16-Status ein erstes Anzeichen einer Tumorprogression darstellen.

## 6.4 Limitationen

Eine wesentliche Limitation unserer Studie ist ein kleines Patientenkollektiv von  $n = 19$ . Studien, die sowohl GBM Primärtumore als auch Rezidive untersuchten, haben in der Literatur nicht selten kleine Patientenkollektive. Ilhan-Mutlu et al. arbeiteten in ihrer Studie, die GBM Primärtumore und Rezidive einschloss, mit einem Kollektiv von  $n = 15$  [89]. Die Autoren Bo et al. verfügten über ein etwas kleineres Kollektiv von  $n = 12$  [108]. Die Größe des vorliegenden Patientenkollektivs mit  $n = 19$  reiht sich damit in vergleichbare Studien ein. Ein ausschlaggebender Faktor für die Größe des Patientenkollektivs ist dabei der Studienzeitraum. In die vorliegende Studie wurden Patienten eingeschlossen, die sich zwischen 2006 und 2014 einer operativen Resektion eines Glioblastoms und anschließenden Resektion des Rezidivs unterzogen haben. Der hier gewählte Studienzeitraum von acht Jahren ist ebenfalls vergleichbar mit der Studie von Ilhan-Mutlu et al., die einen Studienzeitraum von sieben Jahren wählten. Eine Ausnahme stellt die Studie der Autoren Matos et al. dar, die durch Wahl eines langen Studienzeitraums von 14 Jahren immerhin eine Fallzahl von  $n = 83$  erreichen konnten [43]. Die Autoren hatten dabei Zugriff auf das nationale landesweite Krebsregister, was ein Grund für die Größe des Patientenkollektivs sein kann.

Experimentelle Studien, die in ihrem Patientenkollektiv nur einen einzelnen Tumor pro Patient untersuchen, arbeiteten in der Literatur in der Regel mit Fallzahlen zwischen 40 und 80 Patienten [36, 49, 50]. Das Patientenkollektiv bei Untersuchungen mehrerer Tumore einzelner Patienten wird durch mehrere Faktoren limitiert. Voraussetzung war zunächst, dass Tumormaterial von der initialen Operation sowie von der Rezidiv-Operation für experimentelle Untersuchungen verfügbar sein musste. Dies wurde dadurch sichergestellt, dass in die vorliegende experimentelle Studie nur diejenigen Patienten aufgenommen werden konnten, die beide Operationen an der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikum des Saarlandes vornehmen ließen. Eine Re-Operation beim GBM Rezidiv ist zudem nur dann eine Therapieoption, wenn Lokalisation und Größe des Tumors es erlauben. Eine Re-Operation stellt außerdem beim Rezidiv, im Gegensatz zum Primärtumor, keine Standardtherapie dar [13].

## 7. Ausblick

Glioblastome sind als die häufigsten malignen Hirntumore und mit ihrer schlechten Prognose ein relevantes Forschungsgebiet. Bestärkt durch vielversprechende Erkenntnisse bisheriger Studien, wie eine verbesserte Prognose mit einer Temozolomid-Therapie bei MGMT-Methylierung [71, 72], bleiben auch epigenetische Prozesse im Glioblastomen ein wichtiger Forschungsbereich. Die Dynamik epigenetischer Prozesse im zeitlichen Verlauf einer Glioblastom Erkrankung ist erst in wenigen Studien berücksichtigt worden. Dabei könnten Erkenntnisse über den longitudinalen Verlauf entscheidend sein, denn Veränderungen der Epigenetik könnten so im Tumorprogress neue Ansatzpunkte für Therapien oder Diagnostik liefern. Im Hinblick auf die hohe Rezidivrate von Glioblastomen ist daher die weitere Erforschung epigenetischer Prozesse im Krankheitsverlauf besonders wichtig. Unsere Arbeit reiht sich zwar inhaltlich und methodisch in vorherige Arbeiten ein, unterscheidet sich aber herausragend durch den Fokus auf neue, bisher nicht erforschte, Kombinationen an miRNAs. Bei der Auswahl waren zwei Arten von miRNAs relevant. Zum einen wurden potenzielle relevante miRNAs aufgenommen, zu deren epigenetischer Veränderung bislang aber keine Ergebnisse existieren (miRNA-24, miRNA-26a, miRNA-181d). Zum anderen wurde mit der miRNA-21 eine bereits untersuchte miRNA aufgenommen, bei der die Literatur aber zu heterogenen Ergebnissen kommt (vgl. Matos et al. und Ilhan-Mutlu et al.). Für die miRNA-21, -24, und -26a zeigten sich in der vorliegenden Studie keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Primärtumor und Rezidiv. Die Ergebnisse unserer miRNA-Analyse zeigten für die miRNA-181d Expression im Krankheitsverlauf einen signifikanten Zusammenhang mit einem Abfall der Expressionsrate im Rezidiv. Somit kann für diese miRNA eine potenzielle Rolle als prognostischer Marker vermutet werden. Hier könnte interessanterweise eine Verringerung der Expressionsrate auf ein entstehendes Rezidiv hinweisen.

Der MGMT-Methylierungsstatus im Glioblastom Primärtumor und Rezidiv wurde bereits in mehreren Studien untersucht. Dabei ist hervorzuheben, dass wir eine Stabilität des MGMT-Methylierungsstatus über den Krankheitsverlauf bestätigen konnten. Zum Methylierungsstatus von p15 und p16 in der Krankheitsprogression ist die Datenlage bisher spärlich. Insbesondere unsere Ergebnisse zur Dynamik des p15- und p16-Methylierungsstatus geben Einblicke in das Verhalten der Tumorsuppressorproteine im Glioblastomverlauf und geben vielversprechende Hinweise auf ihre Funktion als mögliche prognostische Parameter. Falls die vorliegenden Erkenntnisse sich auch in größeren Datensätzen bestätigen lassen, könnte insbesondere der Wechsel vom methylierten zum unmethylierten Status einen Hinweis auf einen Tumorprogress geben.

Für zukünftige Forschungsprojekte gehen aus dieser Arbeit und ihren Limitationen neue Fragestellungen hervor. Aufgrund der eingeschränkten Fallzahl stellt sich insbesondere die Frage, inwieweit eine Vergrößerung des Patientenkollektivs die hier gefundenen Ergebnisse bestätigt oder neue Erkenntnisse hervorbringt. Beispielsweise entsteht aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die Vermutung, dass ein methylierter p15- und p16-Status bei Krankheitsprogression zu einem unmethylierten Status konvertiert. Zur Überprüfung dieser Vermutung ist eine Erhöhung der Fallzahl notwendig. Die Analyse der miRNA-Expressionen im Krankheitsverlauf führte zudem in der vorliegenden Arbeit nur zu wenigen, signifikanten Zusammenhängen. Eine Erhöhung der Fallzahlen würde daher auch zu einem besseren Verständnis des Zusammenhangs zwischen miRNA-Expression und Krankheitsverlauf beitragen. Eine weitere Fragestellung ergibt sich aus der kombinierten Betrachtung mehrerer miRNAs. Unsere und auch vergleichbare Studien untersuchten den Einfluss jeder einzelnen miRNA auf den Krankheitsverlauf. Womöglich zeigen sich aber Effekte nicht nur für eine einzelne miRNA, sondern auch in Kombination mit einer anderen. Es wäre beispielsweise möglich, dass eine spezifische miRNA nur dann einen Aufschluss über den Krankheitsverlauf gibt, wenn eine weitere miRNA besonders hoch oder niedrig exprimiert ist. Neben der Auswahl einer geeigneten miRNA Kombination ist auch hier eine Erhöhung der Fallzahl notwendig. Grundsätzlich ist zudem eine Schwierigkeit bei der Interpretation bisheriger Forschungsergebnisse ist die Anwendung heterogener Methodik. Um ein hohes Maß an Vergleichbarkeit zukünftiger Forschungsergebnisse zu erzielen, ist eine Homogenisierung der Methodik sinnvoll. So kann beispielsweise durch Festlegung von Standards bei Referenzgenen eine höhere Vergleichbarkeit erzielt werden.

Zusammenfassend schaffen die bisherigen Erkenntnisse zur Rolle von miRNAs und DNA-Methylierungsprozessen bereits eine vielversprechende Grundlage zum besseren Verständnis der epigenetischen Prozesse im Glioblastom, die in weiteren Studien ausgebaut werden sollte. So wäre zu hoffen, dass man von weiteren neuen Erkenntnissen über epigenetische Dynamiken dieser tödlichen Erkrankung für die Diagnostik und Therapie profitieren kann.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Epidemiology and etiology of gliomas*. Acta Neuropathol, 2005. **109**(1): p. 93-108.
2. Davis, M.E., *Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment*. Clin J Oncol Nurs, 2016. **20**(5 Suppl): p. S2-8.
3. Siddiqui, J. and A.S. Krishnan, *Butterfly glioma*. New England Journal of Medicine, 2018. **378**(3): p. 281-281.
4. Bailey, P. and H. Cushing, *A classification of the tumors of the glioma group on a histogenic basis with a correlated study of prognosis*. 1928.
5. Urbanska, K., et al., *Glioblastoma multiforme - an overview*. Contemp Oncol (Pozn), 2014. **18**(5): p. 307-12.
6. Alifieris, C. and D.T. Trafalis, *Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment*. Pharmacol Ther, 2015. **152**: p. 63-82.
7. Wrensch, M., et al., *Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature*. Neuro-oncology, 2002. **4**(4): p. 278-299.
8. Khosla, D., *Concurrent therapy to enhance radiotherapeutic outcomes in glioblastoma*. Annals of translational medicine, 2016. **4**(3).
9. Batash, R., et al., *Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review*. Curr Med Chem, 2017. **24**(27): p. 3002-3009.
10. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(10): p. 987-996.
11. Lacroix, M., et al., *A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival*. J Neurosurg, 2001. **95**(2): p. 190-8.
12. Vredenburgh, J.J., et al., *Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme*. Journal of clinical oncology, 2007. **25**(30): p. 4722-4729.
13. Seystahl, K., W. Wick, and M. Weller, *Therapeutic options in recurrent glioblastoma—an update*. Critical reviews in oncology/hematology, 2016. **99**: p. 389-408.
14. Diaz, R.J., et al., *The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma*. Journal of neuro-oncology, 2017. **133**(3): p. 455-467.
15. Kim, M.M., Y. Umemura, and D. Leung, *Bevacizumab and glioblastoma: Past, present, and future directions*. The Cancer Journal, 2018. **24**(4): p. 180-186.



16. Saito, Y., et al., *Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells*. *Cancer Cell*, 2006. **9**(6): p. 435-43.
17. Chuang, J.C. and P.A. Jones, *Epigenetics and microRNAs*. *Pediatr Res*, 2007. **61**(5 Pt 2): p. 24R-29R.
18. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. *Nature*, 2004. **429**(6990): p. 457.
19. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. *Nature*, 2004. **431**(7006): p. 350-5.
20. Croce, C.M., *Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(10): p. 704-14.
21. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-54.
22. Wienholds, E. and R.H. Plasterk, *MicroRNA function in animal development*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(26): p. 5911-22.
23. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
24. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. *Nature*, 2000. **408**(6808): p. 86-9.
25. Kim, V.N. and J.W. Nam, *Genomics of microRNA*. *Trends Genet*, 2006. **22**(3): p. 165-73.
26. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. *Nat Rev Genet*, 2004. **5**(7): p. 522-31.
27. Sand, M., et al., *MicroRNAs and the skin: tiny players in the body's largest organ*. *J Dermatol Sci*, 2009. **53**(3): p. 169-75.
28. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. *EMBO J*, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
29. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. *cell*, 2009. **136**(2): p. 215-233.
30. Costa, P.M., et al., *MicroRNAs in glioblastoma: role in pathogenesis and opportunities for targeted therapies*. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2015. **14**(2): p. 222-38.
31. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(7): p. 2257-61.

32. Mendell, J.T., *miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease*. Cell, 2008. **133**(2): p. 217-22.
33. Tanaka, N., et al., *Frequent methylation and oncogenic role of microRNA-34b/c in small-cell lung cancer*. Lung Cancer, 2012. **76**(1): p. 32-8.
34. Griffiths-Jones, S., *The microRNA registry*. Nucleic acids research, 2004. **32**(suppl\_1): p. D109-D111.
35. Jiang, L., et al., *miR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patient survival*. Am J Pathol, 2010. **177**(1): p. 29-38.
36. Wu, Z., et al., *MiR-328 expression is decreased in high-grade gliomas and is associated with worse survival in primary glioblastoma*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47270.
37. Li, Y., et al., *MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes*. Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7569-76.
38. Chan, J.A., A.M. Krichevsky, and K.S. Kosik, *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells*. Cancer research, 2005. **65**(14): p. 6029-6033.
39. Si, M., et al., *miR-21-mediated tumor growth*. Oncogene, 2007. **26**(19): p. 2799-2803.
40. Lakomy, R., et al., *MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients*. Cancer Sci, 2011. **102**(12): p. 2186-90.
41. Zhang, Y., et al., *Prognostic Significance of MicroRNAs in Glioma: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Biomed Res Int, 2019. **2019**: p. 4015969.
42. Corsten, M.F., et al., *MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell-delivered S-TRAIL in human gliomas*. Cancer research, 2007. **67**(19): p. 8994-9000.
43. Matos, B., et al., *Dynamic expression of 11 miRNAs in 83 consecutive primary and corresponding recurrent glioblastoma: correlation to treatment, time to recurrence, overall survival and MGMT methylation status*. Radiol Oncol, 2018. **52**(4): p. 422-432.
44. Wu, L., et al., *MicroRNA-21 expression is associated with overall survival in patients with glioma*. Diagnostic pathology, 2013. **8**(1): p. 1-5.
45. Maachani, U.B., et al., *Modulation of miR-21 signaling by MPS1 in human glioblastoma*. Oncotarget, 2016. **7**(33): p. 52912.
46. Wang, X.F., et al., *MiR-181d acts as a tumor suppressor in glioma by targeting K-ras and Bcl-2*. J Cancer Res Clin Oncol, 2012. **138**(4): p. 573-84.
47. Zhang, W., et al., *miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression*. Neuro Oncol, 2012. **14**(6): p. 712-9.

48. Henriksen, M., et al., *MicroRNA expression signatures determine prognosis and survival in glioblastoma multiforme--a systematic overview*. Mol Neurobiol, 2014. **50**(3): p. 896-913.
49. Sippl, C., et al., *MiRNA-181d expression significantly affects treatment responses to carmustine wafer implantation*. Neurosurgery, 2019. **85**(1): p. 147-155.
50. Jesionek-Kupnicka, D., et al., *MiR-21, miR-34a, miR-125b, miR-181d and miR-648 levels inversely correlate with MGMT and TP53 expression in primary glioblastoma patients*. Arch Med Sci, 2019. **15**(2): p. 504-512.
51. Kreth, S., et al., *In human glioblastomas transcript elongation by alternative polyadenylation and miRNA targeting is a potent mechanism of MGMT silencing*. Acta Neuropathol, 2013. **125**(5): p. 671-81.
52. Jen, J., et al., *Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors*. Cancer research, 1994. **54**(24): p. 6353-6358.
53. Schmidt, E.E., et al., *CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas*. Cancer research, 1994. **54**(24): p. 6321-6324.
54. Giglio, S., et al., *Micro RNA mi R-24 promotes cell proliferation by targeting the CDKs inhibitors p27Kip1 and p16INK4a*. Journal of cellular physiology, 2013. **228**(10): p. 2015-2023.
55. Sippl, C., et al., *The Influence of Distinct Regulatory miRNAs of the p15/p16/RBI/E2F Pathway on the Clinical Progression of Glioblastoma Multiforme*. World neurosurgery, 2019. **132**: p. e900-e908.
56. Chen, L., et al., *MiR-24 regulates the proliferation and invasion of glioma by ST7L via beta-catenin/Tcf-4 signaling*. Cancer Lett, 2013. **329**(2): p. 174-80.
57. Chen, L., et al., *Expression and function of miR-27b in human glioma*. Oncology reports, 2011. **26**(6): p. 1617-1621.
58. Xiuju, C., W. Zhen, and S. Yanchao, *SOX7 inhibits tumor progression of glioblastoma and is regulated by miRNA-24*. Open Med (Wars), 2016. **11**(1): p. 133-137.
59. Huse, J.T., et al., *The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo*. Genes & development, 2009. **23**(11): p. 1327-1337.
60. Qian, X., et al., *MicroRNA-26a promotes tumor growth and angiogenesis in glioma by directly targeting prohibitin*. CNS Neurosci Ther, 2013. **19**(10): p. 804-12.
61. Sippl, C., et al., *miRNA-26a expression influences the therapy response to carmustine wafer implantation in patients with glioblastoma multiforme*. Acta neurochirurgica, 2019. **161**(11): p. 2299-2309.

62. López-Urrutia, E., et al., *MiR-26a downregulates retinoblastoma in colorectal cancer*. Tumor Biology, 2017. **39**(4): p. 1010428317695945.
63. Lu, J., et al., *MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2*. Cancer Res, 2011. **71**(1): p. 225-33.
64. Jeltsch, A., *Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases*. Chembiochem, 2002. **3**(4): p. 274-93.
65. Pradhan, S. and P.O. Esteve, *Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression*. Clin Immunol, 2003. **109**(1): p. 6-16.
66. Jeltsch, A., *Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **301**: p. 203-25.
67. Ziller, M.J., et al., *Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types*. PLoS Genet, 2011. **7**(12): p. e1002389.
68. Seisenberger, S., et al., *Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013. **368**(1609): p. 20110330.
69. Tano, K., et al., *Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(2): p. 686-90.
70. Nakagawachi, T., et al., *Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer*. Oncogene, 2003. **22**(55): p. 8835-44.
71. Hegi, M.E., et al., *Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(6): p. 1871-4.
72. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
73. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents*. New England Journal of Medicine, 2000. **343**(19): p. 1350-1354.
74. Hennig, W., *Genetik*. 2013: Springer-Verlag.
75. Bartek, J., J. Bartkova, and J. Lukas, *The retinoblastoma protein pathway and the restriction point*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(6): p. 805-14.
76. Finn, R.S., A. Aleshin, and D.J. Slamon, *Targeting the cyclin-dependent kinases (CDK) 4/6 in estrogen receptor-positive breast cancers*. Breast Cancer Res, 2016. **18**(1): p. 17.

77. Tramontano, A., et al., *Methylation of the Suppressor Gene p16INK4a: Mechanism and Consequences*. *Biomolecules*, 2020. **10**(3).
78. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. *nature*, 1993. **366**(6456): p. 704-707.
79. Hannon, G.J. and D. Beach, *p15INK4B is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest*. *Nature*, 1994. **371**(6494): p. 257-261.
80. Herman, J.G., et al., *Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B*. *Cancer research*, 1996. **56**(4): p. 722-727.
81. Liggett Jr, W.H. and D. Sidransky, *Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer*. *Journal of clinical oncology*, 1998. **16**(3): p. 1197-1206.
82. Lv, X., et al., *p16 Methylation was associated with the development, age, hepatic viruses infection of hepatocellular carcinoma, and p16 expression had a poor survival: A systematic meta-analysis (PRISMA)*. *Medicine*, 2017. **96**(38).
83. Xia, L., W. Zhang, and L. Gao, *Clinical and prognostic effects of CDKN2A, CDKN2B and CDH13 promoter methylation in ovarian cancer: a study using meta-analysis and TCGA data*. *Biomarkers*, 2019. **24**(7): p. 700-711.
84. Simon, M., et al., *Functional evidence for a role of combined CDKN2A (p16-p14 ARF)/CDKN2B (p15) gene inactivation in malignant gliomas*. *Acta neuropathologica*, 1999. **98**(5): p. 444-452.
85. Rasheed, A., et al., *Molecular markers of prognosis in astrocytic tumors*. *Cancer*, 2002. **94**(10): p. 2688-2697.
86. Wemmert, S., et al., *p15 promoter methylation - a novel prognostic marker in glioblastoma patients*. *Int J Oncol*, 2009. **34**(6): p. 1743-8.
87. Urbschat, S., et al., *Importance of biomarkers in glioblastomas patients receiving local BCNU wafer chemotherapy*. *Mol Cytogenet*, 2017. **10**: p. 16.
88. Agarwal, S., et al., *Therapy and progression-induced O6-methylguanine-DNA methyltransferase and mismatch repair alterations in recurrent glioblastoma multiforme*. *Indian journal of cancer*, 2015. **52**(4): p. 568.
89. Ilhan-Mutlu, A., et al., *Comparison of microRNA expression levels between initial and recurrent glioblastoma specimens*. *Journal of neuro-oncology*, 2013. **112**(3): p. 347-354.
90. Kamiryo, T., et al., *Analysis of homozygous deletion of the p16 gene and correlation with survival in patients with glioblastoma multiforme*. *J Neurosurg*, 2002. **96**(5): p. 815-22.
91. Bustin, S., *INVITED REVIEW Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. *Journal of molecular endocrinology*, 2002. **29**: p. 23-39.

92. Adams, G., *A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR*. The Biochemist, 2020. **42**(3): p. 48-53.
93. Arya, M., et al., *Basic principles of real-time quantitative PCR*. Expert review of molecular diagnostics, 2005. **5**(2): p. 209-219.
94. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method*. methods, 2001. **25**(4): p. 402-408.
95. Gressner, A.M. and T. Arndt, *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2019: Springer-Verlag.
96. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1827-31.
97. Fraga, M.F. and M. Esteller, *DNA methylation: a profile of methods and applications*. Biotechniques, 2002. **33**(3): p. 632, 634, 636-49.
98. Ebinger, M., et al., *Promoter methylation pattern of caspase-8, P16 INK4A, MGMT, TIMP-3, and E-cadherin in medulloblastoma*. Pathology & Oncology Research, 2004. **10**(1): p. 17-21.
99. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
100. Sippl, C., et al., *Promoter methylation of RB1, P15, P16, and MGMT and their impact on the clinical course of pilocytic astrocytomas*. Oncol Lett, 2018. **15**(2): p. 1600-1606.
101. Felsberg, J., et al., *Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas*. International journal of cancer, 2011. **129**(3): p. 659-670.
102. Lacroix, M., et al., *A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival*. Journal of neurosurgery, 2001. **95**(2): p. 190-198.
103. Budak, H., et al., *MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription*. Briefings in functional genomics, 2016. **15**(1): p. 65-71.
104. Bhaskaran, M. and M. Mohan, *MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease*. Veterinary pathology, 2014. **51**(4): p. 759-774.
105. Brandes, A.A., et al., *O 6-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications*. Neuro-oncology, 2010. **12**(3): p. 283-288.
106. Feldheim, J., et al., *Changes of O6-Methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation in Glioblastoma Relapse—A Meta-Analysis Type Literature Review*. Cancers, 2019. **11**(12): p. 1837.

107. Brandes, A.A., et al., *Role of MGMT Methylation Status at Time of Diagnosis and Recurrence for Patients with Glioblastoma: Clinical Implications*. *Oncologist*, 2017. **22**(4): p. 432-437.
108. Bo, L., et al., *Bioinformatics analysis of miRNA expression profile between primary and recurrent glioblastoma*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015. **19**(19): p. 3579-3586.

## 9. Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1 aus Siddiqui, Juveria, and Anant S. Krishnan. "Butterfly glioma." New England Journal of Medicine 378.3 (2018): Ein Glioblastom kann sich, im Aussehen an einen Schmetterling erinnernd, über beide Gehirnhemisphären ausbreiten. .... | 3  |
| Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Haarnadelstruktur einer pre-miRNA .....  | 6  |
| Abbildung 3 aus Sand, M., et al., MicroRNAs and the skin: tiny players in the body's largest organ.: miRNA Synthese und posttranskriptionelles Gensilencing .....  | 6  |
| Abbildung 4: Darstellung der chemischen Veränderung von Cytosin zu 5-Methylcytosin.....  | 11 |
| Abbildung 5: Stark vereinfachte Darstellung eines Ausschnittes der Zellzyklusregulierung: Funktion von p15 und p16. ....   | 13 |
| Abbildung 6: Darstellung der Phasen des Ansatzes im Reaktionsgefäß .....   | 20 |
| Abbildung 7: Pipettierschema der 0,2 ml PCR-Gefäße für die RT.....   | 23 |
| Abbildung 8: Beispiel eines Amplifikationsplots einer qPCR aus der vorliegenden Studie. ...  | 24 |
| Abbildung 9: Schematische Darstellung des Pipettierschemas auf der 96-Well Reaction Plate .....  | 26 |
| Abbildung 10: Stark vereinfachte schematische Darstellung der PCR.....   | 29 |
| Abbildung 11: Bisulfitkonversion: Desaminierung und Hydrolyse von Cytosin zu Uracil.....   | 29 |
| Abbildung 12 aus Dammann R (2006) Analyse der genomischen DNA-Methylierung, Seite 823, Abbildung 31.2. In: Lottspeich F, Engels JW (Eds.): Bioanalytik. 2. Ed Springer Akademischer Verlag, Heidelberg: 821-832.....                               | 30 |
| Abbildung 13: Schematische Darstellung einer Gelelektrophoresevorrichtung .....  | 34 |
| Abbildung 14: Pipettierplan eines Gels mit 20 Kammern für die Agarosegelelektrophorese .   | 35 |
| Abbildung 15: Foto eines Gels (p15-Lauf). Die roten Kreise markieren das positive Signal im Bereich der methylierten Proben. Damit sind diese als positiv methyliert einzustufen.....  | 36 |
| Abbildung 16: Kaplan-Meier Kurve für OS.....   | 38 |



|  |    |
|--|----|
| Abbildung 17: Kaplan-Meier Kurve für PFS .....   | 39 |
| Abbildung 18: Durchschnittliche miRNA181d Expression in Primärtumor und Rezidiv.....   | 41 |
| Abbildung 19: miRNA-21 Expression im Primärtumor und Rezidiv .....   | 43 |
| Abbildung 20: miRNA-24 Expression im Primärtumor und Rezidiv .....   | 45 |
| Abbildung 21: miRNA-26a Expression im Primärtumor und Rezidiv .....  | 47 |
| Abbildung 22: Korrelationen der einzelnen miRNAs; $\rho$ = Pearson-Korrelationskoeffizient;<br>Signifikanz zum Niveau $\alpha = 0,050,01$ durch */** ..... | 48 |
| Abbildung 23: Korrelation MGMT-Status Rezidiv mit PFS und OS.....  | 54 |
| Abbildung 24: Dynamik des MGMT-Status und Auswirkung auf OS/PFS.....   | 55 |
| Abbildung 25: Lineare Regression: miRNA-181d Primärtumor – Rezidiv.....  | 90 |

## 10. Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Inhalt des miRNeasy Mini Kit.....  | 19 |
| Tabelle 2: Inhalt des TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit.....                | 21 |
| Tabelle 3: miRNA Primer .....   | 22 |
| Tabelle 4: Mastermix für die reverse Transkription.....                             | 22 |
| Tabelle 5: Schritte der reversen Transkription im Thermal Cycler .....              | 23 |
| Tabelle 6: Beschriftung der Mastermixe der Primer .....                             | 25 |
| Tabelle 7: Mastermix für die qPCR .....   | 25 |
| Tabelle 8: Programm der qPCR.....   | 26 |
| Tabelle 9: Inhalt des QIAamp DNA Mini Kit.....                                      | 27 |
| Tabelle 10: Inhalt des EZ DNA Methylation-Gold™ Kit.....                            | 31 |
| Tabelle 11: Thermal Cycler Programm.....  | 32 |
| Tabelle 12: Bestandteile des Mastermix für die MS-PCR.....                          | 33 |
| Tabelle 13: TBE Puffer Ansatz .....   | 35 |
| Tabelle 14: zweiseitiger t-Test der mittleren miRNA-Expressionen.....               | 41 |
| Tabelle 15: Lineare Regression miRNA-181d Primärtumor - Rezidiv .....               | 42 |
| Tabelle 16: Lineare Regression miRNA-21 Primärtumor - Rezidiv .....                 | 43 |
| Tabelle 17: Auszug Korrelationsmatrix miRNA-21.....                                 | 44 |
| Tabelle 18: Lineare Regression miRNA-24 Primärtumor - Rezidiv .....                 | 45 |
| Tabelle 19: Lineare Regression miRNA-26a Primärtumor - Rezidiv .....                | 47 |
| Tabelle 20: Korrelationsanalyse Resektionsausmaß Rezidiv – miRNA-181d Rezidiv ..... | 49 |

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 21: Übersicht Methylierungsstatus.....                                       | 50 |
| Tabelle 22: Übersicht über die Dynamik des MGMT-Methylierungsstatus.....             | 51 |
| Tabelle 23: Übersicht über die Dynamik des p15-Methylierungsstatus .....             | 51 |
| Tabelle 24: Übersicht über die Dynamik des p16-Methylierungsstatus .....             | 52 |
| Tabelle 25: Primersequenzen für die MS-PCR .....                                     | 87 |
| Tabelle 26: Thermal Cycler Programme für p15, p16 und MGMT .....                     | 88 |
| Tabelle 27: Mittelwertvergleich für Stichproben mit paarigen Werten - miRNA.....     | 89 |
| Tabelle 28: Korrelationen für Stichproben mit paarigen Werten - miRNA.....           | 89 |
| Tabelle 29: Lineare Regression: Modellübersicht und ANOVA miRNA-181d.....            | 90 |
| Tabelle 30: Lineare Regression: Modellübersicht und ANOVA miRNA-21 .....             | 91 |
| Tabelle 31: Lineare Regression: Modellübersicht und ANOVA miRNA-24 .....             | 91 |
| Tabelle 32: Lineare Regression: Modellübersicht und ANOVA miRNA-26a.....             | 92 |
| Tabelle 33: Inter-miRNA Korrelationsanalyse.....                                     | 92 |
| Tabelle 34: Korrelationen miRNA-181d - klinische Parameter.....                      | 93 |
| Tabelle 35: Korrelationen miRNA-21 - klinische Parameter .....                       | 94 |
| Tabelle 36: Korrelationen miRNA-24 - klinische Parameter .....                       | 95 |
| Tabelle 37: Korrelationen miRNA-26a - klinische Parameter.....                       | 96 |
| Tabelle 38: Lineare Regression miRNA-181d Primärtumor und Rezidiv - OS und PFS ..... | 97 |
| Tabelle 39: Lineare Regression miRNA-21 Primärtumor und Rezidiv - OS und PFS .....   | 97 |
| Tabelle 40: Lineare Regression miRNA-24 Primärtumor und Rezidiv - OS und PFS .....   | 98 |
| Tabelle 41: Lineare Regression miRNA-26a Primärtumor und Rezidiv - OS und PFS .....  | 98 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabelle 42: Korrelationen MGMT-Status .....                               | 99  |
| Tabelle 43: Lineare Regression MGMT-Status .....                          | 99  |
| Tabelle 44: Korrelationen p15-Status.....                                 | 100 |
| Tabelle 45: Korrelationen p16-Status.....                                 | 100 |
| Tabelle 46: Korrelationen MGMT-Status - klinische Parameter .....         | 101 |
| Tabelle 47: Korrelationen MGMT-Methylierungsstatus Dynamik - OS/PFS ..... | 102 |
| Tabelle 48: Korrelationen p15-Status - klinische Parameter.....           | 103 |
| Tabelle 49: Korrelationen p16-Status - klinische Parameter.....           | 104 |

## 11. Materialverzeichnis

Die Tabelle zeigt die Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte der experimentellen Untersuchungen aus dem Abschnitt „Material und Methoden“ (alphabetisch sortiert).

| <b>Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte</b>                   | <b>Hersteller</b>   |
|---|---|
| Agarose   | peq-GOLD Universal-Agarose, PeqLab, Germany   |
| Borsäure  | Roth, 6943.1  |
| Chloroform  | Fisher Scientific, Schwerte, Germany  |
| Dispergiergerät (ULTRA-TURRAX®)                                     | IKA®, Staufen, Germany  |
| dNTP-Mix  | Thermo Fisher Scientific, MA, USA   |
| EDTA  | Sigma, E5134  |
| Ethanol (99 %)  | Sigma Aldrich, Steinheim, Germany   |
| Ethiumbromid  | Merck KGaA, Darmstadt, Germany  |
| Folie für MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)            | MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt, Germany |
| Fotoprogramm  | DeVision G, Vers. 2.0.; Decon Science Tec GmbH, Hohengandern, Germany                     |
| Gelelektrophorese Leiter (50bp DNA Ladder)                          | New England BioLabs, Frankfurt a.M., Germany  |
| Gelelektrophorsekammer  | Owl™ EasyCast™ B3, Fisher Scientific, Schwerte, Germany                                   |
| HotStarTaq® Polymerase  | QIAGEN, Hilden, Germany   |
| Kamera  | CU105M, 8030102 Rainbow, Japan  |
| Loading Dye   | VWR, Darmstadt, Germany   |
| Primer methyliert/unmethyliert (forward/reverse) für MGMT, p15, p16 | Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany   |

|   |   |
|---|---|
| MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)              | Applied Biosystems® Life Technologies,<br>Darmstadt, Germany  |
| Mikrozentrifugen  | Galaxy Mini Star Microcentrifuge, VWR, Radnor,<br>PA, USA<br><br>Minispin, Eppendorf AG, Hamburg, Germany |
| Positivkontrolle/Negativkontrolle (DNA)                     | Zymo Research, Freiburg, Germany  |
| RNase-freies Wasser   | Life Technologies, Darmstadt, Germany   |
| RNaseZAP™   | Sigma Life Science, St. Louis Missouri, USA   |
| Spectrophotometer   | NanoDrop-ND-2000, Fisher Scientific, Schwerte,<br>Germany   |
| StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems<br>StepOne Software v2.3 | Applied Biosystems® Life Technologies,<br>Darmstadt, Germany  |
| Taq-Puffer 10x  | QIAGEN, Hilden, Germany   |
| Thermal Cycler (MS-PCR)                                     | PTC-100, MJ Research, Massachusetts, USA  |
| Thermal Cycler (RT)   | PTC-200, MJ Research, Quebec, Canada  |
| Trizmabase  | Sigma, T1503  |
| UV-Transilluminator   | Wealtec, Sparks, USA  |
| Vortexmischer   | MS1 Minishaker, IKA®, Staufen, Germany<br><br>Retsch Mixer, Retsch GmbH, Haan, Germany                    |
| VWR Light-Duty Tissue Wipers                                | VWR, Radnor Pennsylvania, USA   |
| Wasserbad   | Type 1012, GFL GmbH, Burgwedel, Germany   |
| Zentrifugen   | Sigma 3-16PK, Hettich, Tuttlingen, Germany<br><br>Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg,<br>Germany     |

## 12. Anhang

### 12.1 Material und Methoden

Tabelle 25: Primersequenzen für die MS-PCR

|                                    |                                     |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>MGMT</b>                        |                                     |
| <b>methyliert, 122 bp, 54 °C</b>   |                                     |
| • forward                          | 5'-GTTTTTAGAACGTTTTGCGTTTCGAC-3'    |
| • reverse                          | 5'-CACCGTCCCGAAAAAAAAACTCCG-3'      |
| <b>unmethyliert, 129 bp, 56 °C</b> |                                     |
| • forward                          | 5'-TGTGTTTTTAGAATGTTTTGTGTTTTGAT-3' |
| • reverse                          | 5'-CTACCACCATCCCAAAAAAAAAACTCCA-3'  |
| <b>p15</b>                         |                                     |
| <b>methyliert, 148 bp, 60 °C</b>   |                                     |
| • forward                          | 5'-GCGTTCGTATTTTGC GGTT-3'          |
| • reverse                          | 5'-CGTACAATAACCGAACGACCGA-3'        |
| <b>unmethyliert, 154 bp, 60 °C</b> |                                     |
| • forward                          | 5'-TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT-3'     |
| • reverse                          | 5'-CCATACAATAACCAAACAACCAA-3'       |
| <b>p16</b>                         |                                     |
| <b>methyliert, 150 bp, 65 °C</b>   |                                     |
| • forward                          | 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'      |
| • reverse                          | 5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'         |
| <b>unmethyliert, 151 bp, 65 °C</b> |                                     |
| • forward                          | 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'      |
| • reverse                          | 5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3'        |

bp = Basenpaarlänge des resultierenden PCR-Produktes

**Tabelle 26: Thermal Cycler Programme für p15, p16 und MGMT**

| <b>p16 methyliert</b> |   |
|-----------------------|---|
| Schritt 1             | Erhitzen auf 95 °C für 15 min           |
| Schritt 2             | Erhitzen auf 95 °C für 1 min            |
| Schritt 3             | Erhitzen auf 65 °C für 1 min            |
| Schritt 4             | Erhitzen auf 72 °C für 1 min            |
| Schritt 5             | Wiederholung Schritte 2 - 4 (39 Zyklen) |
| Schritt 6             | Erhitzen auf 72 °C für 10 min           |
| Schritt 7             | Kühlung auf 4 °C                        |

| <b>MGMT methyliert</b> |   |
|------------------------|---|
| Schritt 1              | Erhitzen auf 95 °C für 15 min           |
| Schritt 2              | Erhitzen auf 95 °C für 30 s             |
| Schritt 3              | Erhitzen auf 54 °C für 30 s             |
| Schritt 4              | Erhitzen auf 72 °C für 30 s             |
| Schritt 5              | Wiederholung Schritte 2 - 4 (36 Zyklen) |
| Schritt 6              | Erhitzen auf 72 °C für 5 min            |
| Schritt 7              | Kühlung auf 4 °C                        |

| <b>p15 methyliert/unmethyliert</b> |   |
|------------------------------------|---|
| Schritt 1                          | Erhitzen auf 95 °C für 15 min           |
| Schritt 2                          | Erhitzen auf 95 °C für 45 s             |
| Schritt 3                          | Erhitzen auf 60 °C für 45 s             |
| Schritt 4                          | Erhitzen auf 72 °C für 1 min            |
| Schritt 5                          | Wiederholung Schritte 2 - 4 (37 Zyklen) |
| Schritt 6                          | Erhitzen auf 72 °C für 10 min           |
| Schritt 7                          | Kühlung auf 4 °C                        |

| <b>p16 unmethyliert</b> |   |
|-------------------------|---|
| Schritt 1               | Erhitzen auf 95 °C für 15 min           |
| Schritt 2               | Erhitzen auf 95 °C für 1 min            |
| Schritt 3               | Erhitzen auf 60 °C für 1 min            |
| Schritt 4               | Erhitzen auf 72 °C für 1 min            |
| Schritt 5               | Wiederholung Schritte 2 - 4 (36 Zyklen) |
| Schritt 6               | Erhitzen auf 72 °C für 10 min           |
| Schritt 7               | Kühlung auf 4 °C                        |

| <b>MGMT unmethyliert</b> |   |
|--------------------------|---|
| Schritt 1                | Erhitzen auf 95 °C für 15 min           |
| Schritt 2                | Erhitzen auf 95 °C für 30 s             |
| Schritt 3                | Erhitzen auf 56 °C für 30 s             |
| Schritt 4                | Erhitzen auf 72 °C für 30 s             |
| Schritt 5                | Wiederholung Schritte 2 - 4 (38 Zyklen) |
| Schritt 6                | Erhitzen auf 72 °C für 5 min            |
| Schritt 7                | Kühlung auf 4 °C                        |



## 12.2 Ergebnisse aus 5.2.

**Tabelle 27: Mittelwertvergleich für Stichproben mit paarigen Werten - miRNA**

**Statistik für Stichproben mit paarigen Werten**

|        |                          | Mittelwert | H  | Standardabweichung | Standardfehler Mittelwert |
|--------|--------------------------|------------|----|--------------------|---------------------------|
| Paar 1 | FC miRNA181d Primärtumor | 4,247855   | 19 | 3,6111019          | ,8284436                  |
|        | FC miRNA181d Rezidiv     | 2,359080   | 19 | 1,3336080          | ,3059507                  |
| Paar 2 | FC miRNA21 Primärtumor   | ,252155    | 19 | ,3012865           | ,0691199                  |
|        | FC miRNA21 Rezidiv       | ,261152    | 19 | ,2648642           | ,0607640                  |
| Paar 3 | FC miRNA24 Primärtumor   | ,708013    | 19 | ,5824882           | ,1336320                  |
|        | FC miRNA24 Rezidiv       | ,539842    | 19 | ,2840181           | ,0651582                  |
| Paar 4 | FC miRNA26a Primärtumor  | ,403456    | 19 | ,2624891           | ,0602191                  |
|        | FC miRNA26a Rezidiv      | ,346253    | 19 | ,2304975           | ,0528798                  |

**Tabelle 28: Korrelationen für Stichproben mit paarigen Werten - miRNA**

**Korrelationen für Stichproben mit paarigen Werten**

|        |   | H  | Korrelation | Sig. |
|--------|---|----|-------------|------|
| Paar 1 | FC miRNA181d Primärtumor & FC miRNA181d Rezidiv | 19 | ,615        | ,005 |
| Paar 2 | FC miRNA21 Primärtumor & FC miRNA21 Rezidiv     | 19 | ,356        | ,134 |
| Paar 3 | FC miRNA24 Primärtumor & FC miRNA24 Rezidiv     | 19 | ,073        | ,768 |
| Paar 4 | FC miRNA26a Primärtumor & FC miRNA26a Rezidiv   | 19 | ,151        | ,537 |

**Tabelle 29: Lineare Regression: Modellübersicht und ANOVA miRNA-181d**

**Modellübersicht**

| Modell | R                 | R-Quadrat | Angepasstes R-Quadrat | Standardfehler der Schätzung |
|--------|-------------------|-----------|-----------------------|------------------------------|
| 1      | ,615 <sup>a</sup> | ,379      | ,342                  | 1,0817732                    |

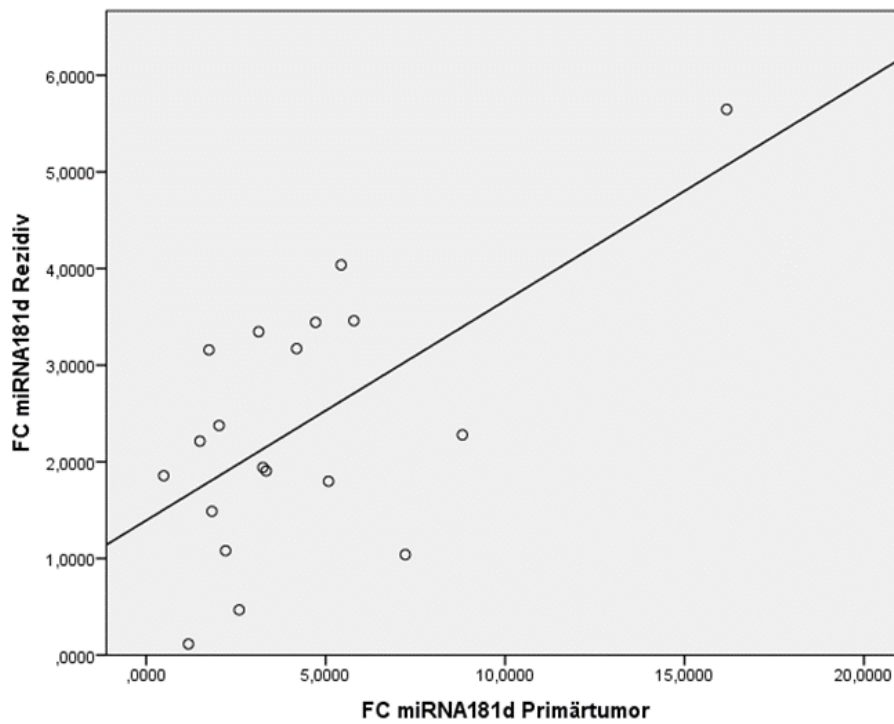
a. Prädiktoren: (Konstante), FC miRNA181d Primärtumor

**ANOVA<sup>a</sup>**

| Modell |             | Quadratsumme | df | Mittel der Quadrate | F      | Sig.              |
|--------|-------------|--------------|----|---------------------|--------|-------------------|
| 1      | Regression  | 12,119       | 1  | 12,119              | 10,356 | ,005 <sup>b</sup> |
|        | Residuum    | 19,894       | 17 | 1,170               |        |                   |
|        | Gesamtsumme | 32,013       | 18 |                     |        |                   |

a. Abhängige Variable: FC miRNA181d Rezidiv

b. Prädiktoren: (Konstante), FC miRNA181d Primärtumor



**Abbildung 25: Lineare Regression: miRNA-181d Primärtumor – Rezidiv**

**Tabelle 30: Lineare Regression: Modellübersicht und ANOVA miRNA-21**

**Modellübersicht**

| Modell | R                 | R-Quadrat | Angepasstes R-Quadrat | Standardfehler der Schätzung |
|--------|-------------------|-----------|-----------------------|------------------------------|
| 1      | ,356 <sup>a</sup> | ,127      | ,076                  | ,2546626                     |

a. Prädiktoren: (Konstante), FC miRNA21 Primärtumor

**ANOVA<sup>a</sup>**

| Modell |             | Quadratsumme | df | Mittel der Quadrate | F     | Sig.              |
|--------|-------------|--------------|----|---------------------|-------|-------------------|
| 1      | Regression  | ,160         | 1  | ,160                | 2,471 | ,134 <sup>b</sup> |
|        | Residuum    | 1,103        | 17 | ,065                |       |                   |
|        | Gesamtsumme | 1,263        | 18 |                     |       |                   |

a. Abhängige Variable: FC miRNA21 Rezidiv

b. Prädiktoren: (Konstante), FC miRNA21 Primärtumor

**Tabelle 31: Lineare Regression: Modellübersicht und ANOVA miRNA-24**

**Modellübersicht**

| Modell | R                 | R-Quadrat | Angepasstes R-Quadrat | Standardfehler der Schätzung |
|--------|-------------------|-----------|-----------------------|------------------------------|
| 1      | ,073 <sup>a</sup> | ,005      | -,053                 | ,2914799                     |

a. Prädiktoren: (Konstante), FC miRNA24 Primärtumor

**ANOVA<sup>a</sup>**

| Modell |             | Quadratsumme | df | Mittel der Quadrate | F    | Sig.              |
|--------|-------------|--------------|----|---------------------|------|-------------------|
| 1      | Regression  | ,008         | 1  | ,008                | ,090 | ,768 <sup>b</sup> |
|        | Residuum    | 1,444        | 17 | ,085                |      |                   |
|        | Gesamtsumme | 1,452        | 18 |                     |      |                   |

a. Abhängige Variable: FC miRNA24 Rezidiv

b. Prädiktoren: (Konstante), FC miRNA24 Primärtumor

**Tabelle 32: Lineare Regression: Modellübersicht und ANOVA miRNA-26a**

**Modellübersicht**

| Modell | R                 | R-Quadrat | Angepasstes R-Quadrat | Standardfehler der Schätzung |
|--------|-------------------|-----------|-----------------------|------------------------------|
| 1      | ,151 <sup>a</sup> | ,023      | -,035                 | ,2344520                     |

a. Prädiktoren: (Konstante), FC miRNA26a Primärtumor

**ANOVA<sup>a</sup>**

| Modell |             | Quadratsumme | df | Mittel der Quadrate | F    | Sig.              |
|--------|-------------|--------------|----|---------------------|------|-------------------|
| 1      | Regression  | ,022         | 1  | ,022                | ,398 | ,537 <sup>b</sup> |
|        | Residuum    | ,934         | 17 | ,055                |      |                   |
|        | Gesamtsumme | ,956         | 18 |                     |      |                   |

a. Abhängige Variable: FC miRNA26a Rezidiv

b. Prädiktoren: (Konstante), FC miRNA26a Primärtumor

**Tabelle 33: Inter-miRNA Korrelationsanalyse**

**Korrelationen**

|                          |                     | FC miRNA181d Primärtumor | FC miRNA181d Rezidiv | FC miRNA21 Primärtumor | FC miRNA21 Rezidiv | FC miRNA24 Primärtumor | FC miRNA24 Rezidiv | FC miRNA26a Primärtumor | FC miRNA26a Rezidiv |
|--------------------------|---------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|
| FC miRNA181d Primärtumor | Pearson-Korrelation | 1                        | ,615**               | ,028                   | ,079               | ,185                   | ,388               | ,588**                  | ,274                |
|                          | Sig. (2-seitig)     |                          | ,005                 | ,910                   | ,748               | ,448                   | ,101               | ,008                    | ,256                |
|                          | N                   | 19                       | 19                   | 19                     | 19                 | 19                     | 19                 | 19                      | 19                  |
| FC miRNA181d Rezidiv     | Pearson-Korrelation | ,615**                   | 1                    | -,025                  | ,112               | ,191                   | ,772**             | ,507*                   | ,740**              |
|                          | Sig. (2-seitig)     | ,005                     |                      | ,918                   | ,647               | ,434                   | ,000               | ,027                    | ,000                |
|                          | N                   | 19                       | 19                   | 19                     | 19                 | 19                     | 19                 | 19                      | 19                  |
| FC miRNA21 Primärtumor   | Pearson-Korrelation | ,028                     | -,025                | 1                      | ,356               | ,718**                 | -,089              | ,500*                   | -,152               |
|                          | Sig. (2-seitig)     | ,910                     | ,918                 |                        | ,134               | ,001                   | ,717               | ,029                    | ,535                |
|                          | N                   | 19                       | 19                   | 19                     | 19                 | 19                     | 19                 | 19                      | 19                  |
| FC miRNA21 Rezidiv       | Pearson-Korrelation | ,079                     | ,112                 | ,356                   | 1                  | ,001                   | ,478*              | ,028                    | ,134                |
|                          | Sig. (2-seitig)     | ,748                     | ,647                 | ,134                   |                    | ,998                   | ,038               | ,909                    | ,584                |
|                          | N                   | 19                       | 19                   | 19                     | 19                 | 19                     | 19                 | 19                      | 19                  |
| FC miRNA24 Primärtumor   | Pearson-Korrelation | ,185                     | ,191                 | ,718**                 | ,001               | 1                      | ,073               | ,626**                  | -,003               |
|                          | Sig. (2-seitig)     | ,448                     | ,434                 | ,001                   | ,998               |                        | ,768               | ,004                    | ,992                |
|                          | N                   | 19                       | 19                   | 19                     | 19                 | 19                     | 19                 | 19                      | 19                  |
| FC miRNA24 Rezidiv       | Pearson-Korrelation | ,388                     | ,772**               | -,089                  | ,478*              | ,073                   | 1                  | ,296                    | ,699**              |
|                          | Sig. (2-seitig)     | ,101                     | ,000                 | ,717                   | ,038               | ,768                   |                    | ,218                    | ,001                |
|                          | N                   | 19                       | 19                   | 19                     | 19                 | 19                     | 19                 | 19                      | 19                  |
| FC miRNA26a Primärtumor  | Pearson-Korrelation | ,588**                   | ,507*                | ,500*                  | ,028               | ,626**                 | ,296               | 1                       | ,151                |
|                          | Sig. (2-seitig)     | ,008                     | ,027                 | ,029                   | ,909               | ,004                   | ,218               |                         | ,537                |
|                          | N                   | 19                       | 19                   | 19                     | 19                 | 19                     | 19                 | 19                      | 19                  |
| FC miRNA26a Rezidiv      | Pearson-Korrelation | ,274                     | ,740**               | -,152                  | ,134               | -,003                  | ,699**             | ,151                    | 1                   |
|                          | Sig. (2-seitig)     | ,256                     | ,000                 | ,535                   | ,584               | ,992                   | ,001               | ,537                    |                     |
|                          | N                   | 19                       | 19                   | 19                     | 19                 | 19                     | 19                 | 19                      | 19                  |

\*\* Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

\* Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

**Tabelle 34: Korrelationen miRNA-181d - klinische Parameter**

**Korrelationen**

|                    |                     | FC miRNA181d<br>1. OP | FC miRNA181d<br>2. OP | VES<br>miRNA181d | Alter bei ED | OS     | PFS nach 1.<br>OP |
|--------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|--------------|--------|-------------------|
| FC miRNA181d 1. OP | Pearson-Korrelation | 1                     | ,615**                | ,420             | ,132         | -,174  | -,037             |
|                    | Sig. (2-seitig)     |                       | ,005                  | ,073             | ,590         | ,476   | ,881              |
|                    | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19           | 19     | 19                |
| FC miRNA181d 2. OP | Pearson-Korrelation | ,615**                | 1                     | -,106            | ,052         | -,031  | ,196              |
|                    | Sig. (2-seitig)     | ,005                  |                       | ,665             | ,831         | ,901   | ,422              |
|                    | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19           | 19     | 19                |
| VES miRNA181d      | Pearson-Korrelation | ,420                  | -,106                 | 1                | ,277         | ,036   | -,010             |
|                    | Sig. (2-seitig)     | ,073                  | ,665                  |                  | ,251         | ,883   | ,968              |
|                    | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19           | 19     | 19                |
| Alter bei ED       | Pearson-Korrelation | ,132                  | ,052                  | ,277             | 1            | -,147  | -,068             |
|                    | Sig. (2-seitig)     | ,590                  | ,831                  | ,251             |              | ,548   | ,781              |
|                    | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19           | 19     | 19                |
| OS                 | Pearson-Korrelation | -,174                 | -,031                 | ,036             | -,147        | 1      | ,817**            |
|                    | Sig. (2-seitig)     | ,476                  | ,901                  | ,883             | ,548         |        | ,000              |
|                    | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19           | 19     | 19                |
| PFS nach 1. OP     | Pearson-Korrelation | -,037                 | ,196                  | -,010            | -,068        | ,817** | 1                 |
|                    | Sig. (2-seitig)     | ,881                  | ,422                  | ,968             | ,781         | ,000   |                   |
|                    | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19           | 19     | 19                |

\*\* . Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

**Korrelationen**

|                        |                     | FC miRNA181d<br>1. OP | FC miRNA181d<br>2. OP | VES<br>miRNA181d | Geschlecht | Karnofsky OP<br>1 | Karnofsky OP<br>2 | Resektionsausmaß<br>1. OP | Resektionsausmaß<br>2. OP |
|------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|------------|-------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| FC miRNA181d 1. OP     | Pearson-Korrelation | 1                     | ,615**                | ,420             | ,127       | -,143             | ,085              | -,290                     | -,249                     |
|                        | Sig. (2-seitig)     |                       | ,005                  | ,073             | ,603       | ,559              | ,730              | ,229                      | ,304                      |
|                        | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| FC miRNA181d 2. OP     | Pearson-Korrelation | ,615**                | 1                     | -,106            | -,135      | ,051              | -,133             | -,322                     | -,466*                    |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,005                  |                       | ,665             | ,582       | ,836              | ,588              | ,178                      | ,045                      |
|                        | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| VES miRNA181d          | Pearson-Korrelation | ,420                  | -,106                 | 1                | ,039       | -,173             | ,327              | ,268                      | ,205                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,073                  | ,665                  |                  | ,874       | ,479              | ,171              | ,268                      | ,400                      |
|                        | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Geschlecht             | Pearson-Korrelation | ,127                  | -,135                 | ,039             | 1          | -,221             | ,034              | ,430                      | ,262                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,603                  | ,582                  | ,874             |            | ,363              | ,891              | ,066                      | ,279                      |
|                        | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Karnofsky OP 1         | Pearson-Korrelation | -,143                 | ,051                  | -,173            | -,221      | 1                 | -,133             | -,105                     | -,467*                    |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,559                  | ,836                  | ,479             | ,363       |                   | ,587              | ,669                      | ,044                      |
|                        | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Karnofsky OP 2         | Pearson-Korrelation | ,085                  | -,133                 | ,327             | ,034       | -,133             | 1                 | -,127                     | -,159                     |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,730                  | ,588                  | ,171             | ,891       | ,587              |                   | ,604                      | ,515                      |
|                        | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Resektionsausmaß 1. OP | Pearson-Korrelation | -,290                 | -,322                 | ,268             | ,430       | -,105             | -,127             | 1                         | ,402                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,229                  | ,178                  | ,268             | ,066       | ,669              | ,604              |                           | ,088                      |
|                        | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Resektionsausmaß 2. OP | Pearson-Korrelation | -,249                 | -,466*                | ,205             | ,262       | -,467*            | -,159             | ,402                      | 1                         |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,304                  | ,045                  | ,400             | ,279       | ,044              | ,515              | ,088                      |                           |
|                        | N                   | 19                    | 19                    | 19               | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |

\*\* . Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

\* . Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

**Tabelle 35: Korrelationen miRNA-21 - klinische Parameter**

**Korrelationen**

|                  |                     | FC miRNA21<br>1. OP | FC miRNA21<br>2. OP | VES<br>miRNA21 | Alter bei ED | OS     | PFS nach 1.<br>OP |
|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------|--------------|--------|-------------------|
| FC miRNA21 1. OP | Pearson-Korrelation | 1                   | ,356                | ,661**         | -,017        | -,199  | -,144             |
|                  | Sig. (2-seitig)     |                     | ,134                | ,002           | ,944         | ,415   | ,556              |
|                  | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19           | 19     | 19                |
| FC miRNA21 2. OP | Pearson-Korrelation | ,356                | 1                   | -,156          | -,275        | -,145  | ,088              |
|                  | Sig. (2-seitig)     | ,134                |                     | ,522           | ,254         | ,555   | ,720              |
|                  | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19           | 19     | 19                |
| VES miRNA21      | Pearson-Korrelation | ,661**              | -,156               | 1              | ,215         | -,249  | -,176             |
|                  | Sig. (2-seitig)     | ,002                | ,522                |                | ,376         | ,304   | ,471              |
|                  | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19           | 19     | 19                |
| Alter bei ED     | Pearson-Korrelation | -,017               | -,275               | ,215           | 1            | -,147  | -,068             |
|                  | Sig. (2-seitig)     | ,944                | ,254                | ,376           |              | ,548   | ,781              |
|                  | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19           | 19     | 19                |
| OS               | Pearson-Korrelation | -,199               | -,145               | -,249          | -,147        | 1      | ,817**            |
|                  | Sig. (2-seitig)     | ,415                | ,555                | ,304           | ,548         |        | ,000              |
|                  | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19           | 19     | 19                |
| PFS nach 1. OP   | Pearson-Korrelation | -,144               | ,088                | -,176          | -,068        | ,817** | 1                 |
|                  | Sig. (2-seitig)     | ,556                | ,720                | ,471           | ,781         | ,000   |                   |
|                  | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19           | 19     | 19                |

\*\* . Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

**Korrelationen**

|                        |                     | FC miRNA21<br>1. OP | FC miRNA21<br>2. OP | VES<br>miRNA21 | Geschlecht | Karnofsky OP<br>1 | Karnofsky OP<br>2 | Resektionsausmaß<br>1. OP | Resektionsausmaß<br>2. OP |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------|------------|-------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| FC miRNA21 1. OP       | Pearson-Korrelation | 1                   | ,356                | ,661**         | ,411       | ,109              | ,108              | ,239                      | ,279                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     |                     | ,134                | ,002           | ,081       | ,658              | ,661              | ,325                      | ,248                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| FC miRNA21 2. OP       | Pearson-Korrelation | ,356                | 1                   | -,156          | ,068       | ,110              | -,247             | ,093                      | ,248                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,134                |                     | ,522           | ,783       | ,654              | ,308              | ,704                      | ,306                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| VES miRNA21            | Pearson-Korrelation | ,661**              | -,156               | 1              | ,357       | ,101              | -,034             | ,233                      | ,094                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,002                | ,522                |                | ,133       | ,680              | ,891              | ,338                      | ,703                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Geschlecht             | Pearson-Korrelation | ,411                | ,068                | ,357           | 1          | -,221             | ,034              | ,430                      | ,262                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,081                | ,783                | ,133           |            | ,363              | ,891              | ,066                      | ,279                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Karnofsky OP 1         | Pearson-Korrelation | ,109                | ,110                | ,101           | -,221      | 1                 | -,133             | -,105                     | -,467*                    |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,658                | ,654                | ,680           | ,363       |                   | ,587              | ,669                      | ,044                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Karnofsky OP 2         | Pearson-Korrelation | ,108                | -,247               | -,034          | ,034       | -,133             | 1                 | -,127                     | -,159                     |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,661                | ,308                | ,891           | ,891       | ,587              |                   | ,604                      | ,515                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Resektionsausmaß 1. OP | Pearson-Korrelation | ,239                | ,093                | ,233           | ,430       | -,105             | -,127             | 1                         | ,402                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,325                | ,704                | ,338           | ,066       | ,669              | ,604              |                           | ,088                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Resektionsausmaß 2. OP | Pearson-Korrelation | ,279                | ,248                | ,094           | ,262       | -,467*            | -,159             | ,402                      | 1                         |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,248                | ,306                | ,703           | ,279       | ,044              | ,515              | ,088                      |                           |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |

\*\* . Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

\* . Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

**Tabelle 36: Korrelationen miRNA-24 - klinische Parameter**

**Korrelationen**

|                  |                     | FC miRNA24<br>1. OP | FC miRNA24<br>2. OP | VES<br>miRNA24 | Alter bei ED | PFS nach 1. OP | OS     |
|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------|--------------|----------------|--------|
| FC miRNA24 1. OP | Pearson-Korrelation | 1                   | ,073                | ,379           | ,151         | ,084           | ,070   |
|                  | Sig. (2-seitig)     |                     | ,768                | ,110           | ,537         | ,733           | ,774   |
|                  | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19           | 19             | 19     |
| FC miRNA24 2. OP | Pearson-Korrelation | ,073                | 1                   | -,534*         | ,052         | ,370           | ,069   |
|                  | Sig. (2-seitig)     | ,768                |                     | ,018           | ,832         | ,119           | ,779   |
|                  | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19           | 19             | 19     |
| VES miRNA24      | Pearson-Korrelation | ,379                | -,534*              | 1              | ,370         | -,151          | ,014   |
|                  | Sig. (2-seitig)     | ,110                | ,018                |                | ,119         | ,537           | ,955   |
|                  | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19           | 19             | 19     |
| Alter bei ED     | Pearson-Korrelation | ,151                | ,052                | ,370           | 1            | -,068          | -,147  |
|                  | Sig. (2-seitig)     | ,537                | ,832                | ,119           |              | ,781           | ,548   |
|                  | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19           | 19             | 19     |
| PFS nach 1. OP   | Pearson-Korrelation | ,084                | ,370                | -,151          | -,068        | 1              | ,817** |
|                  | Sig. (2-seitig)     | ,733                | ,119                | ,537           | ,781         |                | ,000   |
|                  | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19           | 19             | 19     |
| OS               | Pearson-Korrelation | ,070                | ,069                | ,014           | -,147        | ,817**         | 1      |
|                  | Sig. (2-seitig)     | ,774                | ,779                | ,955           | ,548         | ,000           |        |
|                  | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19           | 19             | 19     |

\*. Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

\*\*. Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

**Korrelationen**

|                        |                     | FC miRNA24<br>1. OP | FC miRNA24<br>2. OP | VES<br>miRNA24 | Geschlecht | Karnofsky OP<br>1 | Karnofsky OP<br>2 | Resektionsausmaß<br>1. OP | Resektionsausmaß<br>2. OP |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------|------------|-------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| FC miRNA24 1. OP       | Pearson-Korrelation | 1                   | ,073                | ,379           | ,223       | ,084              | ,217              | ,097                      | -,164                     |
|                        | Sig. (2-seitig)     |                     | ,768                | ,110           | ,359       | ,733              | ,373              | ,693                      | ,501                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| FC miRNA24 2. OP       | Pearson-Korrelation | ,073                | 1                   | -,534*         | -,175      | ,187              | -,381             | -,053                     | -,299                     |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,768                |                     | ,018           | ,473       | ,442              | ,107              | ,831                      | ,214                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| VES miRNA24            | Pearson-Korrelation | ,379                | -,534*              | 1              | ,321       | -,221             | ,400              | ,209                      | ,262                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,110                | ,018                |                | ,180       | ,363              | ,090              | ,390                      | ,278                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Geschlecht             | Pearson-Korrelation | ,223                | -,175               | ,321           | 1          | -,221             | ,034              | ,430                      | ,262                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,359                | ,473                | ,180           |            | ,363              | ,891              | ,066                      | ,279                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Karnofsky OP 1         | Pearson-Korrelation | ,084                | ,187                | -,221          | -,221      | 1                 | -,133             | -,105                     | -,467*                    |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,733                | ,442                | ,363           | ,363       |                   | ,587              | ,669                      | ,044                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Karnofsky OP 2         | Pearson-Korrelation | ,217                | -,381               | ,400           | ,034       | -,133             | 1                 | -,127                     | -,159                     |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,373                | ,107                | ,090           | ,891       | ,587              |                   | ,604                      | ,515                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Resektionsausmaß 1. OP | Pearson-Korrelation | ,097                | -,053               | ,209           | ,430       | -,105             | -,127             | 1                         | ,402                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,693                | ,831                | ,390           | ,066       | ,669              | ,604              |                           | ,088                      |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Resektionsausmaß 2. OP | Pearson-Korrelation | -,164               | -,299               | ,262           | ,262       | -,467*            | -,159             | ,402                      | 1                         |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,501                | ,214                | ,278           | ,279       | ,044              | ,515              | ,088                      |                           |
|                        | N                   | 19                  | 19                  | 19             | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |

\*. Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

**Tabelle 37: Korrelationen miRNA-26a - klinische Parameter**

**Korrelationen**

|                   |                     | FC miRNA26a<br>1. OP | FC miRNA26a<br>2. OP | VES<br>miRNA26a | Alter bei ED | PFS nach 1. OP | OS     |
|-------------------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------|--------------|----------------|--------|
| FC miRNA26a 1. OP | Pearson-Korrelation | 1                    | ,151                 | ,461*           | ,297         | -,096          | -,253  |
|                   | Sig. (2-seitig)     |                      | ,537                 | ,047            | ,218         | ,697           | ,295   |
|                   | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19           | 19             | 19     |
| FC miRNA26a 2. OP | Pearson-Korrelation | ,151                 | 1                    | -,567*          | -,026        | ,183           | -,038  |
|                   | Sig. (2-seitig)     | ,537                 |                      | ,011            | ,917         | ,453           | ,879   |
|                   | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19           | 19             | 19     |
| VES miRNA26a      | Pearson-Korrelation | ,461*                | -,567*               | 1               | ,100         | -,325          | -,253  |
|                   | Sig. (2-seitig)     | ,047                 | ,011                 |                 | ,685         | ,175           | ,295   |
|                   | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19           | 19             | 19     |
| Alter bei ED      | Pearson-Korrelation | ,297                 | -,026                | ,100            | 1            | -,068          | -,147  |
|                   | Sig. (2-seitig)     | ,218                 | ,917                 | ,685            |              | ,781           | ,548   |
|                   | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19           | 19             | 19     |
| PFS nach 1. OP    | Pearson-Korrelation | -,096                | ,183                 | -,325           | -,068        | 1              | ,817** |
|                   | Sig. (2-seitig)     | ,697                 | ,453                 | ,175            | ,781         |                | ,000   |
|                   | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19           | 19             | 19     |
| OS                | Pearson-Korrelation | -,253                | -,038                | -,253           | -,147        | ,817**         | 1      |
|                   | Sig. (2-seitig)     | ,295                 | ,879                 | ,295            | ,548         | ,000           |        |
|                   | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19           | 19             | 19     |

\*. Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

\*\*.. Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

**Korrelationen**

|                        |                     | FC miRNA26a<br>1. OP | FC miRNA26a<br>2. OP | VES<br>miRNA26a | Geschlecht | Karnofsky OP<br>1 | Karnofsky OP<br>2 | Resektionsausmaß<br>1. OP | Resektionsausmaß<br>2. OP |
|------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------|------------|-------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| FC miRNA26a 1. OP      | Pearson-Korrelation | 1                    | ,151                 | ,461*           | ,258       | -,157             | -,009             | ,126                      | -,044                     |
|                        | Sig. (2-seitig)     |                      | ,537                 | ,047            | ,286       | ,522              | ,971              | ,608                      | ,859                      |
|                        | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| FC miRNA26a 2. OP      | Pearson-Korrelation | ,151                 | 1                    | -,567*          | -,501*     | ,218              | -,118             | -,333                     | -,250                     |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,537                 |                      | ,011            | ,029       | ,370              | ,631              | ,164                      | ,301                      |
|                        | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| VES miRNA26a           | Pearson-Korrelation | ,461*                | -,567*               | 1               | ,368       | -,159             | ,219              | ,382                      | ,325                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,047                 | ,011                 |                 | ,121       | ,516              | ,368              | ,106                      | ,174                      |
|                        | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Geschlecht             | Pearson-Korrelation | ,258                 | -,501*               | ,368            | 1          | -,221             | ,034              | ,430                      | ,262                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,286                 | ,029                 | ,121            |            | ,363              | ,891              | ,066                      | ,279                      |
|                        | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Karnofsky OP 1         | Pearson-Korrelation | -,157                | ,218                 | -,159           | -,221      | 1                 | -,133             | -,105                     | -,467*                    |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,522                 | ,370                 | ,516            | ,363       |                   | ,587              | ,669                      | ,044                      |
|                        | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Karnofsky OP 2         | Pearson-Korrelation | -,009                | -,118                | ,219            | ,034       | -,133             | 1                 | -,127                     | -,159                     |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,971                 | ,631                 | ,368            | ,891       | ,587              |                   | ,604                      | ,515                      |
|                        | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Resektionsausmaß 1. OP | Pearson-Korrelation | ,126                 | -,333                | ,382            | ,430       | -,105             | -,127             | 1                         | ,402                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,608                 | ,164                 | ,106            | ,066       | ,669              | ,604              |                           | ,088                      |
|                        | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Resektionsausmaß 2. OP | Pearson-Korrelation | -,044                | -,250                | ,325            | ,262       | -,467*            | -,159             | ,402                      | 1                         |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,859                 | ,301                 | ,174            | ,279       | ,044              | ,515              | ,088                      |                           |
|                        | N                   | 19                   | 19                   | 19              | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |

\*. Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).



**Tabelle 38: Lineare Regression miRNA-181d Primärtumor und Rezidiv - OS und PFS**

**Koeffizienten<sup>a</sup>**

| Modell |                          | Nicht standardisierte Koeffizienten |                | Standardisierte Koeffizienten | t      | Sig. |
|--------|--------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|--------|------|
|        |                          | B                                   | Standardfehler | Beta                          |        |      |
| 1      | (Konstante)              | 14,068                              | 6,389          |                               | 2,202  | ,044 |
|        | FC miRNA181d Primärtumor | -1,059                              | ,947           | -,447                         | -1,117 | ,281 |
|        | FC miRNA181d Rezidiv     | 1,740                               | 2,342          | ,271                          | ,743   | ,469 |
|        | VES miRNA181d            | 4,778                               | 5,995          | ,253                          | ,797   | ,438 |

a. Abhängige Variable: OS

**Koeffizienten<sup>a</sup>**

| Modell |                          | Nicht standardisierte Koeffizienten |                | Standardisierte Koeffizienten | t      | Sig. |
|--------|--------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|--------|------|
|        |                          | B                                   | Standardfehler | Beta                          |        |      |
| 1      | (Konstante)              | 5,844                               | 4,096          |                               | 1,427  | ,174 |
|        | FC miRNA181d Primärtumor | -,654                               | ,607           | -,424                         | -1,077 | ,299 |
|        | FC miRNA181d Rezidiv     | 2,003                               | 1,501          | ,480                          | 1,334  | ,202 |
|        | VES miRNA181d            | 2,699                               | 3,844          | ,219                          | ,702   | ,493 |

a. Abhängige Variable: PFS nach 1. OP (Primärtumor)

**Tabelle 39: Lineare Regression miRNA-21 Primärtumor und Rezidiv - OS und PFS**

**Koeffizienten<sup>a</sup>**

| Modell |                        | Nicht standardisierte Koeffizienten |                | Standardisierte Koeffizienten | t     | Sig. |
|--------|------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|-------|------|
|        |                        | B                                   | Standardfehler | Beta                          |       |      |
| 1      | (Konstante)            | 20,772                              | 3,515          |                               | 5,910 | ,000 |
|        | FC miRNA21 Primärtumor | 4,274                               | 11,776         | ,151                          | ,363  | ,722 |
|        | FC miRNA21 Rezidiv     | -8,360                              | 10,177         | -,259                         | -,822 | ,424 |
|        | VES miRNA21            | -6,708                              | 6,773          | -,389                         | -,991 | ,338 |

a. Abhängige Variable: OS

**Koeffizienten<sup>a</sup>**

| Modell |                        | Nicht standardisierte Koeffizienten |                | Standardisierte Koeffizienten | t     | Sig. |
|--------|------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|-------|------|
|        |                        | B                                   | Standardfehler | Beta                          |       |      |
| 1      | (Konstante)            | 9,969                               | 2,365          |                               | 4,214 | ,001 |
|        | FC miRNA21 Primärtumor | -3,017                              | 7,925          | -,163                         | -,381 | ,709 |
|        | FC miRNA21 Rezidiv     | 2,922                               | 6,848          | ,139                          | ,427  | ,676 |
|        | VES miRNA21            | -,518                               | 4,558          | -,046                         | -,114 | ,911 |

a. Abhängige Variable: PFS nach 1. OP (Primärtumor)

**Tabelle 40: Lineare Regression miRNA-24 Primärtumor und Rezidiv - OS und PFS**

**Koeffizienten<sup>a</sup>**

| Modell                 | Nicht standardisierte Koeffizienten |                | Standardisierte Koeffizienten | t     | Sig. |
|------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|-------|------|
|                        | B                                   | Standardfehler | Beta                          |       |      |
| 1 (Konstante)          | 14,786                              | 7,602          |                               | 1,945 | ,071 |
| FC miRNA24 Primärtumor | ,699                                | 4,350          | ,048                          | ,161  | ,875 |
| FC miRNA24 Rezidiv     | 2,670                               | 9,767          | ,089                          | ,273  | ,788 |
| VES miRNA24            | ,749                                | 6,031          | ,043                          | ,124  | ,903 |

a. Abhängige Variable: OS

**Koeffizienten<sup>a</sup>**

| Modell                 | Nicht standardisierte Koeffizienten |                | Standardisierte Koeffizienten | t     | Sig. |
|------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|-------|------|
|                        | B                                   | Standardfehler | Beta                          |       |      |
| 1 (Konstante)          | 5,094                               | 4,612          |                               | 1,104 | ,287 |
| FC miRNA24 Primärtumor | ,378                                | 2,639          | ,040                          | ,143  | ,888 |
| FC miRNA24 Rezidiv     | 7,633                               | 5,926          | ,389                          | 1,288 | ,217 |
| VES miRNA24            | ,473                                | 3,660          | ,042                          | ,129  | ,899 |

a. Abhängige Variable: PFS nach 1. OP (Primärtumor)

**Tabelle 41: Lineare Regression miRNA-26a Primärtumor und Rezidiv - OS und PFS**

**Koeffizienten<sup>a</sup>**

| Modell                  | Nicht standardisierte Koeffizienten |                | Standardisierte Koeffizienten | t     | Sig. |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|-------|------|
|                         | B                                   | Standardfehler | Beta                          |       |      |
| 1 (Konstante)           | 24,095                              | 6,051          |                               | 3,982 | ,001 |
| FC miRNA26a Primärtumor | -1,579                              | 10,814         | -,049                         | -,146 | ,886 |
| FC miRNA26a Rezidiv     | -8,819                              | 13,269         | -,238                         | -,665 | ,516 |
| VES miRNA26a            | -6,097                              | 6,643          | -,366                         | -,918 | ,373 |

a. Abhängige Variable: OS

**Koeffizienten<sup>a</sup>**

| Modell                  | Nicht standardisierte Koeffizienten |                | Standardisierte Koeffizienten | t      | Sig. |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|--------|------|
|                         | B                                   | Standardfehler | Beta                          |        |      |
| 1 (Konstante)           | 11,773                              | 3,948          |                               | 2,982  | ,009 |
| FC miRNA26a Primärtumor | 2,169                               | 7,056          | ,102                          | ,307   | ,763 |
| FC miRNA26a Rezidiv     | -1,548                              | 8,657          | -,064                         | -,179  | ,860 |
| VES miRNA26a            | -4,429                              | 4,334          | -,408                         | -1,022 | ,323 |

a. Abhängige Variable: PFS nach 1. OP (Primärtumor)

## 12.3 Ergebnisse aus 5.3.

Tabelle 42: Korrelationen MGMT-Status

|                            |                     | Status MGMT<br>Primärtumor | Status MGMT<br>Rezidiv | Status MGMT<br>VMS |
|----------------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|--------------------|
| Status MGMT<br>Primärtumor | Pearson-Korrelation | 1                          | ,430                   | -,284              |
|                            | Sig. (2-seitig)     |                            | ,066                   | ,238               |
|                            | N                   | 19                         | 19                     | 19                 |
| Status MGMT Rezidiv        | Pearson-Korrelation | ,430                       | 1                      | ,350               |
|                            | Sig. (2-seitig)     | ,066                       |                        | ,142               |
|                            | N                   | 19                         | 19                     | 19                 |
| Status MGMT VMS            | Pearson-Korrelation | -,284                      | ,350                   | 1                  |
|                            | Sig. (2-seitig)     | ,238                       | ,142                   |                    |
|                            | N                   | 19                         | 19                     | 19                 |

Tabelle 43: Lineare Regression MGMT-Status

|        |                            | Nicht standardisierte<br>Koeffizienten |                | Standardisierte<br>Koeffizienten | t     | Sig. |
|--------|----------------------------|--|----------------|----------------------------------|-------|------|
| Modell |                            | B                                      | Standardfehler | Beta                             |       |      |
| 1      | (Konstante)                | ,189                                   | ,146           |                                  | 1,293 | ,214 |
|        | Status MGMT<br>Primärtumor | ,590                                   | ,202           | ,576                             | 2,922 | ,010 |
|        | Status MGMT VMS            | ,546                                   | ,209           | ,514                             | 2,605 | ,019 |

a. Abhängige Variable: Status MGMT Rezidiv

**Tabelle 44: Korrelationen p15-Status**

**Korrelationen**

|                        |                     | Status p15<br>Primärtumor | Status p15<br>Rezidiv | Status p15<br>VMS |
|------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|
| Status p15 Primärtumor | Pearson-Korrelation | 1                         | -,205                 | ,449              |
|                        | Sig. (2-seitig)     |                           | ,400                  | ,054              |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                |
| Status p15 Rezidiv     | Pearson-Korrelation | -,205                     | 1                     | ,782**            |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,400                      |                       | ,000              |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                |
| Status p15 VMS         | Pearson-Korrelation | ,449                      | ,782**                | 1                 |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,054                      | ,000                  |                   |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                |

\*\* . Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

**Tabelle 45: Korrelationen p16-Status**

**Korrelationen**

|                        |                     | Status p16<br>Primärtumor | Status p16<br>Rezidiv | Status p16<br>VMS |
|------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|
| Status p16 Primärtumor | Pearson-Korrelation | 1                         | -,259                 | ,508*             |
|                        | Sig. (2-seitig)     |                           | ,285                  | ,026              |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                |
| Status p16 Rezidiv     | Pearson-Korrelation | -,259                     | 1                     | ,701**            |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,285                      |                       | ,001              |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                |
| Status p16 VMS         | Pearson-Korrelation | ,508*                     | ,701**                | 1                 |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,026                      | ,001                  |                   |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                |

\*. Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

\*\* . Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

**Tabelle 46: Korrelationen MGMT-Status - klinische Parameter**

**Korrelationen**

|                         |                     | Status MGMT Primärtumor | Status MGMT Rezidiv | Status MGMT VMS | Alter bei ED | OS     | PFS nach 1. OP |
|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-----------------|--------------|--------|----------------|
| Status MGMT Primärtumor | Pearson-Korrelation | 1                       | ,430                | -,284           | -,487*       | ,223   | ,451           |
|                         | Sig. (2-seitig)     |                         | ,066                | ,238            | ,035         | ,359   | ,052           |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19           | 19     | 19             |
| Status MGMT Rezidiv     | Pearson-Korrelation | ,430                    | 1                   | ,350            | -,279        | ,491*  | ,522*          |
|                         | Sig. (2-seitig)     | ,066                    |                     | ,142            | ,247         | ,033   | ,022           |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19           | 19     | 19             |
| Status MGMT VMS         | Pearson-Korrelation | -,284                   | ,350                | 1               | ,268         | ,127   | ,063           |
|                         | Sig. (2-seitig)     | ,238                    | ,142                |                 | ,267         | ,605   | ,797           |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19           | 19     | 19             |
| Alter bei ED            | Pearson-Korrelation | -,487*                  | -,279               | ,268            | 1            | -,147  | -,068          |
|                         | Sig. (2-seitig)     | ,035                    | ,247                | ,267            |              | ,548   | ,781           |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19           | 19     | 19             |
| OS                      | Pearson-Korrelation | ,223                    | ,491*               | ,127            | -,147        | 1      | ,817**         |
|                         | Sig. (2-seitig)     | ,359                    | ,033                | ,605            | ,548         |        | ,000           |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19           | 19     | 19             |
| PFS nach 1. OP          | Pearson-Korrelation | ,451                    | ,522*               | ,063            | -,068        | ,817** | 1              |
|                         | Sig. (2-seitig)     | ,052                    | ,022                | ,797            | ,781         | ,000   |                |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19           | 19     | 19             |

\*. Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

\*\*.. Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

**Korrelationen**

|                         |                     | Status MGMT Primärtumor | Status MGMT Rezidiv | Status MGMT VMS | Geschlecht | Karnofsky OP 1 | Karnofsky OP 2 | Resektionsausmaß 1. OP | Resektionsausmaß 2. OP |
|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-----------------|------------|----------------|----------------|------------------------|------------------------|
| Status MGMT Primärtumor | Pearson-Korrelation | 1                       | ,430                | -,284           | -,095      | ,221           | -,125          | ,012                   | -,262                  |
|                         | Sig. (2-seitig)     |                         | ,066                | ,238            | ,698       | ,363           | ,609           | ,962                   | ,278                   |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Status MGMT Rezidiv     | Pearson-Korrelation | ,430                    | 1                   | ,350            | -,209      | -,247          | ,127           | ,080                   | -,055                  |
|                         | Sig. (2-seitig)     | ,066                    |                     | ,142            | ,390       | ,308           | ,604           | ,746                   | ,823                   |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Status MGMT VMS         | Pearson-Korrelation | -,284                   | ,350                | 1               | ,049       | -,426          | ,255           | -,121                  | ,136                   |
|                         | Sig. (2-seitig)     | ,238                    | ,142                |                 | ,841       | ,069           | ,292           | ,623                   | ,579                   |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Geschlecht              | Pearson-Korrelation | -,095                   | -,209               | ,049            | 1          | -,221          | ,034           | ,430                   | ,262                   |
|                         | Sig. (2-seitig)     | ,698                    | ,390                | ,841            |            | ,363           | ,891           | ,066                   | ,279                   |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Karnofsky OP 1          | Pearson-Korrelation | ,221                    | -,247               | -,426           | -,221      | 1              | -,133          | -,105                  | -,467                  |
|                         | Sig. (2-seitig)     | ,363                    | ,308                | ,069            | ,363       |                | ,587           | ,669                   | ,044                   |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Karnofsky OP 2          | Pearson-Korrelation | -,125                   | ,127                | ,255            | ,034       | -,133          | 1              | -,127                  | -,159                  |
|                         | Sig. (2-seitig)     | ,609                    | ,604                | ,292            | ,891       | ,587           |                | ,604                   | ,515                   |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Resektionsausmaß 1. OP  | Pearson-Korrelation | ,012                    | ,080                | -,121           | ,430       | -,105          | -,127          | 1                      | ,402                   |
|                         | Sig. (2-seitig)     | ,962                    | ,746                | ,623            | ,066       | ,669           | ,604           |                        | ,088                   |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Resektionsausmaß 2. OP  | Pearson-Korrelation | -,262                   | -,055               | ,136            | ,262       | -,467          | -,159          | ,402                   | 1                      |
|                         | Sig. (2-seitig)     | ,278                    | ,823                | ,579            | ,279       | ,044           | ,515           | ,088                   |                        |
|                         | N                   | 19                      | 19                  | 19              | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |

\*. Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

**Tabelle 47: Korrelationen MGMT-Methylierungsstatus Dynamik - OS/PFS**

|                                 |                     | Korrelationen                   |        |        |        |       |        |
|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|--------|--------|--------|-------|--------|
|                                 |                     | PFS nach 1. OP<br>(Primärtumor) | OS     | MM     | UU     | MU    | UM     |
| PFS nach 1. OP<br>(Primärtumor) | Pearson-Korrelation | 1                               | ,817** | ,480*  | -,523* | -,024 | ,079   |
|                                 | Sig. (2-seitig)     |                                 | ,000   | ,038   | ,022   | ,923  | ,749   |
|                                 | N                   | 19                              | 19     | 19     | 19     | 19    | 19     |
| OS                              | Pearson-Korrelation | ,817**                          | 1      | ,313   | -,424  | -,170 | ,220   |
|                                 | Sig. (2-seitig)     | ,000                            |        | ,192   | ,071   | ,487  | ,365   |
|                                 | N                   | 19                              | 19     | 19     | 19     | 19    | 19     |
| MM                              | Pearson-Korrelation | ,480*                           | ,313   | 1      | -,519* | -,160 | -,406  |
|                                 | Sig. (2-seitig)     | ,038                            | ,192   |        | ,023   | ,513  | ,085   |
|                                 | N                   | 19                              | 19     | 19     | 19     | 19    | 19     |
| UU                              | Pearson-Korrelation | -,523*                          | -,424  | -,519* | 1      | -,180 | -,456* |
|                                 | Sig. (2-seitig)     | ,022                            | ,071   | ,023   |        | ,461  | ,049   |
|                                 | N                   | 19                              | 19     | 19     | 19     | 19    | 19     |
| MU                              | Pearson-Korrelation | -,024                           | -,170  | -,160  | -,180  | 1     | -,141  |
|                                 | Sig. (2-seitig)     | ,923                            | ,487   | ,513   | ,461   |       | ,565   |
|                                 | N                   | 19                              | 19     | 19     | 19     | 19    | 19     |
| UM                              | Pearson-Korrelation | ,079                            | ,220   | -,406  | -,456* | -,141 | 1      |
|                                 | Sig. (2-seitig)     | ,749                            | ,365   | ,085   | ,049   | ,565  |        |
|                                 | N                   | 19                              | 19     | 19     | 19     | 19    | 19     |

\*\* . Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

\* . Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

U – U: Primärtumor unmethyliert, Rezidiv unmethyliert

M – U: Primärtumor methyliert, Rezidiv unmethyliert

U – M: Primärtumor unmethyliert, Rezidiv methyliert

M – M: Primärtumor methyliert, Rezidiv methyliert

**Tabelle 48: Korrelationen p15-Status - klinische Parameter**

**Korrelationen**

|                        |                     | Status p15 Primärtumor | Status p15 Rezidiv | Status p15 VMS | Alter bei ED | OS     | PFS nach 1. OP |
|------------------------|---------------------|------------------------|--------------------|----------------|--------------|--------|----------------|
| Status p15 Primärtumor | Pearson-Korrelation | 1                      | -,205              | ,449           | ,031         | ,077   | ,359           |
|                        | Sig. (2-seitig)     |                        | ,400               | ,054           | ,901         | ,753   | ,131           |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19           | 19     | 19             |
| Status p15 Rezidiv     | Pearson-Korrelation | -,205                  | 1                  | ,782**         | ,151         | -,088  | -,250          |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,400                   |                    | ,000           | ,537         | ,720   | ,301           |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19           | 19     | 19             |
| Status p15 VMS         | Pearson-Korrelation | ,449                   | ,782**             | 1              | ,157         | -,031  | ,000           |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,054                   | ,000               |                | ,520         | ,899   | 1,000          |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19           | 19     | 19             |
| Alter bei ED           | Pearson-Korrelation | ,031                   | ,151               | ,157           | 1            | -,147  | -,068          |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,901                   | ,537               | ,520           |              | ,548   | ,781           |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19           | 19     | 19             |
| OS                     | Pearson-Korrelation | ,077                   | -,088              | -,031          | -,147        | 1      | ,817**         |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,753                   | ,720               | ,899           | ,548         |        | ,000           |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19           | 19     | 19             |
| PFS nach 1. OP         | Pearson-Korrelation | ,359                   | -,250              | ,000           | -,068        | ,817** | 1              |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,131                   | ,301               | 1,000          | ,781         | ,000   |                |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19           | 19     | 19             |

\*\* . Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

**Korrelationen**

|                        |                     | Status p15 Primärtumor | Status p15 Rezidiv | Status p15 VMS | Geschlecht | Karnofsky OP 1 | Karnofsky OP 2 | Resektionsausmaß 1. OP | Resektionsausmaß 2. OP |
|------------------------|---------------------|------------------------|--------------------|----------------|------------|----------------|----------------|------------------------|------------------------|
| Status p15 Primärtumor | Pearson-Korrelation | 1                      | -,205              | ,449           | -,449      | ,099           | -,303          | ,055                   | -,118                  |
|                        | Sig. (2-seitig)     |                        | ,400               | ,054           | ,054       | ,686           | ,207           | ,824                   | ,631                   |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Status p15 Rezidiv     | Pearson-Korrelation | -,205                  | 1                  | ,782**         | -,209      | -,616**        | ,375           | -,025                  | ,185                   |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,400                   |                    | ,000           | ,391       | ,005           | ,114           | ,918                   | ,449                   |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Status p15 VMS         | Pearson-Korrelation | ,449                   | ,782**             | 1              | -,095      | -,499*         | ,149           | ,012                   | ,094                   |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,054                   | ,000               |                | ,698       | ,030           | ,541           | ,962                   | ,703                   |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Geschlecht             | Pearson-Korrelation | -,449                  | -,209              | -,095          | 1          | -,221          | ,034           | ,430                   | ,262                   |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,054                   | ,391               | ,698           |            | ,363           | ,891           | ,066                   | ,279                   |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Karnofsky OP 1         | Pearson-Korrelation | ,099                   | -,616**            | -,499*         | -,221      | 1              | -,133          | -,105                  | -,467*                 |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,686                   | ,005               | ,030           | ,363       |                | ,587           | ,669                   | ,044                   |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Karnofsky OP 2         | Pearson-Korrelation | -,303                  | ,375               | ,149           | ,034       | -,133          | 1              | -,127                  | -,159                  |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,207                   | ,114               | ,541           | ,891       | ,587           |                | ,604                   | ,515                   |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Resektionsausmaß 1. OP | Pearson-Korrelation | ,055                   | -,025              | ,012           | ,430       | -,105          | -,127          | 1                      | ,402                   |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,824                   | ,918               | ,962           | ,066       | ,669           | ,604           |                        | ,088                   |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |
| Resektionsausmaß 2. OP | Pearson-Korrelation | -,118                  | ,185               | ,094           | ,262       | -,467*         | -,159          | ,402                   | 1                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,631                   | ,449               | ,703           | ,279       | ,044           | ,515           | ,088                   |                        |
|                        | N                   | 19                     | 19                 | 19             | 19         | 19             | 19             | 19                     | 19                     |

\*\* . Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

\* . Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

**Tabelle 49: Korrelationen p16-Status - klinische Parameter**

**Korrelationen**

|                        |                     | Status p16<br>Primärtumor | Status p16<br>Rezidiv | Status p16<br>VMS | Alter bei ED | OS     | PFS nach 1. OP |
|------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|--------------|--------|----------------|
| Status p16 Primärtumor | Pearson-Korrelation | 1                         | -,259                 | ,508*             | -,012        | -,059  | -,039          |
|                        | Sig. (2-seitig)     |                           | ,285                  | ,026              | ,961         | ,809   | ,873           |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19           | 19     | 19             |
| Status p16 Rezidiv     | Pearson-Korrelation | -,259                     | 1                     | ,701**            | -,219        | ,263   | ,318           |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,285                      |                       | ,001              | ,368         | ,276   | ,185           |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19           | 19     | 19             |
| Status p16 VMS         | Pearson-Korrelation | ,508*                     | ,701**                | 1                 | -,204        | ,191   | ,254           |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,026                      | ,001                  |                   | ,402         | ,433   | ,293           |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19           | 19     | 19             |
| Alter bei ED           | Pearson-Korrelation | -,012                     | -,219                 | -,204             | 1            | -,147  | -,068          |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,961                      | ,368                  | ,402              |              | ,548   | ,781           |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19           | 19     | 19             |
| OS                     | Pearson-Korrelation | -,059                     | ,263                  | ,191              | -,147        | 1      | ,817**         |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,809                      | ,276                  | ,433              | ,548         |        | ,000           |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19           | 19     | 19             |
| PFS nach 1. OP         | Pearson-Korrelation | -,039                     | ,318                  | ,254              | -,068        | ,817** | 1              |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,873                      | ,185                  | ,293              | ,781         | ,000   |                |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19           | 19     | 19             |

\*. Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

\*\*.. Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

**Korrelationen**

|                        |                     | Status p16<br>Primärtumor | Status p16<br>Rezidiv | Status p16<br>VMS | Geschlecht | Karnofsky OP<br>1 | Karnofsky OP<br>2 | Resektionsausmaß<br>1. OP | Resektionsausmaß<br>2. OP |
|------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|------------|-------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| Status p16 Primärtumor | Pearson-Korrelation | 1                         | -,259                 | ,508*             | -,268      | ,284              | -,383             | -,077                     | -,149                     |
|                        | Sig. (2-seitig)     |                           | ,285                  | ,026              | ,268       | ,238              | ,106              | ,754                      | ,544                      |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Status p16 Rezidiv     | Pearson-Korrelation | -,259                     | 1                     | ,701**            | ,456*      | ,173              | ,174              | ,217                      | ,184                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,285                      |                       | ,001              | ,049       | ,479              | ,475              | ,373                      | ,450                      |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Status p16 VMS         | Pearson-Korrelation | ,508*                     | ,701**                | 1                 | ,209       | ,364              | -,127             | ,136                      | ,055                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,026                      | ,001                  |                   | ,390       | ,125              | ,604              | ,578                      | ,824                      |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Geschlecht             | Pearson-Korrelation | -,268                     | ,456*                 | ,209              | 1          | -,221             | ,034              | ,430                      | ,262                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,268                      | ,049                  | ,390              |            | ,363              | ,891              | ,066                      | ,279                      |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Karnofsky OP 1         | Pearson-Korrelation | ,284                      | ,173                  | ,364              | -,221      | 1                 | -,133             | -,105                     | -,467*                    |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,238                      | ,479                  | ,125              | ,363       |                   | ,587              | ,669                      | ,044                      |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Karnofsky OP 2         | Pearson-Korrelation | -,383                     | ,174                  | -,127             | ,034       | -,133             | 1                 | -,127                     | -,159                     |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,106                      | ,475                  | ,604              | ,891       | ,587              |                   | ,604                      | ,515                      |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Resektionsausmaß 1. OP | Pearson-Korrelation | -,077                     | ,217                  | ,136              | ,430       | -,105             | -,127             | 1                         | ,402                      |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,754                      | ,373                  | ,578              | ,066       | ,669              | ,604              |                           | ,088                      |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |
| Resektionsausmaß 2. OP | Pearson-Korrelation | -,149                     | ,184                  | ,055              | ,262       | -,467*            | -,159             | ,402                      | 1                         |
|                        | Sig. (2-seitig)     | ,544                      | ,450                  | ,824              | ,279       | ,044              | ,515              | ,088                      |                           |
|                        | N                   | 19                        | 19                    | 19                | 19         | 19                | 19                | 19                        | 19                        |

\*. Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

\*\*.. Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).



## 13. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Joachim Oertel für die Möglichkeit dieses spannende Thema zu bearbeiten und für die regelmäßigen Anregungen und Feedback-Runden im Journal-Club.

Außerdem gilt mein besonderer Dank meinen Betreuern Frau Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat und, zu Beginn der Arbeit, Dr. med. Christoph Sippl, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mich über die Bearbeitungszeit durch konstruktiv unterstützt haben.

Dem gesamten Team des neurochirurgischen Forschungslabors, insbesondere Frau Sigrid Welsch, danke ich für die Hilfestellungen, Tipps und Anmerkungen während der experimentellen Arbeiten in meiner Zeit im Labor.

Ich danke meinen ehemaligen Kommilitoninnen Frau Alicia Saenz, Frau Louisa Schöneberger sowie Frau Luisa Braun und Frau Lisa Bohr für die gegenseitige Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Zuletzt möchte ich an dieser Stelle auch meiner Familie und meinem Freund Sebastian Schäfers danken, die mich stets motiviert und unterstützt haben.

## **14. Lebenslauf**

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