

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

**Vergleichende Expressionsanalyse der microRNAs 21, 34a, 200a und 409 in
Tumorgewebe und Blutplasma von Meningeompatienten**

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

2022

vorgelegt von: Benjamin Felix Landau
geb. am: 23.08.1994 in Homburg/Saar

Tag der Promotion: 29. März 2023

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Ketter

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1. Zusammenfassung	1
Summary	4
2. Einleitung	6
2.1 Tumore und ihre Entstehung	6
2.2 Thematische Einführung in die Meningeome	7
2.2.1 Epidemiologie	8
2.2.2 Ätiologie	9
2.2.3 Lokalisation und klinische Präsentation	10
2.2.4 Klassifikation	11
2.2.4.1 Klassifikation von Tumoren des Zentralen Nervensystems nach der World Health Organization (WHO)	11
2.2.4.1.1 WHO Grad I: Benigne Meningeome	13
2.2.4.1.2 WHO Grad II: Atypische Meningeome	13
2.2.4.1.3 WHO Grad III: Anaplastische Meningeome	13
2.2.4.2 Genetischer Progressionsscore nach Ketter	14
2.2.5 Therapie	14
2.2.6 Rezidivverhalten	15
2.2.6.1 Progressionsabhängige chromosomale Veränderungen	15
2.2.6.1.1 Chromosom 22	18
2.2.6.1.2 Chromosom 1	19
2.2.6.1.3 Chromosom 14	20
2.2.6.1.4 Chromosom 9	21
2.2.6.1.5 Chromosom 10	21
2.2.6.1.6 Chromosom 17	22
2.2.6.1.7 Chromosom 18	23
2.2.6.2 Weitere genetische/epigenetische Veränderungen	23
2.3 MicroRNAs	24
2.3.1 Einführung in die Thematik der microRNAs	24
2.3.2 Entdeckung der microRNAs	24
2.3.3 Nomenklatur der microRNAs	25
2.3.4 Biogenese und Funktion der microRNAs beim Menschen	27
2.3.5 MicroRNAs bei Tumorerkrankungen	31
2.3.6 MicroRNAs beim Meningeom	32
2.4 Fragestellung	34
3. Material und Methodik	36
3.1 Material- und Herstellernachweis	37
3.1.1 Material- und Herstellernachweis für die Durchführung der RNA-Isolation, der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und der Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	37
3.1.2 Material- und Herstellernachweis für die Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	39

3.2 Methodik	42
3.2.1 Gewinnung von Plasma aus Vollblut	42
3.2.2 RNA-Isolation aus Blutplasma mittels Qiagen miRNeasy® Serum/Plasma Kit durch eigene Weiterentwicklung des Isolationsschemas	42
3.2.3 RNA-Isolation aus solidem Tumorgewebe mittels Qiagen miRNeasy® Mini Kit	44
3.2.4 Analyse der Tumor- und Blutproben mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	45
3.2.4.1 Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
3.2.4.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	46
3.2.4.2.1 Durchführung der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mittels TaqMan® microRNA-spezifischen stem-loop Primern	46
3.2.4.3 Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	49
3.2.4.3.1 Prinzip der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mittels TaqMan® MicroRNA Assays	51
3.2.4.3.2 Durchführung der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mittels TaqMan® MicroRNA Assays	52
3.2.4.4 Datennormalisierung bei der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	54
3.2.4.4.1 Etablierung der RNU6B als endogene Kontrolle im Blutplasma	55
3.2.5 Quantitative Analyse der Ergebnisse der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	56
3.2.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	57
3.2.6.1 Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	57
3.2.6.2 Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	59
3.2.6.2.1 Tumor-Tupfpräparate und Fixierung	59
3.2.6.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	60
3.2.6.2.3 RNase-Verdau	60
3.2.6.2.4 Pepsinbehandlung und Fixierung	61
3.2.6.2.5 Ethanolreihe	61
3.2.6.2.6 Denaturierung und Hybridisierung	61
3.2.6.2.7 Stringenzwaschung und DAPI-Eindeckung	62
3.2.6.3 Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	62
3.2.6.4 Bestimmung des Cut-off Wertes	63
3.2.7 Immunreaktiver Score (IRS Score)	63
4. Ergebnisse	64
4.1 Patientenkollektiv	64
4.2 Kollektiv der gesunden Probanden	74
4.3 Expressionsmuster der microRNAs 21, 34a, 200a und 409	77
4.3.1 Expression der microRNA 21	80
4.3.2 Expression der microRNA 34a	81
4.3.3 Expression der microRNA 200a	81
4.3.4 Expression der microRNA 409	85
4.4 Aberrationen der Chromosomen 1, 9, 10, 14, 18 und 22	88
4.4.1 Erstdiagnosen im Vergleich zu Rezidiven	89
4.4.2 Tumore der Konvexität im Vergleich zur Schädelbasis	90
4.4.3 Unterschiede zwischen den WHO Graden	93
4.4.4 Unterschiede zwischen den unter 60-jährigen und den älter/gleich 60-jährigen Patienten	94
4.4.5 Unterschiede zwischen Gruppen aufsteigender Tumorgrößen	95
4.5 Immunreaktiver Score (IRS) im Vergleich zwischen Frauen und Männern	96

5. Diskussion	97
5.1 Erkenntnisse über das Patientenkollektiv	97
5.2 Korrelation der Expressionsniveaus der microRNAs im Tumor mit den Aberrationsmustern der jeweiligen Chromosomen.....	99
5.3 Korrelation der Expressionsniveaus der microRNAs zwischen Tumor und Blut bei Meningeompatienten	100
5.4 Expressionsunterschiede der microRNAs zwischen dem Blut gesunder Probanden und Meningeompatienten	102
5.5 Expressionsunterschiede der microRNAs zwischen Gruppen aufsteigender Tumorgößen	104
5.6 Korrelation der Expressionsniveaus der microRNAs mit dem Patientenalter	105
5.7 Expressionsunterschiede der microRNAs zwischen den WHO Graden	107
5.8 Expressionsunterschiede der microRNAs zwischen Frauen und Männern	108
5.9 Expressionsunterschiede der microRNAs zwischen den Lokalisationen Konvexität und Schädelbasis	110
5.10 Expressionsunterschiede der microRNAs zwischen erstdiagnostizierten Tumoren und Rezidiven	111
6. Literaturverzeichnis	114
7. Publikationen	120
8. Danksagung	121
9. Lebenslauf	123

Abkürzungsverzeichnis:

AAAA: Poly-A-Schwanz
Ago: Argonautenprotein
ALPL: Alkalische Phosphatase (alkaline phosphatase tissue-nonspecific isozyme)
kodiert durch das ALPL (alkaline phosphatase, liver/bone/kidney) Gen
Aqua dest.: destilliertes Wasser
ARF: alternative reading frame
B-CLL: chronisch lymphatische B-Zell Leukämie
BRCA1: breast cancer type 1 susceptibility protein
bzgl.: bezüglich
bzw.: beziehungsweise
cDNA: komplementäre DNA (complementary DNA)
CDKN2A: cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2B: cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B
CDS: kodierende Region eines Gens (coding DNA sequence)
cel: *Caenorhabditis elegans*
ccm: Kubikzentimeter
cm³: Kubikzentimeter
CTCs: zirkulierende Tumorzellen (circulating tumor cells)
CT-Wert: cycle threshold Wert
DAL-1: Differentially expressed in adenocarcinoma of the lung protein 1
DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGCR8: DiGeorge critical region 8
DMBT 1: deleted in malignant brain tumors 1 protein
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA: Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP: desoxyNukleosidtriphosphat
dsRBP: doppelsträngiges RNA-bindendes Protein
EBRT: externe Strahlentherapie (external beam radiation therapy)
eIF2C2: eukaryotic translation initiation factor 2C 2
EMT: epithelial-mesenchymaler Übergang
et al. : et alii
ER α : Östrogenrezeptor alpha
F (im Kontext der TaqMan® MicroRNA Assays): 6-Carboxy-Fluorescein
FAM: Fluoresceinamidit (fluorescein amidite)
FBS: fötales Kälberserum (fetal bovine serum)
FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET: Förster-Resonanzenergietransfer
g: Erdbeschleunigung
GPS: Genetischer Progressionsscore
G₁/S-Phase Checkpunkt: Checkpunkt zwischen G₁-Phase (gap 1 phase/growth 1 phase) und S-Phase (synthesis phase) im Zellzyklus
HCl: Salzsäure
hsa: homo sapiens
ID: identification
IRS: Immunreaktiver Score
kA: keine Angabe
kbp: Kilobasenpaar
KCl: Kaliumchlorid
KH₂PO₄: Kaliumdihydrogenphosphat
l: Liter
let-7d: lethal-7d
lin: abnormal cell LINEage
LOH: Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity)

Mbp: Megabasenpaar
MEG 3: maternally expressed gene 3
MEM NEAA: minimum essential medium non essential amino acid solution
MEN: multiple endokrine Neoplasie
m⁷G: 7-Methylguanosin
MGB: Minor-Groove-Binder
ml: Milliliter
MMP: Matrix-Metalloproteinasen
mir: Vorläufersequenz der reifen microRNA
miR: reife microRNA
microRNA*: complementary strand of microRNA
miRNP: microRNAs and siRNAs assemble in multiprotein complexes
mRNA: messenger RNA
MXI 1: MAX (myc-associated factor X)-interacting protein 1
NaCl: Natriumchlorid
Na₂HPO₄: Dinatriumphosphat
NaOH: Natriumhydroxid
ncRNA: nichtcodierende Ribonukleinsäure (non-coding RNA)
NDRG2: NDRG family member 2, entspricht N-MYC downstream-regulated gene 2
NF 2: Neurofibromatose Typ 2
ng: Nanogramm
nm: Nanometer
p14/15/16: Protein 14/15/16
p53: Protein 53
PAZ: Proteindomäne conserved in PIWI, Argonaute (Argonautenproteine), Zwillie
PBS: phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PCR: Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PenStrep: Penicillin-Streptomycin
PFA: Paraformaldehyd
pre-microRNA: Vorläufer microRNA (precursor microRNA)
pri-microRNA: primäre microRNA (primary microRNA)
PIWI: P-element induced wimpy testis
PTEN: phosphatase and tensin homolog
p-Wert: Signifikanzwert
qPCR: quantitative Echtzeit-PCR (Polymerase-Kettenreaktion)
RAN-GTP: Ras-related nuclear protein - Guanosintriphosphat
RISC: RNA induzierter Silencing Komplex (RNA-induced silencing complex)
RNA: Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase: Ribonuklease
RNase A: Ribonuklease A
RNase H: Ribonuklease H
RNU: small nuclear ribonucleic acid
RT: Reverse-Transkriptase
RT-Primer: Reverse-Transkriptase Primer
SD: Standardabweichung (standard deviation)
siRNA: small interfering RNA
SIP1: Smad-interacting protein 1
SMARCB1: SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1
SMARCE1: SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1
SRS: stereotaktische Radiochirurgie (stereotactic radiosurgery)
SSC: citratgepufferte Standardsalzlösung (saline sodium citrate)
stRNA: small temporal RNA
SWI/SNF: SWItch/Sucrose non-fermentable, subfamily of ATP-dependent chromatin remodeling complexes found in eukaryotes

Taq-Polymerase: thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq)
TERT: katalytischer Subkomplex des Enzyms Telomerase (telomerase reverse transcriptase)
TIMP3: tissue inhibitor of metalloproteinases 3
TM-Primer: Taq-Man Primer
TP53: Gen des Tumorsuppressorproteins 53
TTP: time to progression
TRBP: transactivating response RNA-binding protein
UP: Ultra Pure
USA: Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America)
3' UTR: 3' untranslatierte Region
vgl.: vergleiche
vs.: versus
WHO: Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
Wnt: Kunstwort aus Wg für Wingless und Int-1
z.B.: zum Beispiel
ZEB 1: Zinc finger E-box-binding homeobox 1
ZNS: Zentrales Nervensystem
1p: kurzer Arm des Chromosoms 1
1q: langer Arm des Chromosoms 1
9p: kurzer Arm des Chromosoms 9
10q: langer Arm des Chromosoms 10
14q: langer Arm des Chromosoms 14
17p: kurzer Arm des Chromosoms 17
17q: langer Arm des Chromosoms 17
18p: kurzer Arm des Chromosoms 18
18q: langer Arm des Chromosoms 18
22q: langer Arm des Chromosoms 22
°C: Grad Celcius
µl: Mikroliter
%: Prozent
®: Registered Trade Mark
♂: männlich
♀: weiblich

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Onkogenetisches Baummodell der zytogenetischen Entwicklung von Meningeomen nach Ketter et al.	16
Abbildung 2: Onkogenetisches Baummodell der zytogenetischen Entwicklung von Meningeomen nach Geschlecht nach Ketter et al.	17
Abbildung 3: Die Biogenese der microRNA	27
Abbildung 4: RNA-Interferenz durch microRNA mittels RISC	29
Abbildung 5: Methoden der Fluoreszenzmessung bei der qPCR	50
Abbildung 6: Prinzip der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mittels TaqMan® MicroRNA Assays nach Thermo Fisher Scientific	52
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Prinzips der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	59
Abbildung 8: Geschlechtsverteilung im untersuchten Patientenkollektiv	66
Abbildung 9: Altersverteilung im untersuchten Patientenkollektiv	67
Abbildung 10: Verteilung der WHO Grade im untersuchten Patientenkollektiv	67
Abbildung 11: Verteilung der WHO Grade unter Berücksichtigung der Clustervariable Geschlecht im untersuchten Patientenkollektiv	68
Abbildung 12: Häufigkeiten der Tumorkonvexitäten: Konvexität vs. Schädelbasis	69
Abbildung 13: Häufigkeiten der Tumorsubkonvexitäten der Entitäten Konvexität vs. Schädelbasis	69
Abbildung 14: Präsentation der Tumore (Erstdiagnose vs. Rezidiv) im untersuchten Patientenkollektiv	70
Abbildung 15: Geschlechtsverteilung unter Berücksichtigung der Clustervariable Rezidiv im untersuchten Patientenkollektiv	71
Abbildung 16: Altersverteilung unter Berücksichtigung der Clustervariable Rezidiv im untersuchten Patientenkollektiv	72
Abbildung 17: Einteilung der Tumore nach WHO Graden unter Berücksichtigung der Clustervariable Rezidiv im untersuchten Patientenkollektiv	73
Abbildung 18: Geschlechtsverteilung im untersuchten Kollektiv der gesunden Probanden	75
Abbildung 19: Altersverteilung im untersuchten Kollektiv der gesunden Probanden	76
Abbildung 20: Vergleich der Expressionsmuster der microRNA 200a zwischen erstdiagnostizierten Tumoren und Rezidiven	82
Abbildung 21: Vergleich der Expressionsmuster der microRNA 200a im Blut zwischen gesunden Probanden und Patienten (männliche Kohorte)	83
Abbildung 22: Vergleich der Expressionsmuster der microRNA 200a im Blut zwischen gesunden Probandinnen und Probanden	84
Abbildung 23: Vergleich der Expressionsmuster der microRNA 409 zwischen drei Gruppen von aufsteigenden Tumorgrößen	85
Abbildung 24: Vergleich der Expressionsmuster der microRNA 409 zwischen zwei Altersgruppen (Gruppe 1: < 60-Jährige; Gruppe 2: ≥ 60-Jährige)	86
Abbildung 25: Aberrationsvergleich des Chromosoms 1 zwischen erstdiagnostizierten Tumoren und Rezidiven	89
Abbildung 26: Aberrationsvergleich des Chromosoms 22 zwischen Tumoren der Konvexität und der Schädelbasis	90
Abbildung 27: Aberrationsvergleich des Chromosoms 22 zwischen Tumoren der Konvexität und der Schädelbasis (neue Definition)	91
Abbildung 28: Aberrationsvergleich des Chromosoms 1 zwischen Tumoren der Konvexität und der Schädelbasis (neue Definition)	92
Abbildung 29: Aberrationsvergleich des Chromosoms 1 zwischen Tumoren des WHO Grads I und II	93
Abbildung 30: Aberrationsvergleich des Chromosoms 14 zwischen Tumoren des WHO Grads I und II	94
Abbildung 31: Übersicht über den Aberrationsvergleich des Chromosoms 14 zwischen drei Gruppen von aufsteigenden Tumorgrößen	95
Abbildung 32: Vergleich des Immunreaktiven Scores (IRS) zwischen Frauen und Männern	96

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Tumorklassifikation nach WHO Grad und Wachstumsmuster	12
Tabelle 2: Einteilung der Radikalität der Meningeomresektion nach Simpson	15
Tabelle 3: Substanz- und Verbrauchsmaterialien	37
Tabelle 4: Geräte/Software und Herstellerfirmen	38
Tabelle 5: Lösungen/Puffer	39
Tabelle 6: Chemikalien/Substanzen	40
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien	41
Tabelle 8: Geräte/Software und Herstellerfirmen	41
Tabelle 9: Abfolge der Reaktionsschritte der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
Tabelle 10: Komponenten des Mastermixes für die Reverse-Transkriptase-Polymerase- Kettenreaktion	47
Tabelle 11: Auflistung der TaqMan® Assays der untersuchten microRNAs	47
Tabelle 12: Auflistung der TaqMan® Assays der endogenen Kontrollen	47
Tabelle 13: Abfolge der Reaktionsschritte der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	48
Tabelle 14: Komponenten des Gesamtmastermixes für die Realtime-Polymerase-Kettenreaktion	53
Tabelle 15: Abfolge der Reaktionsschritte der Realtime-Polymerase-Kettenreaktion	53
Tabelle 16: Übersicht über die analysierten Genloci der Chromosomen	57
Tabelle 17: Patientenkollektiv	64
Tabelle 18: Vergleich der Altersverteilung zwischen Erstdiagnosen und Rezidiven im untersuchten Patientenkollektiv	72
Tabelle 19: Kollektiv der gesunden Probanden	74
Tabelle 20: Relative Expressionen der microRNAs 21, 34a, 200a und 409 im Tumorgewebe und im Blut im untersuchten Patientenkollektiv normalisiert auf die RNU6B	77
Tabelle 21: Relative Expressionen der microRNAs 21, 34a, 200a und 409 im Blut im untersuchten Probandenkollektiv normalisiert auf die RNU6B	78
Tabelle 22: Untersuchung der Expressionsmuster der microRNAs auf Normalverteilung im untersuchten Patientenkollektiv	79
Tabelle 23: Untersuchung der Expressionsmuster der microRNAs auf Normalverteilung im untersuchten Probandenkollektiv	79
Tabelle 24: Aberrationsmuster der untersuchten Chromosomen	88

Zusammenfassung

Meningeome sind eine Gruppe überwiegend benigner, langsam wachsender Neoplasien des Zentralen Nervensystems (ZNS), die ihren Ursprung in den meningoethelialen Arachnoidalzellen haben. Die Exposition mit ionisierender Strahlung gilt derzeit als einzig gesichertes Umweltrisiko für ihre Entstehung. Sie machen etwa ein Drittel aller primären intrakraniellen Tumore aus. Obwohl Meningeome als gutartig angesehen werden, sind sie dennoch Ursache gravierender Morbidität und erhöhter Mortalität. Meningeome werden nach der Tumorklassifikation der World Health Organization (WHO) in drei verschiedene histologische Grade (WHO Grad I-III) eingeteilt.

Die Standardtherapie ist die chirurgische Resektion bzw. die Strahlentherapie für chirurgisch nicht resezierbare Tumore. Nach Resektion kommt es dennoch bei etwa 20 % der operierten Patienten* zu Rezidiven, deren Ätiologie Ansatzpunkt für diverse Forschungsprojekte ist.

Meningeome weisen in etwa 60 % aller Fälle eine Monosomie des Chromosoms 22 auf. Eine Tumorprogression ist häufig mit einem nicht zufälligen Verlust weiterer Chromosomen bzw. chromosomaler Abschnitte verbunden. Ein besonderer Fokus liegt hierbei auf der Deletion des kurzen Arms des Chromosoms 1 (1p), die unabhängig von der jeweils vorliegenden WHO-Klassifikation mit einem signifikant erhöhten Rezidivrisiko einhergeht.

Neben genetischen haben auch epigenetische Faktoren einen maßgeblichen Einfluss auf den Verlauf von Tumorerkrankungen. Dies betrifft beispielsweise den Prozess der RNA-Interferenz.

Bei der RNA-Interferenz heften sich kurze, nicht proteinkodierende RNA-Moleküle an bereits transkribierte messenger-RNAs (mRNAs) und hemmen posttranskriptionell die Genexpression. Beispiele für nichtproteinkodierende RNAs sind microRNAs, welche mit assoziierten Proteinen zu den häufigsten Ribonukleoprotein-Komplexen der Zelle gehören.

Da microRNAs steuernd auf die Genexpression wirken können, kommt ihnen eine zentrale Rolle in der Regulation der Tumorsuppressorgene und Onkogene zu. In vielen malignen Tumoren konnte bereits eine Hoch- bzw. Herunterregulierung von microRNAs im Vergleich zu dem jeweiligen gesunden Gewebe nachgewiesen werden. MicroRNAs können aus einer Vielzahl biologischer Gewebe und Flüssigkeiten isoliert werden, darunter auch aus Blut.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass im soliden Meningeom verschiedene microRNAs im Vergleich zu gesundem Arachnoidalzellgewebe hoch- oder herunterreguliert sind.

Die microRNAs 21, 34a, 200a und 409 sind auf Chromosomenabschnitten lokalisiert, die beim Meningeom progressionsabhängig typische Aberrationen aufweisen.

Primäres Ziel dieser Promotionsarbeit war es herauszufinden, ob die Expressionsmuster dieser vier microRNAs mit dem Rezidivverhalten von Meningeomen in Verbindung gebracht werden können. Ein weiteres Ziel war es zu detektieren, ob die vier gewählten microRNAs nicht nur im soliden Tumor, sondern auch zeitgleich im Blut der Betroffenen analysierbar sind.

Um die epigenetische mit der molekularzytogenetischen Ebene in Relation zu setzen, wurden bei den untersuchten Meningeomen die Expressionsmuster der microRNAs mit den Ergebnissen einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) hinsichtlich Aberrationen der Chromosomen 1, 9, 10, 14, 18 und 22 verglichen.

Zu diesem Zweck wurden 51 Tumor- und Blutproben asserviert. Nach der Isolation der RNA und der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion wurden die Expressionsmuster der gewählten microRNAs aus dem Tumorgewebe und Blut mittels Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) untersucht. Im Zuge der erfolgreichen Neuetablierung der RNU6B als endogene Kontrolle der Expressionsmuster der analysierten microRNAs im Blutplasma von 43 Patienten wurden deren Tumor- und Blutproben in die Auswertung dieser Promotionsarbeit eingeschlossen.

Eine signifikante Korrelation der Expressionsmuster der jeweiligen microRNAs zwischen Tumor und Blut konnte nicht detektiert werden.

Die im Tumor detektierte microRNA 200a zeigte als einzige untersuchte microRNA eine signifikant geringere Expression bei Rezidiven als bei erstdiagnostizierten Meningeomen ($p = 0,009$).

Bei dem Vergleich zwischen der Expression der microRNA 409 im Tumor und dem Tumolvolumen konnte eine signifikante Korrelation festgestellt werden ($p = 0,043$).

Die Expression der microRNA 409 im Tumor korrelierte signifikant negativ mit dem Alter der untersuchten Patientenkohorte ($p = 0,012$).

Beim Vergleich des Blutes von Meningeompatienten mit gesunden Probanden konnte im Bereich der untersuchten microRNAs ein signifikanter Unterschied detektiert werden: die Expression der microRNA 200a im Blut der männlichen Kohorte zeigte sich bei Patienten signifikant höher exprimiert als bei den gesunden Probanden ($p = 0,016$). Bei der weiblichen Stichprobe fand sich hingegen kein signifikanter Unterschied. Bezüglich der microRNAs 21, 34a und 409 konnte bei beiden Geschlechtern kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Die Gene für die microRNAs 34a und 200a sind auf dem Chromosomenabschnitt 1p und für die microRNA 409 auf dem Chromosom 14q lokalisiert.

Die Expressionsmuster dieser microRNAs korrelierten bezogen auf den soliden Tumor jeweils hochsignifikant mit den Ergebnissen der Aberrationen in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) für den jeweiligen Chromosomenabschnitt ($p \leq 0,001$).

Der kurze Arm des Chromosoms 1 (1p) war bei Rezidiven signifikant öfter von Verlusten betroffen als bei Erstdiagnosen ($p = 0,013$). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Meningeome der Konvexität signifikant häufiger Verluste des Chromosoms 22 aufweisen als Tumore der Schädelbasis ($p = 0,011$). Dies traf auch auf den kurzen Arm des Chromosoms 1 zu ($p = 0,043$).

Tumore des WHO Grads II wiesen im Bereich des Chromosomenabschnittes 1p häufiger Verluste auf als Meningeome des WHO Grads I ($p = 0,001$).

Die Detektion der microRNA 200a als Rezidivmarker, der sich von der jeweiligen Expression in erstdiagnostizierten Meningeomen signifikant unterscheidet, ist als Hauptergebnis dieser Promotionsarbeit anzusehen. In diesem Zuge konnte erstmals ein auf dem Chromosomenabschnitt 1p lokalisierter, WHO Grad unabhängiger Rezidivmarker für Meningeome auf der epigenetischen Ebene detektiert werden.

*Aus Gründen der Lesbarkeit wird im Text dieser Promotionsarbeit durchgängig die männliche Form der Darstellung gewählt, falls kein Geschlecht gesondert hervorgehoben werden soll. Selbstverständlich wird dabei auch immer das nicht männliche Patientengut inkludiert.

Summary

Meningiomas are predominantly benign and slowly growing neoplasms of the central nervous system originating from meningeothelial arachnoid cells. Exposure to ionizing radiation currently is the only proved environmental risk for its occurrence. Meningiomas represent about one third of all primary intracranial tumors. Although mostly benign, they cause serious morbidity and increased mortality. Meningiomas are divided into three different histological grades (WHO grades I-III) according to the tumor classification of the World Health Organization (WHO).

Standard therapy is surgical resection or radiation for surgically unresectable tumors. After tumor resection, however, about 20 % of the operated patients show recurrences. The etiology of recurrences is the topic of various research projects.

Meningiomas show monosomy of chromosome 22 in about 60 % of all cases. Tumor progression is often associated with a nonrandom pattern of losses of additional chromosomes or parts of chromosomes. Particularly focused is 1p deletion, which is associated with a significantly increased risk of recurrence and is independent of the histological classification (WHO).

In addition to genetic factors, epigenetic pathways also have a decisive influence on the course of tumor diseases. This applies, for example, to the process of RNA interference.

In the process of RNA interference, short non-protein-coding RNA molecules pair with already transcribed messenger RNAs (mRNAs) and inhibit gene expression after transcription.

MicroRNAs are non-protein-coding RNAs. With associated proteins they constitute one of the most prevalent ribonucleoprotein complexes in cells.

Since microRNAs can control gene expression, they play a central role in the regulation of tumor suppressor genes and oncogenes. In various malignant tumors upregulation or downregulation of microRNAs compared to non-affected tissue has already been detected. MicroRNAs can be isolated from a wide variety of biological tissues and fluids, including blood.

Various studies showed that in solid meningiomas several microRNAs are upregulated or downregulated compared to normal arachnoid cell tissue.

The microRNAs 21, 34a, 200a and 409 are located on parts of chromosomes which show typical progression-dependent aberrations in meningiomas.

The primary goal of this research project was to find out whether the expression patterns of these four microRNAs are associated with the recurrence of meningiomas. Another goal was to learn whether the four selected microRNAs can be detected not only in the solid tumor but also in the blood of the patients.

In order to compare the molecular-cytogenetic with the epigenetic level, the expression patterns of microRNAs in the examined meningiomas were set in relation to aberrations of chromosomes 1, 9, 10, 14, 18 and 22 by using fluorescence in situ hybridization (FISH).

The results were compared to the expression patterns of the respective microRNAs. For this purpose, 51 tumor and blood samples were collected. After isolation of the RNA and processing of the reverse transcription polymerase chain reaction, expression patterns of selected microRNAs from tumor tissue and blood were analyzed by using real time polymerase chain reaction (qPCR). After successful validation of RNU6B as an endogenous control in the plasma of 43 patients, these tumor and blood samples were included in a detailed analysis within this research project.

A significant correlation of the microRNA expression patterns between tumor and blood could not be detected.

MicroRNA 200a was expressed at a significantly lower level in recurrences of meningiomas than in newly diagnosed tumors ($p = 0.009$).

The expression of microRNA 409 in tumor showed a significant correlation with the tumor volume ($p = 0.043$). The expression of microRNA 409 in tumor was negatively correlated with the age of the patients. This difference was statistically significant ($p = 0.012$).

Comparing the blood of meningioma patients with healthy volunteers, a significant difference could be detected in the examined microRNAs of the male cohort: the expression of microRNA 200a in the blood of the male patients was significantly higher than in healthy male volunteers ($p = 0.016$). In the female cohort, however, there was no significant difference. With regard to microRNAs 21, 34a and 409, no significant difference could be found in either sex.

The genes of microRNAs 34a and 200a are located on chromosome 1p, whereas microRNA 409 is located on chromosome 14.

In the solid tumor, the expression patterns of these microRNAs were significantly correlated ($p \leq 0.001$) with aberrations in fluorescence in situ hybridization (FISH) of the respective chromosome. In recurrences, the short arm of chromosome 1 (1p) was significantly more frequently affected by losses than in newly diagnosed meningiomas ($p = 0.013$). Furthermore, it was detected that tumors of convexity had significantly more frequent losses of chromosome 22 than skull base meningiomas ($p = 0.011$). This also was true for the short arm of chromosome 1 (1p) ($p = 0.043$). WHO grade II tumors showed more frequent losses in chromosome 1p region than WHO grade I meningiomas ($p = 0.001$).

The main result of this research project is the detection of a new biomarker for recurrence of meningiomas: Expression of microRNA 200a differs significantly in newly diagnosed meningiomas compared to recurrent meningiomas. For the first time a histologically (WHO) independent biomarker for recurrence localized on chromosome 1p was developed at the epigenetic level.

2. Einleitung

2.1 Tumore und ihre Entstehung

Zellen stellen die Grundeinheit des Lebens dar. Höhere Organismen, wie z.B. der Mensch, bestehen aus Zellgemeinschaften, die durch einen fein regulierten Zyklus aus Wachstum und Teilung aus einer ursprünglichen Zelle entstanden sind. Obwohl die für die Zellteilung notwendige Replikation der DNA sehr exakt abläuft, entsteht pro 10^9 bis 10^{10} kopierter Nukleotide ein Fehler. Ein Austausch (Substitution) einzelner Nukleotide, ein Verlust (Deletion) oder ein Zugewinn (Insertion) in einer DNA-Sequenz kann zu einer Mutation im jeweiligen translatierten Protein führen. Somit können dessen Aktivität, Stabilität und Lokalisation beeinflusst werden. Mutationen innerhalb der regulatorischen DNA-Sequenzen eines Gens können den Zeitpunkt und die Lokalisation der Expression des jeweiligen Gens determinieren. Im Verlauf des menschlichen Lebens kommt es im Durchschnitt zu etwa 10^{16} Zellteilungen im Körper. Bei einer kritischen Anzahl von Mutationen führen diese zu der Entstehung von Tumoren. Dies kann beispielsweise durch einen Defekt in einem für die DNA-Reparatur verantwortlichen Protein oder aber durch einen Fehler in einem Kontrollpunkt im Zellzyklus bedingt sein. Aufgrund der sich infolgedessen unkontrolliert replizierenden, fehlerhaften DNA kann es zu Chromosomenbrüchen- und Umgruppierungen kommen, was sich in einem stark anomalen Karyotyp niederschlägt (ALBERTS et al., 2012).

Der Begriff „Tumor“ hat seinen Ursprung im Lateinischen und bedeutet „Geschwulst“. Es existieren sowohl gutartige (benigne) als auch bösartige (maligne) Formen.

Bei der benignen Form kommt es zu einer lokalen Ansammlung und einem Wachstum neoplastischer Zellen (neugebildete Tumorzellen im Rahmen des fehlregulierten Zellwachstums), die jedoch nicht infiltrativ in benachbarte Gewebe einwachsen. Bei der malignen Form kommt es zu einer Invasion der Tumorzellen in umliegendes Gewebe, z.B. auch in Blut- oder Lymphgefäße. Dies führt zu lokal destruierendem Wachstum und geht darüber hinaus mit der möglichen Bildung von Sekundärtumoren (Metastasen) einher. In diesem Fall kann der Tumor als „Krebs“ bezeichnet werden, dem das invasive Wachstum als charakteristische Eigenschaft zugrunde liegt (ALBERTS et al., 2012). Darüber hinaus existieren semimaligne Formen. Tumoren dieser Entität definieren sich über ein proliferatives, lokal destruierendes Wachstum, aber einer geringen Tendenz zur Metastasierung (DISSEMOND, GRABBE, 2006).

Im physiologischen Zustand besteht im adulten Gewebe ein genetisch reguliertes Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung (Proliferation), Zelldifferenzierung und programmiertem Zelltod (Apoptose) (HENN, URBSCHAT, 1998). Bei Tumorzellen ist die Apoptose aufgrund einer diesbezüglichen Fehlregulation nicht mehr möglich (ALBERTS et al., 2012).

Hier kommt es typischerweise zu Veränderungen der Protoonkogene und Tumorsuppressorgene, welche die zentralen proliferationsrelevanten Gene darstellen. Die physiologische Erneuerung von Zellen in Geweben wird durch ein Gleichgewicht dieser proliferationsfördernden- bzw. unterdrückenden Gene reguliert. Ein Verlust der genetischen Proliferationskontrolle und damit eine neoplastische Entartung resultiert in den meisten Fällen aus einer erworbenen und in selteneren Fällen über die Keimbahn ererbten Mutation der Protoonkogene und Tumorsuppressorgene (HENN, URBSCHAT, 1998).

Protoonkogene können Zellen zur Teilung anregen und sind in der differenzierten Zelle im Allgemeinen inaktiv. Tumorsuppressorgene begrenzen hier die Proliferationsaktivität (HENN, URBSCHAT, 1998). Bereits eine monoallelische Mutation eines Protoonkogens führt zu dessen Aktivierung und Bildung eines aktivierten Onkogens. Die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens erfolgt hingegen rezessiv. Somit ist eine biallelische Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens Voraussetzung für eine unkontrollierte Zellproliferation (ALBERTS et al., 2012).

Ursächlich für Tumorerkrankungen sind, basierend auf der jeweiligen genetischen Konstitution, zum einen endogene Faktoren und zum anderen exogene Einflüsse, wie chemische Karzinogene oder ionisierende Strahlung (ALBERTS et al., 2012).

2.2 Thematische Einführung in die Meningeome

Meningeome sind eine Gruppe überwiegend langsam wachsender, meist benigner Neoplasien des Zentralen Nervensystems, die ihren Ursprung in den meningotheelialen Arachnoidalzellen haben (LOUIS et al., 2016a; VOGEL, 2009). Sie machen etwa ein Drittel aller primären intrakraniellen Tumore aus. Meningeome treten bei Frauen deutlich häufiger auf als bei Männern (GALANI et al., 2017). In der Mehrheit der Fälle weisen Meningeome ein rein verdrängendes Wachstumsmuster auf, ohne das Gehirnparenchym oder den Knochen zu infiltrieren (MÜLLER et al., 1999).

Der Begriff Meningeom wurde 1922 von Harvey Cushing geprägt (BUERKI et al., 2018), der bereits 1938 das teilweise im weiteren Verlauf nicht abschätzbare Rezidivverhalten nach Totalresektion beschrieb (KETTER et al., 2008).

Obwohl Meningeome üblicherweise als gutartig angesehen werden, sind sie dennoch Ursache signifikanter Morbidität und erhöhter Mortalität (YOO-JIN et al., 2008). Die häufigste Tumorlokalisation liegt an der Konvexität des Schädels (KETTER et al., 2008). Meningeome werden nach drei verschiedenen histologischen Graden (WHO Grad I-III) eingeteilt, welche sich wiederum in 16 Subtypen unterteilen. Trotz unterschiedlicher Theorien über die Ätiologie von Meningeomen gilt eine Exposition mit ionisierender Strahlung derzeit als einzig gesicherter Risikofaktor (LOUIS et al., 2016a).

Standardtherapie ist die chirurgische Resektion bzw. die Strahlentherapie für nicht chirurgisch resezierbare Tumore (BUERKI et al., 2018). Intrakranielle Meningeome können in ungefähr 75 % aller Fälle vollständig entfernt werden (KETTER et al., 2008), wobei das Ausmaß der chirurgischen Resektion nach Simpson beurteilt wird (SIMPSON, 1957). Dennoch kommt es bei einem signifikanten Anteil der operierten Patienten zu einem Rezidiv, dessen Ätiologie Grundlage für diverse Forschungsschwerpunkte ist. Einen Erklärungsansatz bietet hierbei die Zytogenetik (KETTER et al., 2007b). Meningeome weisen in etwa 60 % aller Fälle eine Monosomie des Chromosoms 22 auf (ZANG, 1982). Eine Tumorprogression bzw. Rezidivierung ist häufig mit einem nicht zufälligen Verlust weiterer Chromosomen bzw. chromosomaler Abschnitte verbunden (KETTER et al., 2007b).

2.2.1 Epidemiologie

Meningeome stellen die häufigste primäre intrakranielle und spinale Tumorentität dar (LOUIS et al., 2016a; SAHM et al., 2017). Sie umfassen zwischen 26 % und 34 % der primären intrakraniellen und spinalen Tumore (HOLLECZEK et al., 2019). Circa 10 % der Meningeome sind im Spinalkanal lokalisiert (MAWRIN, 2019).

2019 wurde eine bevölkerungsbezogene Studie zur Inzidenz, Mortalität und dem Behandlungsergebnis von 992 Meningeompatienten im Saarland publiziert. Das Verhältnis von Frauen zu Männern wird in der Gesamtkohorte mit 2,53:1 angegeben. Die altersstandardisierte Inzidenzrate von Meningeomen lag bei 2,5 bzw. 5,8 Neuerkrankungen pro 100.000 Männern bzw. Frauen pro Jahr. Somit haben Frauen ein deutlich höheres Erkrankungsrisiko (HOLLECZEK et al., 2019).

Die jährliche Inzidenzrate von Meningeomen der kaukasischen Bevölkerung der Vereinigten Staaten von Amerika (USA) liegt bei 7,4 von 100.000 Personen. In der WHO-Klassifikation der Tumore des Zentralen Nervensystems wird das Verhältnis mit 10,5 Erkrankungsfällen pro 100.000 Frauen gegenüber 4,8 Fällen pro 100.000 Männern angegeben. Dieses asymmetrische Geschlechtsverhältnis erreicht in der prämenopausalen Alterskohorte (35-44 Jahre) mit 3,15:1 seinen Höhepunkt und nimmt in den davor- und dahinterliegenden Altersgruppen ab. Der Altersmedian aller von einem Meningeom Betroffenen liegt bei 65 Jahren. Das Lebenszeitrisiko bzw. die Lebenszeitprävalenz an einem Meningeom zu erkranken beträgt in den USA etwa ein Prozent (LOUIS et al., 2016a) und steigt mit dem Alter an (BUERKI et al., 2018). Die Inzidenzrate ist für beide Geschlechter bei über 70-jährigen Patienten 3,5-mal höher als bei unter 70-jährigen (GALANI et al., 2017).

Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung der epidemiologischen Studie im Saarland lag bei 63 Jahren. 28 % der Patienten waren jünger als 55 Jahre, 49 % waren zwischen 55 und 74 Jahre alt und 23 % der Patienten waren älter als 74 Jahre.

Todesfälle wurden fast ausschließlich bei Patienten beobachtet, die älter als 75 Jahre waren. Von den untersuchten Patienten wurde bei 69,7 % ein WHO Grad I Meningeom diagnostiziert, bei 27,5 % der

Betroffenen lag ein Meningeom WHO Grad II vor und bei 2,8 % ein Meningeom WHO Grad III. Die 10-Jahres Überlebensraten dieser Patienten betragen für die WHO Grade I-III jeweils 77 %, 71 % und 23 %. Der Anteil von Meningeomen der WHO Grade II und III lag bei Männern (39 %) deutlich höher als bei Frauen (27 %) (HOLLECZEK et al., 2019). Auch in der WHO-Klassifikation der Tumore des Zentralen Nervensystems zeigen die seltener auftretenden Meningeome der WHO Grade II und III ein häufigeres Auftreten bei Männern (LOUIS et al., 2016a).

2.2.2 Ätiologie

Es existiert eine Vielzahl von Theorien bzgl. der Ätiologie von Meningeomen. Als einzig gesichertes Umweltrisiko gilt derzeit die Exposition mit ionisierender Strahlung. Die wissenschaftlichen Untersuchungen sprechen für eine genetisch unterschiedlich ausgeprägte Vulnerabilität hinsichtlich der Ausbildung von Meningeomen nach Strahlenexposition. Dies gilt auch für eine Bestrahlungstherapie und den Strahleneinsatz in der Radiodiagnostik. Eine Exposition in der Kindheit geht mit einem höheren Risiko einher als eine Bestrahlung im Erwachsenenalter. Die höhere Inzidenz bei Frauen und die Expression von Progesteronrezeptoren bei Meningeomen lassen hormonelle Zusammenhänge vermuten (LOUIS et al., 2016a). In Studien über WHO Grad I Meningeome zeigte sich ein kürzeres progressionsfreies Intervall bei erkrankten Frauen, die ein rein Progesteron basiertes Kontrazeptivum einnahmen, im Vergleich zu reinen Östrogenkontrazeptiva oder Östrogen/Progesteron-Kombinationspräparaten. Dementsprechend führt eine Progesteroneinnahme zu einer moderaten Risikosteigerung an einem Meningeom zu erkranken (HARLAND et al., 2018). Dasselbe trifft auch für Übergewicht, Diabetes mellitus, Nikotinabusus und die arterielle Hypertonie zu (HARLAND et al., 2018; MAWRIN, 2019). Die wachstumsfördernde Rolle von Progesteron konnte in weiteren Studien bestätigt werden (CARROLL et al., 1993; HSU et al., 1997). Darüber hinaus scheint eine vorliegende Schwangerschaft das Meningeomwachstum einer Frau zu begünstigen (ROELVINK et al., 1987).

Untersuchungen zur Exposition mit Umweltgiften, zur Mobiltelefonnutzung oder zu anamnestischen Schädel-Hirntraumata konnten keine konsistenten Ergebnisse erzielen (LOUIS et al., 2016a).

Es gibt mehrere familiäre Erkrankungen, welche die Auftretenswahrscheinlichkeit für ein Meningeom erhöhen. Am häufigsten ist hierbei die autosomal-dominant vererbte Neurofibromatose Typ 2 (NF 2), allerdings gehen weniger als ein Prozent der Meningeome mit dieser erblich bedingten Tumorerkrankung einher (BUERKI et al., 2018).

Syndrome, die gelegentlich mit dem Auftreten eines Meningeoms assoziiert werden, sind das Von-Hippel-Lindau Syndrom, das Li-Fraumeni Syndrom, das Cowden Syndrom und die Multiple endokrine Neoplasie (MEN) Typ 1 (BUERKI et al., 2018).

Stillen eines Säuglings für mindestens 6 Monate senkt dessen Lebenszeitrisiko an einem Meningeom zu erkranken. Allergische Erkrankungen reduzieren das Risiko ebenfalls (LOUIS et al., 2016a).

2.2.3 Lokalisation und klinische Präsentation

Allgemein können Meningeome an jeder intrakraniellen, orbitalen und spinalen Lokalisation auf der jeweiligen Arachnoidalzelloberfläche auftreten (BUERKI et al., 2018; LOUIS et al., 2016a). Die meisten Meningeome befinden sich somit unmittelbar an der Dura mater und werden von dieser vaskularisiert. Somit ist diese Tumorentität extrazerebral lokalisiert. Sie zeigt gegenüber dem neuronalen Parenchym meist ein verdrängendes Wachstum. Nur die Klasse der Meningeome des WHO Grads III wird mit einem aggressiven klinischen Verhalten, wie z.B. einem infiltrativen Wachstum, in Verbindung gebracht (ZANG, 2001). Mehr als 90 % aller Meningeome sind solitär lokalisiert (LOUIS et al., 2016a).

Meningeome treten meistens sporadisch und selten als multiple Tumore auf (URBSCHAT et al., 2011). Sporadische Meningeome sind meist gutartig und zeigen ein langsames Wachstum sowie ein Auftreten in späteren Lebensdekaden (ZANG, 2001). Multiple Meningeome imponieren häufig bei Patienten, die an Neurofibromatose Typ 2 (NF 2) erkrankt sind bzw. bei dem Verlust verschiedener Tumorsuppressorgene wie SMARCB1 (SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1) oder NF2 (CHRISTIAANS et al., 2011; GOUTAGNY, KALAMARIDES, 2010).

Aufgrund der langsamen Größenprogredienz der Meningeome treten klinische Symptome schleichend auf, sodass diese Tumore teilweise erst im fortgeschrittenen Stadium des Wachstums diagnostiziert werden (BUERKI et al., 2018). Häufig basiert die Diagnose auf einem Zufallsbefund bei einer bildgebenden Untersuchung (Kernspintomographie, Computertomographie) (BUERKI et al., 2018; LOUIS et al., 2016a).

In seltenen Fällen können Meningeome intraventrikulär, epidural oder sogar außerhalb des Zentralen Nervensystems (ZNS) (z.B. in der Lunge) detektiert werden (KETTER et al., 2008; LOUIS et al., 2016a).

Die Einteilung der Lokalisation von Meningeomen erfolgt in die drei Hauptgruppen Konvexität, Schädelbasis und Spinalkanal. Die Konvexität lässt sich wiederum in die Untergruppen Konvexität, Parasagittalregion, Tentorium, hintere Schädelgrube und Falx cerebri differenzieren. Die Schädelbasis wird in die Kategorien lateraler und medialer Keilbeinflügel, Olfaktoriusrinne und Tuberculum sellae unterteilt (KETTER et al., 2008).

Die Ausprägung der klinischen Symptome verläuft typischerweise chronisch oder subakut und ist abhängig von der Kompression benachbarter anatomischer Strukturen (BUERKI et al., 2018; LOUIS et al., 2016a). Abhängig von der neuroanatomischen Lokalisation können Meningeome eine

imposante Größe von bis zu 10 cm Durchmesser erreichen, bis eine jeweilige Symptomatik klinisch auffällig wird (ANDREAE et al., 2006; ZANG, 1982). Es werden unter anderem fokal neurologische Defizite und zerebrale Krampfanfälle verursacht (BUERKI et al., 2018). Möglich sind beispielsweise auch Hemiparesen, Geruchs-, Seh- und Schluckstörungen (ANDREAE et al., 2006). Oftmals sind darüber hinaus unspezifische neurologische Symptome wie Kopfschmerzen oder Unwohlsein zu verzeichnen (BUERKI et al., 2018; LOUIS et al., 2016a). Auch Wesensveränderungen sind möglich (ANDREAE et al., 2006).

In sehr seltenen Fällen können anaplastische Meningeome pulmonal, pleural, hepatisch oder ossär metastasieren (LOUIS et al., 2016a).

Es existiert eine Korrelation zwischen der Tumorlokalisation und der Malignität von Meningeomen. Meningeome im Bereich des Spinalkanals präsentieren sich benigner als im Bereich der Schädelbasis. Tumore der Konvexität zeigen demgegenüber ein höheres Rezidivrisiko, was auch abhängig von der genetischen Konstitution ist (Genetischer Progressionscore nach Ketter; siehe Abschnitt 2.2.4.2) (KETTER et al., 2008; KETTER et al., 2007b).

2.2.4 Klassifikation

2.2.4.1 Klassifikation von Tumoren des Zentralen Nervensystems nach der World Health Organization (WHO)

Allgemein können Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) das Gehirn oder das Rückenmark betreffen. Basierend auf histomorphologischen Eigenschaften unterscheidet man eine Einteilung nach der WHO in die Grade I-IV. Die gutartigen WHO Grad I Tumore haben ein niedriges proliferatives Potential und können nach einer alleinigen chirurgischen Resektion geheilt werden. WHO Grad IV Tumore gelten als hochmaligne, zeichnen sich durch eine hohe Zellteilungsrate aus und haben eine infauste Prognose (LOUIS et al., 2016a).

Meningeome werden nach der aktuellen WHO Tumorklassifikation in die WHO Grade I-III eingeteilt. Darüber hinaus existiert eine weitere Unterteilung in 16 Subtypen (siehe Tabelle 1). Mit Abstand am häufigsten tritt das Meningeom WHO Grad I auf. Nur 20-25 % aller Meningeome entfallen auf das Meningeom WHO Grad II und 1-6 % auf das Meningeom WHO Grad III (LOUIS et al., 2016a; LOUIS et al., 2016b).

Tabelle 1: Tumorklassifikation nach WHO Grad und Wachstumsmuster (modifiziert nach der Tumorklassifikation der World Health Organization für Tumore des Zentralen Nervensystems (LOUIS et al., 2016a))

Meningeome mit niedrigem Rezidivrisiko und wenig aggressivem Wachstumsmuster

WHO Grad I:

1. meningotheiomatöses Meningeom
2. fibröses (fibroblastisches) Meningeom
3. transitionales (gemischtes) Meningeom
4. psammomatöses Meningeom
5. angiomatöses Meningeom
6. mikrozytisches Meningeom
7. sekretorisches Meningeom
8. lymphoplasmazellreiches Meningeom
9. metaplastisches Meningeom

Meningeome mit erhöhtem Rezidivrisiko und aggressivem Wachstumsmuster

WHO Grad II:

10. chordoides Meningeom
11. klarzelliges Meningeom
12. atypisches Meningeom

WHO Grad III:

13. papilläres Meningeom
14. rhabdoides Meningeom
15. anaplastisches Meningeom

Sonderform:

16. Meningeome jeglichen Subtyps mit hohem Proliferationsindex

2.2.4.1.1 WHO Grad I: Benigne Meningeome

Der überwiegende Teil der Meningeome gehört zur Kategorie der WHO Grad I Meningeome. Diese benigne Tumorklasse verfügt unter den genannten Wachstumsmustern (siehe Tabelle 1) mehrheitlich über eine meningotheliale, fibröse oder transitionale Histomorphologie und weist keine Zeichen einer Hirninvansion auf (BUERKI et al., 2018; LOUIS et al., 2016a; YOO-JIN et al., 2008). Die Rezidivrate nach kompletter Tumorresektion liegt bei 7-20 % (YOO-JIN et al., 2008).

2.2.4.1.2 WHO Grad II: Atypische Meningeome

Diese zweithäufigste Kategorie beinhaltet drei histopathologische Subtypen (siehe Tabelle 1) und weist eine Rezidivrate von 29-40 % auf (BUERKI et al., 2018; YOO-JIN et al., 2008).

2.2.4.1.3 WHO Grad III: Anaplastische Meningeome

Die Tumore aus dieser Kategorie definieren sich über Malignität und können invasiv in die Dura mater, Knochen, Muskeln, venösen Sinus bzw. das Gehirnparenchym einwachsen (MÜLLER et al., 1999).

Auch die histologischen Formen der papillären und rhabdoiden Meningeome (siehe Tabelle 1) sind Bestandteil dieser Kategorie. Die Rezidivrate liegt mit 50-78 % im kategorialen Vergleich am höchsten (BUERKI et al., 2018; YOO-JIN et al., 2008). Ein WHO Grad III Meningeom führt im Durchschnitt in weniger als zwei Jahren nach Diagnosestellung zum Tod (LAMSZUS, 2004).

2.2.4.2 Genetischer Progressionsscore nach Ketter

Bei einem WHO Grad I Meningeom beträgt der Median der progressionsfreien Zeit nach kompletter Tumorresektion 7,5 Jahre. Dieser Zeitraum reduziert sich bei Tumoren der WHO Grade II und III auf 2,4 - 3,5 Jahre (JAASKELAINEN et al., 1986). Eine zuverlässige Aussage zur Rezidivwahrscheinlichkeit ausschließlich auf Basis des jeweiligen WHO Grads ist nicht möglich (KETTER et al., 2007b). Um in diesem Zusammenhang genauere prädiktive Angaben treffen zu können, entwickelten Ketter et al. einen genetischen Progressionsscore. Dieser basiert auf chromosomalen Aberrationsmustern, die eine signifikante Rolle beim Rezidivverhalten von Meningeomen spielen. In dieser zytogenetischen Klassifikation von Meningeomen werden drei aufsteigende Grade (Grad 0-2) eines genetischen Progressionsscores (GPS) unterschieden. Meningeome der Gruppe 0 verfügen über einen unauffälligen Karyotyp mit 46 Chromosomen. Die Gruppe 1 definiert sich über eine Monosomie des Chromosoms 22, die Gruppe 2 über einen zusätzlichen Verlust des kurzen Arms des Chromosoms 1 (1p Deletion) und eventuell weitere numerische oder strukturelle Chromosomenveränderungen (KETTER et al., 2008). Ein Meningeom, das einen GPS Grad von 2 aufweist, hat ein signifikant höheres Rezidivrisiko als Meningeome mit dem GPS Grad 0 und 1 (KETTER et al., 2008).

2.2.5 Therapie

Bei Patienten, die an einem Meningeom erkrankt sind, hat es sich als sinnvoll erwiesen, zwischen asymptomatischen und symptomatischen Verlaufsformen zu unterscheiden. Bei asymptomatischen Patienten werden regelmäßige bildgebende Maßnahmen zur Überwachung als empfohlene Vorgehensweise akzeptiert. Kommt es zu einer starken Größenprogredienz oder zeigen sich Symptome, ist die chirurgische Resektion das Standardverfahren. Diese ist jedoch teilweise durch die neuroanatomische Tumorlokalisierung limitiert, da beteiligte und angrenzende Strukturen wie Sinus durae matris, Arterien und Hirnnerven die Radikalität des Eingriffs einschränken können. Auch die Lage des Tumors (z.B. an der Schädelbasis) oder die Invasion in neurologisch hochrelevante Gebiete können den Eingriff limitieren (BUERKI et al., 2018).

Die Rezidivraten werden entscheidend durch das Ausmaß der Resektion bestimmt (BUERKI et al., 2018). Dessen Einteilung erfolgt in Form von Graden nach Simpson (siehe Tabelle 2) (SIMPSON, 1957). Die Rezidivrate nach einer Resektion gemäß Grad I nach Simpson beträgt 9 %, bei einer Resektion nach den Graden II-IV liegen die Rezidivraten jeweils bei 19 %, 29 % und 44 %. Bei einem Eingriff Simpson Grad V ist eine Einteilung zur Rezidivbestimmung nicht sinnvoll, da es sich lediglich um eine chirurgische Dekompression des Tumors handelt (SIMPSON, 1957). Im Fall einer ossären Infiltration ist die Resektion des betroffenen Knochenabschnitts obligat, um von dort ausgehende Rezidive zu verhindern. Bei lokalisationsbedingt chirurgisch nicht resezierbaren Tumoren

ist alternativ eine Bestrahlungstherapie indiziert. Diese kann sowohl von extern fraktioniert (EBRT) als auch in Form einer stereotaktischen Einmalbestrahlung (SRS) appliziert werden. Bestrahlungskonzepte kommen auch als adjuvante Therapie zum Einsatz. Zytotoxische Chemotherapeutika haben bei der Behandlung von Meningeomen einen limitierten Effekt und werden in den Leitlinien in der Regel nicht empfohlen (BUERKI et al., 2018).

Ungefähr 80 % aller Meningeome können allein durch eine primäre Operation erfolgreich therapiert werden (SAHM et al., 2017). Allgemein kommt es bei etwa 20 % der resezierten Meningeome zu einem Rezidiv, was eine weitere Therapie, wie z.B. eine erneute Operation, eine Radiotherapie (EBRT oder SRS) oder im Ausnahmefall eine systemische Chemotherapie zur Folge hat (BUERKI et al., 2018; SAHM et al., 2017).

Hinsichtlich der Rückbildung neurologischer Symptome bei Meningeompatienten ist die alleinige Bestrahlung weniger erfolgreich als die Operation (BUERKI et al., 2018).

Die meisten Studien, die sich mit dem Langzeiterfolg radikaler Tumorresektionen von Meningeomen befassen, beschreiben höhere Rezidivquoten als in Anbetracht des meist gutartigen histologischen Befundes zu erwarten wäre (KETTER et al., 2007b).

Tabelle 2: Einteilung der Radikalität der Meningeomresektion nach Simpson (SIMPSON, 1957)

Einteilung	Beschreibung der Resektionsradikalität
Grad 1	Totalresektion von Tumor, Duralansatz und betroffenem Knochen sowie betroffenen venösen Sinus
Grad 2	Totalresektion des Tumors, Koagulation des Duralansatzes
Grad 3	Totalresektion des Tumors ohne Resektion oder Koagulation von Dural- und Extraduralbestandteilen
Grad 4	partielle Resektion des Tumors
Grad 5	Dekompression mit oder ohne Biopsie

2.2.6 Rezidivverhalten

2.2.6.1 Progressionsabhängige chromosomale Veränderungen

Die Rezidivwahrscheinlichkeit wird neben der Resektionsradikalität und dem WHO Grad, wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben, auch von dem zytogenetischen Profil des jeweiligen Meningeoms determiniert.

Die Gruppe der Meningeome gehört auf zytogenetischer Ebene zu den am besten analysierten Tumoren des Menschen (ZANG, 2001). Meningeome mit normalem Karyotyp sind bei Frauen gegenüber Männern im Verhältnis von 3:1 überrepräsentiert, wohingegen sich das

Geschlechtsverhältnis bei Meningeomen mit progressionsabhängigen chromosomalen Aberrationen angleicht (KETTER et al., 2007b; ZANG, 1982). Atypische und anaplastische Meningeome weichen im Vergleich zu benignen Meningeomen verstärkt vom normalen Karyotyp ab (LOUIS et al., 2016a). Das Tumorwachstum und Rezidivverhalten ist mit einer zunehmenden Hypodiploidisierung (weniger als 46 Chromosomen, was einem diploiden Chromosomensatz entspricht) assoziiert, während eine Hyperdiploidie nur in seltenen Fällen auftritt (KETTER et al., 2007a).

Ketter et al. konnten in einem onkogenetischen Baummodell (siehe Abbildungen 1 und 2) aufzeigen, dass die Progression von Meningeomen mit einem nicht zufälligen Verlust von Chromosomen bzw. chromosomalen Abschnitten vergesellschaftet ist (KETTER et al., 2007b).

Abbildung 1: Onkogenetisches Baummodell der zytogenetischen Entwicklung von Meningeomen nach Ketter et al. (KETTER et al., 2007b);

„Baumscheitelpunkte“ bedeuten einen Verlust des jeweiligen Chromosoms; die Beschriftungen der „Kanten“ demonstrieren die bedingten Wahrscheinlichkeiten (erste Reihe), die 95 % Konfidenzintervalle (zweite Reihe) und die Anzahl, wie oft die „Kante“ in 1000 Bäumen angezeigt wurde (Bootstrapping-Verfahren).

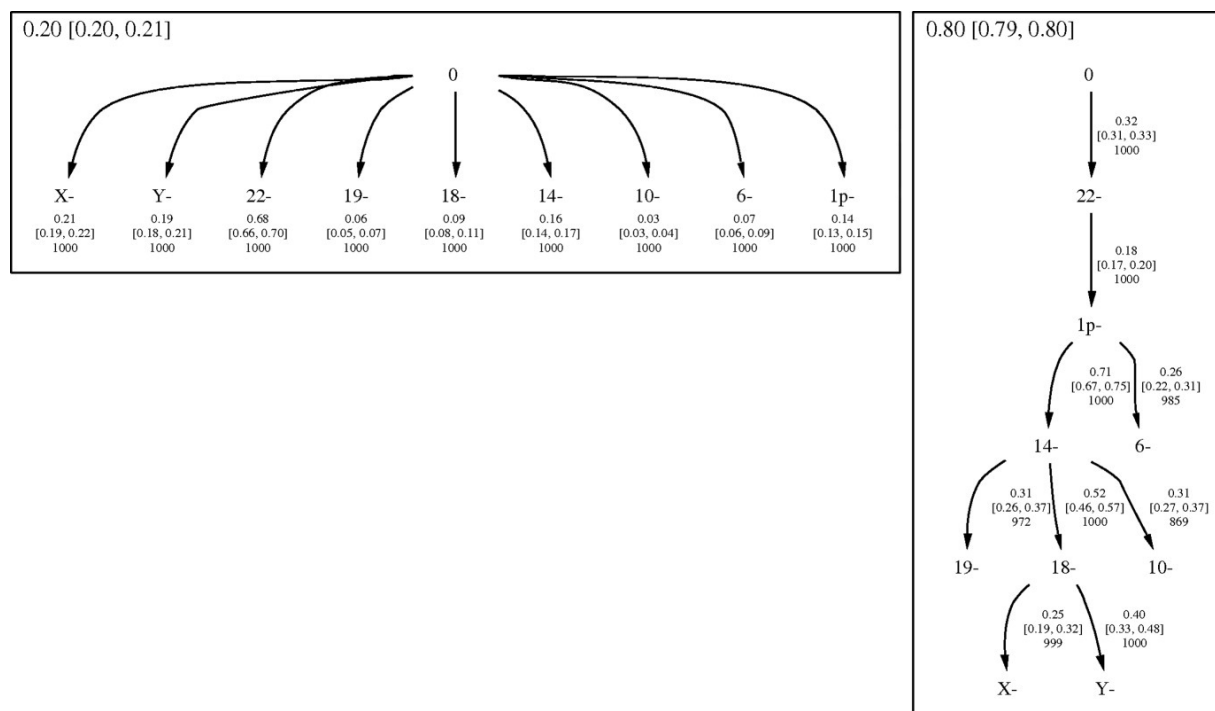
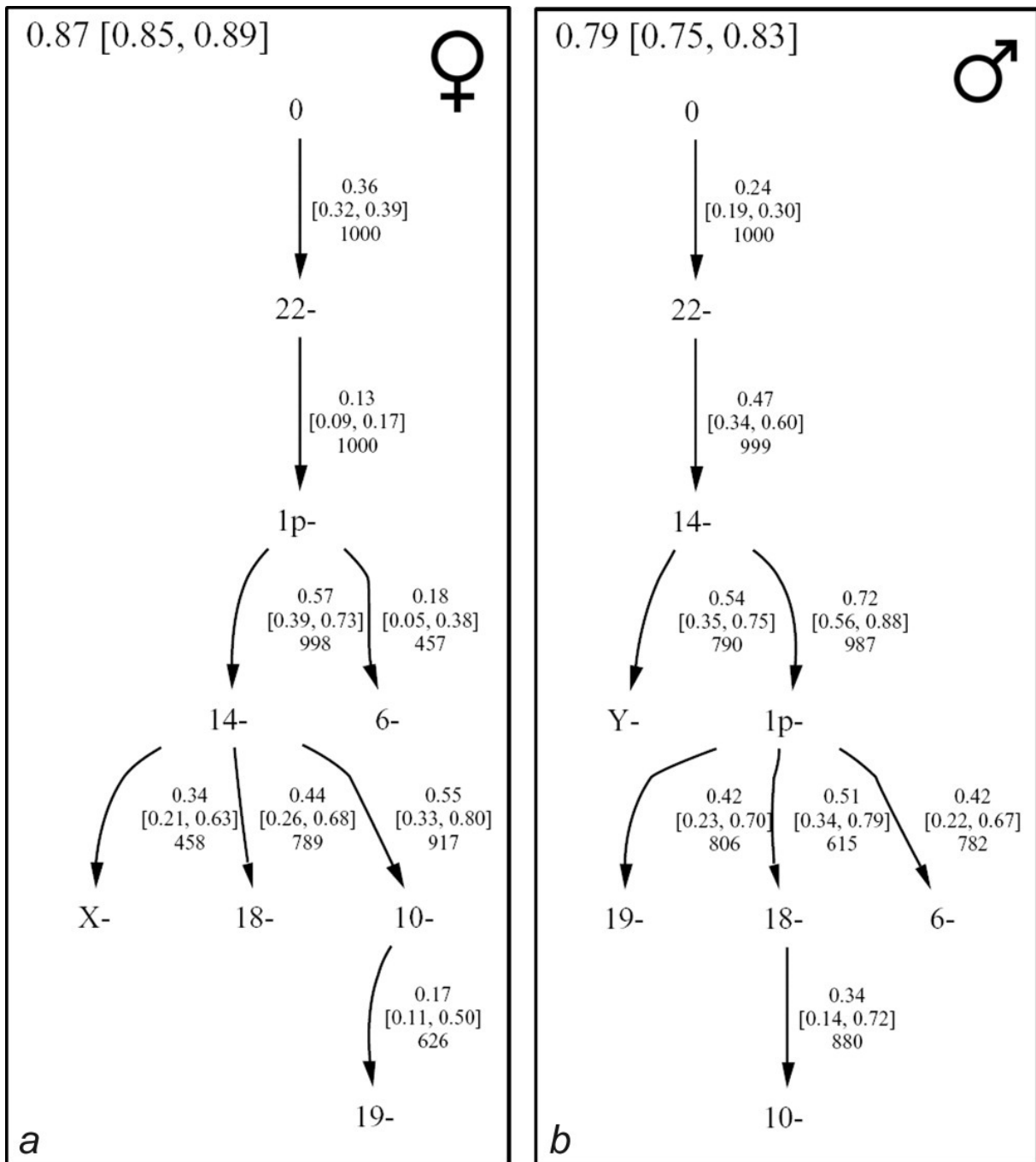


Abbildung 2: Onkogenetisches Baummodell der zytogenetischen Entwicklung von Meningeomen nach Geschlecht nach Ketter et al. (♀: weiblich; ♂: männlich), (KETTER et al., 2007b);

„Baumscheitelpunkte“ bedeuten einen Verlust des jeweiligen Chromosoms; die Beschriftungen der „Kanten“ demonstrieren die bedingten Wahrscheinlichkeiten (erste Reihe), die 95 % Konfidenzintervalle (zweite Reihe) und die Anzahl, wie oft die „Kante“ in 1000 Bäumen angezeigt wurde (Bootstrapping-Verfahren).



2.2.6.1.1 Chromosom 22

Das Meningeom war der erste solide Tumor, bei dem bereits im Jahr 1967 mit dem teilweisen oder vollständigen Verlust von Chromosom 22 eine chromosomale Deletion festgestellt wurde (ZANG, SINGER, 1967; ZANKL, ZANG, 1972). Die Monosomie 22 stellt die häufigste chromosomale Aberration in Meningeomen dar (ZANG, 1982). Diese hat jedoch keine prognostische Relevanz (KETTER et al., 2008). Bei etwa 60 % aller Meningeome kann man in allen oder in einem Teil der Tumorzellen eine Monosomie 22, also einen Verlust der Heterozygotie (LOH) dieses Chromosoms, nachweisen (MEESE et al., 1987).

In selteneren Fällen finden sich auch Deletionen des langen Arms des Chromosoms 22 (22q) (GALANI et al., 2017; MEESE et al., 1987).

Im Gegensatz dazu verfügen etwa 40 % aller Meningeome über einen normalen Karyotyp (MEESE et al., 1987).

Aberrationen des Chromosoms 22 finden sich typischerweise bereits in der frühen Phase der Entstehung von Meningeomen (GALANI et al., 2017).

Die Progression von Meningeomen ist in den meisten Fällen mit einem nicht zufälligen Verlust weiterer Chromosomen bzw. chromosomaler Abschnitte vergesellschaftet (KETTER et al., 2008). Deshalb wird eine Monosomie 22 auch als primäre Aberration bezeichnet (MÜLLER et al., 1999).

In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass der Verlust bestimmter Gene, die mit einer Deletion des Chromosoms 22 einhergehen, die Tumorneuentstehung fördern (YUZAWA et al., 2016).

Bereits 1987 konnte gezeigt werden, dass die bei der Neurofibromatose Typ 2 (NF2) typischen bilateralen Akustikusneurinome durch ein defektes Gen verursacht werden, das sich auf dem Chromosom 22 befindet (ROULEAU et al., 1987). Im Zusammenhang mit dem gehäuften Auftreten von Meningeomen bei der Neurofibromatose Typ 2 konnte diesbezüglich auf das NF2 als Tumorsuppressorgen geschlossen werden (MEESE et al., 1987; PULST et al., 1993). Das NF2-Gen befindet sich auf der Genomlokalisierung 22q12 und kodiert für das Tumorsuppressorprotein Merlin (auch Neurofibromin 2 oder Schwannomin genannt) (PETRILLI, FERNANDEZ-VALLE, 2016; ROULEAU et al., 1993; TROFATTER et al., 1993). Dieses Protein wird im Falle einer biallelischen Inaktivierung des NF2-Gens nicht translatiert (PHAM et al., 2011). Ein Verlust von Merlin kommt bei etwa 50 % aller Meningeome vor, dies hat aber nur einen eingeschränkten prognostischen Wert (BUERKI et al., 2018). Ein Verlust des NF2-Gens spielt keine Rolle in der malignen Progression eines Meningeoms (CHOY et al., 2011).

Auch weitere Gene konnten mit der Entwicklung von Meningeomen assoziiert werden (YUZAWA et al., 2016). In diesem Zuge wurden Keimbahnmutationen von zwei Untereinheiten des SWI/SNF Chromatin Remodelling Komplexes, SMARCB1 und SMARCE1, in familiären Meningeomen detektiert (YUZAWA et al., 2016). Eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens SMARCB1 (Genomlokalisierung: 22q11.23) könnte bei multiplen familiären Meningeomen eine Rolle spielen

(CHRISTIAANS et al., 2011; YUZAWA et al., 2016). SMARCE1 ist auf Chromosom 17 lokalisiert (siehe Abschnitt 2.2.6.1.6).

Auch epigenetische Veränderungen, wie z.B. DNA-Methylierungen, können bei Meningeomen beobachtet werden (GALANI et al., 2017). Das auf dem Chromosom 22 lokalisierte Gen TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinases 3) (Genomlokalisierung: 22q12.3) hemmt Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), eine Gruppe von Peptidasen, die beim Abbau von extrazellulärer Matrix beteiligt sind (GALANI et al., 2017). Eine Hypermethylierung dieses Tumorsuppressorgens und eine damit verbundene geringer ausgeprägte Transkription konnte vermehrt in aggressiven, hochgradigen Meningeomen detektiert werden (GALANI et al., 2017). In WHO Grad I und II Meningeomen war die TIMP3 Methylierung signifikant geringer ausgeprägt als in WHO Grad III Meningeomen (BELLO et al., 2004).

2.2.6.1.2 Chromosom 1

In einer Chromosomenanalyse von 56 Meningeomen konnte eine Deletion des kurzen Arms des Chromosoms 1 (1p) bei 27 % der WHO Grad I Meningeome, bei 70 % der WHO Grad II Meningeome und bei 100 % der WHO Grad III Meningeome gefunden werden (MÜLLER et al., 1999).

Bereits 1995 beschrieben Simon et al. die entscheidende Rolle einer 1p Deletion bei der Entwicklung vom benignen Meningeom zum aggressiveren atypischen bzw. anaplastischen Meningeom (SIMON et al., 1995).

Ketter et al. stellten sekundäre Chromosomenveränderungen im weiteren zeitlichen Verlauf nach dem Verlust des Chromosoms 22 dar (KETTER et al., 2008). Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Verlust des kurzen Arms des Chromosoms 1 am häufigsten ist (KETTER et al., 2008; KETTER et al., 2007b; MÜLLER et al., 1999).

Eine 1p Deletion in der Meningeomzelle geht mit einer signifikant schlechteren Prognose als andere chromosomale Deletionen und einer Rezidivrate von 30 % einher (KETTER et al., 2008; KETTER et al., 2007b; LINSLER et al., 2014; MÜLLER et al., 1999). Dieses signifikant erhöhte Rezidivrisiko bezieht sich rein auf diesen genetischen Marker und ist unabhängig von der histologischen Klassifikation (KETTER et al., 2008). Eine 1p Deletion bei Meningeomen konnte neben einer erhöhten Glukosestoffwechselaktivität klinisch mit einem infiltrativen Wachstum des Tumors in das Gehirnparenchym in Verbindung gebracht werden (LINSLER et al., 2014; MÜLLER et al., 1999).

Bei Meningeomen konnte mit aufsteigendem WHO Grad ein Aktivitätsverlust der zytoplasmatischen alkalischen Phosphatase (ALPL) aufgezeigt werden. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase und dem Verlust von 1p detektiert werden. Somit ist ALPL, das auf dem Chromosomenabschnitt 1p36.12 kodiert wird, ein Markergen für eine 1p

Deletion. Es ist unklar, ob ALPL oder ein direkt benachbartes, noch unbekanntes Gen, als Tumorsuppressorgen fungiert (NIEDERMAYER et al., 1997). Die Expression der ALPL zeigte sich in Meningeomen der WHO Grade II und III verändert und der Verlust der ALPL konnte mit auftretenden Rezidiven korreliert werden (BOUVIER et al., 2005).

Darüber hinaus existieren auch Meningeomzellen, die auf dem Chromosom 1 eine Trisomie des langen Arms aufweisen (1q-Trisomie). Die diesbezügliche Häufigkeit steigt mit einer zunehmenden Malignität an. Somit kommt dieser chromosomalen Aberration ebenfalls eine negative prognostische Bedeutung zu (MÜLLER et al., 1999).

2.2.6.1.3 Chromosom 14

In dem von Ketter et al. entwickelten onkogenetischen Baummodell zur zytogenetischen Entwicklung und Progression von Meningeomen gehört auch die Monosomie 14 zu den sekundären Chromosomenveränderungen. In der zytogenetischen Evolution der Meningeome ist die Monosomie 14 bei Frauen ein später auftretendes Ereignis als eine 1p Deletion. Bei Männern hingegen treten diese beiden Ereignisse häufig in umgekehrter Reihenfolge auf (KETTER et al., 2007b).

Bei einer Monosomie 14 des Tumors liegt ein erhöhtes Risiko für die Progression eines Meningeoms WHO Grad I zu einem Meningeom WHO Grad II (LINSLER et al., 2014) vor. Auch das Risiko für ein früher auftretendes Rezidiv steigt in diesen Fällen signifikant (KETTER et al., 2007b).

Darüber hinaus existieren vorwiegend in atypischen und anaplastischen Meningeomen reine Verluste des langen Arms des Chromosoms 14 (14q Deletion) (YUZAWA et al., 2016).

Auf dem langen Arm des Chromosoms 14 befinden sich die Gene NDRG2 (N-Myc downstream-regulated gene 2) (Genomlokalisierung 14q11.2) und MEG3 (maternally expressed gene 3) (Genomlokalisierung 14q32) (YUZAWA et al., 2016). NDRG2 inhibiert die Proliferation, Invasion und das Metastasierungspotential von Tumoren und fungiert somit als Tumorsuppressorgen (MELOTTE et al., 2010). In WHO Grad III Meningeomen konnte eine deutlich geringere Expression von NDRG2 im Vergleich zu WHO Grad I Meningeomen gefunden werden (MELOTTE et al., 2010). MEG3 wird vom mütterlichen Allel exprimiert (BALIK et al., 2013). MEG 3 kodiert für eine nichtproteinkodierende RNA (ncRNA) und wird in einer Vielzahl von menschlichen Geweben exprimiert, wobei die höchste Expression im Gehirn zu detektieren ist (BALIK et al., 2013). In gesunden Arachnoidalzellen zeigt sich MEG3 stark exprimiert (GALANI et al., 2017). In der Mehrheit der von den Arachnoidalzellen abstammenden Meningeome ist die MEG3-RNA nicht exprimiert (GALANI et al., 2017). In höhergradigen Meningeomen findet sich häufig eine MEG3 Promotormethylierung (BALIK et al., 2013; GALANI et al., 2017). Somit kommt MEG3 aller Wahrscheinlichkeit nach eine bedeutende Rolle als Tumorsuppressorgen zu (BALIK et al., 2013). Ein

Verlust von MEG3 kann mit Zellproliferation, Mitogenese und Onkogenese assoziiert werden (GALANI et al., 2017).

In der Parasagittalregion und der Konvexität ist ein Auftreten von Meningeomen, die eine Monosomie 14 aufweisen, signifikant höher als an der Schädelbasis (9,1 % vs. 2,5 %) (KETTER et al., 2008).

2.2.6.1.4 Chromosom 9

Verluste des kurzen Arms des Chromosoms 9 (9p-Deletion) werden häufiger in malignen Meningeomen als in atypischen oder benignen Formen detektiert (LAMSZUS, 2004). Entsprechende Veränderungen findet man in 5 % der WHO Grad I, 18 % der WHO Grad II und 38 % der WHO Grad III Tumore (CHOY et al., 2011).

Auf dem Chromosomenabschnitt 9p21 sind drei wichtige Tumorsuppressorgene lokalisiert. Dies sind p14^{ARF} (kodiert für p 14), CDKN2B/p15^{ARF} (kodiert für p 15) und CDKN2A/p16^{INKa} (kodiert für p 16). P14 ist ein Tumorsuppressorprotein, das den p53 Signalweg und damit die zelluläre Apoptose moduliert. P 15 und P 16 kontrollieren im Zellzyklus den Phasenübergang am G₁/S-Phase Checkpoint. Ein Verlust dieser drei Gene ist in WHO Grad I Meningeomen nicht detektierbar. Bei WHO Grad II Meningeomen tritt ein solcher Verlust in 3 % der Fälle auf und bei WHO Grad III Meningeomen liegt der Verlust bei 38 % (CHOY et al., 2011).

Patienten, die an einem Meningeom des WHO Grads III erkrankt sind, zeigen in der Kohorte mit einem intakten CDKN2A-Gen ein deutlich längeres Überleben als jene mit inaktiviertem CDKN2A-Gen. Somit wird gezeigt, dass ein Verlust der Zellzyklusregulation am G₁/S-Phase Checkpoint mit einem aggressiven Tumorwachstum und einer malignen Progression in Verbindung gebracht werden kann (CHOY et al., 2011).

2.2.6.1.5 Chromosom 10

Auch Deletionen des Chromosoms 10 spielen eine Rolle bei der Progression von Meningeomen (CHOY et al., 2011). Die Auftretenswahrscheinlichkeit liegt hierbei für die Meningeome der WHO Grade I-III jeweils bei 5 % – 12 %, 29 % – 40 % und 40 % – 58 % (CHOY et al., 2011). Mit aufsteigendem WHO Grad steigt auch die Inzidenz der Verluste der Heterozygotie (LOH) (MIHAILA et al., 2003). Auf dem Genlocus 10q23.3 befindet sich das Tumorsuppressorgen PTEN (CHOY et al., 2011). Mutationen in diesem Gen zeigen sich in Meningeomen allerdings selten (CHOY et al., 2011). Ein Verlust der Heterozygotie im Bereich des langen Arms des Chromosoms 10 (10q) fand sich in 12 % der WHO Grad I Meningeome, in 27 % der WHO Grad II Meningeome und in 40 % der Meningeome des WHO Grads III (MIHAILA et al., 2003). Das führt zu dem Schluss, dass auch auf

dem Chromosomenarm 10q Kandidatengene lokalisiert sind, die mit der Progression eines Meningeoms in Verbindung gebracht werden können. Das Gen DMBT 1 (Genomlokalisierung: 10q26.11-26.12), das für das deleted in malignant brain tumors 1 protein kodiert und das Gen MXI 1 (Genomlokalisierung: 10q24-q25), welches für das MAX-interacting protein 1 kodiert, wurden diesbezüglich diskutiert. Allerdings konnten diesbezüglich in Meningeomen keine Mutationen identifiziert werden (CHOY et al., 2011).

2.2.6.1.6 Chromosom 17

Zugewinne auf der Chromosomenregion 17q sind mit einem aggressiveren Tumorverhalten (schnelles Tumorstadium, infiltrativer Charakter) und einer höheren Rezidivrate als bei Meningeomen mit normalem Karyotyp in Zusammenhang gebracht worden (HEMMER et al., 2019).

In einer Studie zu Rezidiven beim Meningeom zeigte sich, dass in primären Meningeomen auch Deletionen der Chromosomenregion 17q als potenzieller früher Marker für eine Progression oder ein Rezidiv angesehen werden können. Auf dem Chromosom 17 sind mehrere Tumorsuppressorgene lokalisiert (HEMMER et al., 2019).

Deletionen im Tumorsuppressorgen *TP53* (Genomlokalisierung 17p13.1) sind mit einer erhöhten Malignität und einer erhöhten Rezidivrate verbunden (HEMMER et al., 2019).

Ein Zusammenhang zwischen krankhaften Veränderungen im Tumorsuppressorgen *BRCA1* (Genomlokalisierung 17q21.31) und einer Progression von Meningeomen konnte nicht nachgewiesen werden (KIRSCH et al., 1997).

Wie bereits im Abschnitt 2.2.6.1.1: Chromosom 22 erwähnt, wurden Keimbahnmutationen von zwei Untereinheiten des SWI/SNF Chromatin Remodelling Komplexes, *SMARCB1* und *SMARCE1*, in familiären Meningeomen detektiert. Chromosomale Aberrationen, welche *SMARCE1* (Genomlokalisierung: 17q21.2) betreffen, stehen im Zusammenhang mit der Entstehung von familiären klarzelligen Meningeomen (WHO Grad II) und Meningeomen im Kindesalter (YUZAWA et al., 2016).

2.2.6.1.7 Chromosom 18

Verluste des Chromosoms 18 werden vor allem in atypischen und anaplastischen Meningeomen beobachtet. In benignen Meningeomen tritt diese Veränderung selten auf (CHOY et al., 2011). Ein entscheidendes Tumorsuppressorgen ist DAL-1, welches auf dem Chromosomenabschnitt 18p11.3 lokalisiert ist (GUTMANN et al., 2000). DAL-1 kodiert für ein Tumorsuppressorprotein der Familie 4.1. Proteine dieser Familie, zu der auch Merlin gehört (siehe Abschnitt 2.2.6.1.1), verknüpfen integrale Membranproteine mit dem Zytoskelett der Zelle. Ein Verlust der Heterozygotie (LOH) tritt in 60 % aller sporadischen Meningeome auf. Der Verlust von DAL-1 kann analog zu Merlin als frühes Ereignis in der Entstehung von Meningeomen angesehen werden (CHOY et al., 2011). Es gibt Hinweise darauf, dass der Verlust von DAL-1 als entscheidender Faktor für die Progression eines Meningeoms gewertet werden kann (NUNES et al., 2005).

2.2.6.2 Weitere genetische/epigenetische Veränderungen

Neben den progressionsabhängigen chromosomalen Veränderungen existieren weitere Faktoren, die nach einer komplett erfolgten Resektion das Rezidivverhalten von Meningeomen determinieren. In diesem Zusammenhang sind neben Mutationen des TERT Promotors auch spezifische Methylierungsmuster anzuführen (SAHM et al., 2016; SAHM et al., 2017). Durch das TERT Gen wird das Enzym Telomerase-Reverse-Transkriptase kodiert, das die Telomere von Tumorzellen verlängert und somit eine Apoptoseinduktion verhindert. Spezielle Mutationen in der TERT Promotorregion führen zu einer verstärkten Aktivität dieses Enzyms. Diese gelten als wichtiges Kriterium für die Vorhersage eines Meningeomrezidivs (SAHM et al., 2016).

Auch spezielle DNA-Methylierungsanalysen von Meningeomen können einen entscheidenden Beitrag in diesem Kontext leisten. Basierend auf sechs ausgewählten Methylierungsmustern lassen sich hinsichtlich des Rezidivverhaltens und des progressionsfreien Überlebens validere Aussagen treffen als auf Grundlage der WHO Klassifikation (SAHM et al., 2017).

2.3 MicroRNAs

2.3.1 Einführung in die Thematik der microRNAs

Nicht nur genetische, sondern auch epigenetische Faktoren haben einen maßgeblichen Einfluss auf den Verlauf von Tumorerkrankungen (DAWSON, KOUZARIDES, 2012).

Dies betrifft beispielsweise den Prozess der RNA-Interferenz (BARTEL, 2004; DAWSON, KOUZARIDES, 2012).

Bei der RNA-Interferenz heften sich kurze, nicht proteinkodierende RNA-Moleküle (silencing RNAs) an bereits transkribierte messenger-RNAs (mRNA) und hemmen posttranskriptionell die Genexpression (BARTEL, 2004; FIRE et al., 1998). Bei diesen silencing RNAs unterscheidet man zwei Klassen: microRNAs (microRNAs) und small interfering RNAs (siRNAs) (BARTEL, 2004). Zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist die Kategorie der microRNAs, die eine Gruppe nicht proteinkodierender RNAs mit einer Länge von etwa 19-25 Nukleotiden darstellen (WERNER et al., 2017).

RNA-Interferenz ist ein Prozess, durch den die Expression eines Zielgens oder einer Reihe von Zielgenen mit hoher Spezifität und Selektivität verringert oder gestoppt werden kann (RAO et al., 2013).

Dies trifft sowohl auf gesundes Gewebe als auch auf zelluläre Signalwege von Tumoren zu, bei denen Proliferation, Invasion, Migration, Apoptose und der epithelial-mesenchymale Übergang (EMT) reguliert werden (WERNER et al., 2017).

MicroRNAs und ihre assoziierten Proteine (siehe Abschnitt 2.3.4) gehören zu den häufigsten Ribonukleoprotein-Komplexen der Zelle (BARTEL, 2004).

2.3.2 Entdeckung der microRNAs

Das Phänomen kurzer, nicht proteinkodierender RNAs wurde erstmals 1993 beschrieben, wobei der Begriff microRNA erst später geprägt wurde. Die diesbezüglich erste Beschreibung war die Identifizierung des Gens *lin-4* im Nematoden *Caenorhabditis elegans*, welches einen Einfluss auf das Larvenwachstum hat. Dieses Gen kodiert nicht für ein Protein, sondern für zwei RNAs mit der jeweiligen Länge von 22 bzw. 61 Nukleotiden. Beide dieser RNAs verfügen über komplementäre Sequenzen zur 3' untranslatierten Region (3' UTR) der *lin-14* mRNA. Es fiel auf, dass die längere RNA eine Stamm-Schleifen Struktur aufwies, was im Sinne einer Vorläuferversion der kurzen RNA interpretiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die komplementären Sequenzen für die Regulation der *lin-14* mRNA durch *lin-4* von Bedeutung waren. Dies basierte auf der Erkenntnis, dass in dieser Konstellation das *lin-14* Protein reduziert vorlag, ohne dass die Menge an *lin-14* mRNA abnahm

(BARTEL, 2004; LEE et al., 1993). Lin-14 hat eine regulatorische Funktion in der Entwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (LEE et al., 1993).

Das Phänomen einer nicht proteinkodierenden RNA schien für die kommenden Jahre auf lin-4 beschränkt zu sein und konnte außerhalb von Nematoden nicht bestätigt werden (BARTEL, 2004). Erst im Jahr 2000 wurde die 22 Nukleotide lange, nicht proteinkodierende RNA let-7d detektiert, die posttranskriptionell lin-41 reguliert. Auch let-7d hat einen regulierenden Einfluss in der Entwicklung von *Caenorhabditis elegans* im Larvenstadium (BARTEL, 2004; SLACK et al., 2000). Bei let-7d und lin-41 handelt es sich, wie bei den meisten Genen von microRNAs, um evolutionär konservierte Formen (BARTEL, 2004).

Im weiteren Verlauf wurde eine Vielzahl von microRNAs in *Caenorhabditis elegans*, Insekten und auch in Säugetieren bis hin zum Menschen entdeckt (BARTEL, 2004). Die Rolle von microRNAs bei Krankheiten konnte in der diesbezüglich ersten Studie 2002 bei der chronisch lymphatischen B-Zell Leukämie (B-CLL) detektiert werden (CALIN et al., 2002). Hier wurde gezeigt, dass die microRNAs 15 und 16 auf dem Chromosomenabschnitt 13q14 lokalisiert sind, der bei der B-CLL in über 50 % der Fälle deletiert ist (BARTEL, 2004). Ein mono- oder biallelischer Verlust von 13q14 konnte mit der Herunterregulation der microRNAs 15 und 16 korreliert werden. Hierbei wurde erstmals über eine Rolle von microRNAs als Tumorsuppressoren spekuliert (CALIN et al., 2002).

Der Begriff microRNA wurde eingeführt, um die small temporal RNAs (stRNAs), welche einen regulierenden Einfluss in Nematoden haben und andere kurze RNAs mit ähnlichen Merkmalen, aber unbekannt Funktionen, zu bezeichnen (BARTEL, 2004).

Um die ständig wachsende Anzahl von neu entdeckten microRNAs zu katalogisieren, existieren Datenbanken wie z.B. „miRBase“ (GRIFFITHS-JONES et al., 2006).

2.3.3 Nomenklatur der microRNAs

Die Nomenklatur von microRNAs beginnt mit einem Präfix, welches drei oder vier Buchstaben lang ist, um die Spezies zu kennzeichnen, in der die jeweilige microRNA exprimiert wird. Beim Menschen (*homo sapiens*) lautet das Präfix „hsa“. Im Anschluss folgt die Abkürzung „miR“ für die jeweils reife microRNA und „mir“ für die Vorläufersequenz, welche über eine Haarnadelstruktur verfügt (GRIFFITHS-JONES et al., 2006).

Die Nummer der microRNA basiert auf der zeitlichen Reihenfolge der Entdeckung. Wenn reife microRNAs sich lediglich an einer oder zwei Positionen in der Sequenz unterscheiden, erfolgt die Nomenklatur durch mit Buchstaben versehene Suffixe (z.B. hsa-miR-200a und hsa-miR-200b). Für den Fall, dass unterschiedliche Vorläufersequenzen identische reife microRNAs exprimieren, erhalten diese mit Zahlen versehene Suffixe (z.B. hsa-miR-121-1 und hsa-miR-121-2). Es existieren zwei reife Formen aus den jeweils gegenüberliegenden Armen der Vorläufersequenz (GRIFFITHS-

JONES et al., 2006). Die biologisch aktive microRNA wird als Hauptprodukt nicht weiter bezeichnet. Die inaktive Form der microRNA wird mit einem Stern gekennzeichnet (z.B. hsa-miR-21 und hsa-miR-21*) (BARTEL, 2004). Wenn die biologisch aktive Form nicht identifiziert werden kann oder wenn eine genauere Spezifizierung erwünscht ist, ist es möglich, der microRNA die Bezeichnung „3p“ und „5p“ anzuhängen, je nachdem von welchem Arm der Vorläufersequenz diese stammt (GRIFFITHS-JONES et al., 2006).

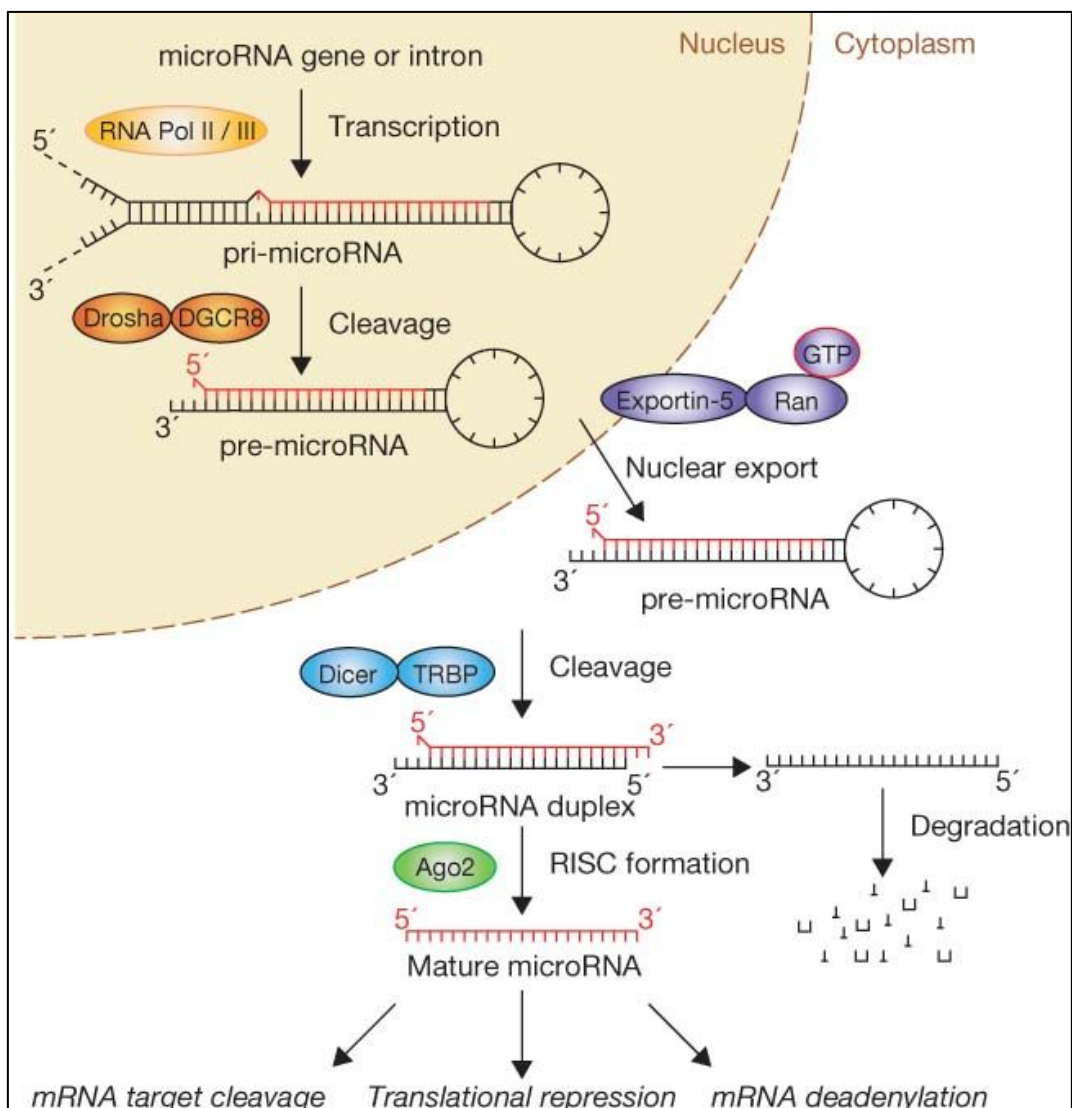
2.3.4 Biogenese und Funktion der microRNAs beim Menschen

Die überwiegende Anzahl der microRNA Gene stammt von unabhängigen Transkriptionseinheiten, welche mehrheitlich deutlich von den Genen entfernt liegen, auf die sie einen regulierenden Einfluss haben. Nur ein geringer Teil der menschlichen microRNA Gene (etwa 25 %) ist auf den Introns der zu regulierenden messenger-RNA Gene kodiert (BARTEL, 2004).

Während die Mehrzahl der menschlichen microRNA Gene isoliert im Genom vorliegt, sind Gene miteinander verwandter microRNAs gelegentlich in einem Gencluster angeordnet (BARTEL, 2004; LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LAU et al., 2001).

Abbildung 3: Die Biogenese der microRNA (WINTER et al., 2009);

(AGO2: Argonautenprotein 2; DGCR8: DiGeorge critical region 8; GTP: Guanosintriophosphat; Ran: Ras-related nuclear protein; RNA Pol II/III: RNA-Polymerase II oder III; TRBP: transactivating response RNA-binding protein)



Bei der Biogenese (siehe Abbildung 3) wird in einem ersten Schritt die pri-microRNA (primary microRNA, primäre microRNA) durch die RNA-Polymerase II oder III im Nukleus transkribiert (YATES et al., 2013). Diese pri-microRNA kann bis zu mehreren Kilobasen lang sein und verfügt über einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende sowie eine 7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende (OLENA, PATTON, 2010; YATES et al., 2013).

In einem nächsten Schritt wird die pri-microRNA, die eine Haarnadelstruktur aufweist, durch einen nukleären Komplex zu einem weiteren microRNA Transkript, der pre-microRNA (precursor microRNA) verarbeitet (YATES et al., 2013).

Der diesen Schritt ausführende Mikroprozessorkomplex besteht aus einem der RNase III ähnlichen Enzym, der Endonuklease Drosha und einem doppelsträngigen RNA-bindenden Protein (dsRBP), dem Cofaktor DGCR8 (DiGeorge critical region 8, entspricht Pasha bei Fliegen und Nematoden) (OLENA, PATTON, 2010; YATES et al., 2013).

DGCR8 interagiert mit der Nuklease Drosha und dirigiert diese zur pri-microRNA, wo 11 Basenpaare entfernt von der Basis der Haarnadelstruktur eine endonukleolytische Reaktion vollzogen wird.

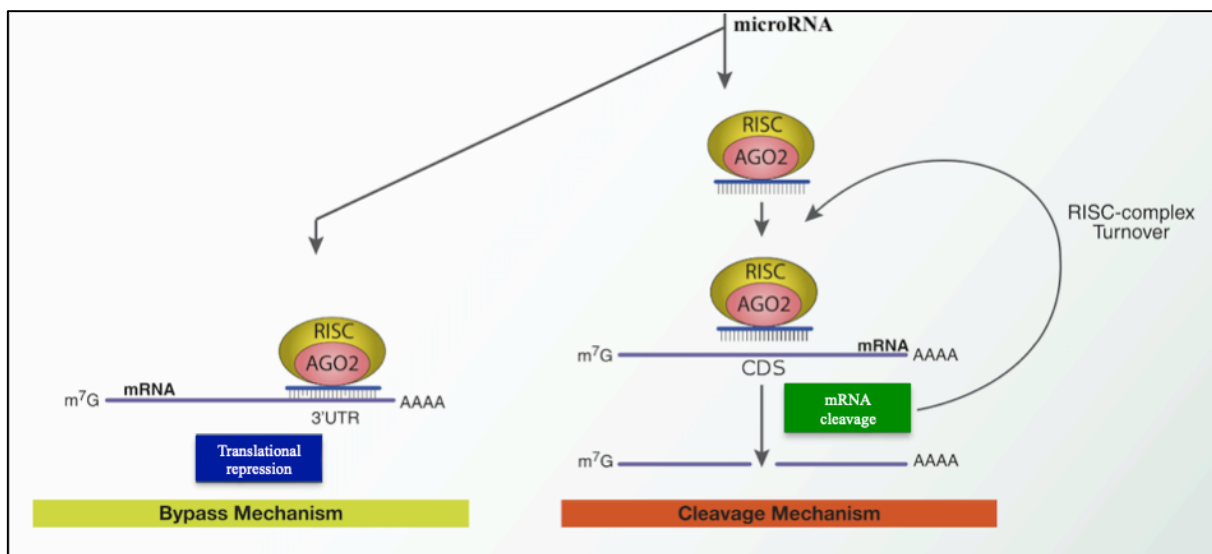
DGCR8 hat hierbei die Funktion eines „molekularen Lineals“. Somit wird der etwa 70 Nukleotide lange Strang der pre-microRNA erzeugt, der oftmals noch über einen 5'Phosphatrest verfügt und einen Überhang von 2 Nukleotiden am 3'Ende im Vergleich zum 5'Ende aufweist (BARTEL, 2004; YATES et al., 2013). Dies liegt daran, dass Drosha die beiden Nukleotidstränge versetzt schneidet, was typisch für Endonukleasen der Klasse RNase III ist. Dieser Schnitt definiert das eine Ende der reifen microRNA (BARTEL, 2004).

Die pre-microRNA bildet als Sekundärstruktur charakteristische Stamm-Schleifen Strukturen (stem-loop structures) aus. Sie wird über eine definierte Länge des doppelsträngigen Stammes und des 3'Überhanges vom Transportprotein Exportin 5 erkannt und mithilfe von Ran-GTP aktiv ins Zytoplasma transportiert (BARTEL, 2004; DALMAY, 2008; OLENA, PATTON, 2010; WINTER et al., 2009). Die Sequenz oder Struktur der pre-microRNA spielt bei diesem Exportprozess keine Rolle (WINTER et al., 2009).

Im Zytoplasma wird in einem nächsten Schritt die pre-microRNA durch Dicer, einem weiteren RNase III ähnlichen Enzym, zu einem etwa 22 Nukleotide langen doppelsträngigen RNA Duplex prozessiert (LEE et al., 2003). Dabei erkennt dieses Multidomänprotein (1922 Aminosäuren beim Menschen) (YATES et al., 2013) die 5'Phosphatgruppe der pre-microRNA und spaltet diese 22 Nukleotide davon entfernt (PARK et al., 2011). Da Dicer auch zu der Klasse der RNase III gehört, wird auch hier der beschriebene Schnitt versetzt durchgeführt (YATES et al., 2013). Dicer agiert zu diesem Zweck mit dem Protein TRBP (transactivating response RNA-binding protein), das über die Eigenschaft verfügt doppelsträngige RNA zu binden (WINTER et al., 2009)

Bei dem gebildeten RNA Duplex entsteht somit an jedem 3' Ende ein Überhang von jeweils zwei Nukleotiden (WINTER et al., 2009). Diese doppelsträngigen Moleküle werden im weiteren Verlauf in einen Ribonukleoproteinkomplex integriert, der in diesem Fall als RNA-induzierter Silencing-Komplex (RISC) bekannt ist (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: RNA-Interferenz durch microRNA mittels RISC (modifiziert nach Cojocari) (COJOCARI, 2010); (AAAA: Poly-A-Schwanz; AGO2: Argonautenprotein 2; CDS: coding DNA sequence (kodierende Region eines Gens); m⁷G: 7-Methylguanodin; 3'UTR: 3' untranslatierte Region)



Einen wichtigen Bestandteil des RISC stellen Argonautenproteine dar (BARTEL, 2004). Diese Familie von regulatorischen Proteinen spielt eine wesentliche Rolle in der posttranskriptionellen Regulation, in der Biogenese und der Funktion von microRNAs (WINTER et al., 2009).

Der RNA Duplex verbindet sich nun mit einem Argonautenprotein, wobei in Folge der Strang, der komplementär zu der Ziel-mRNA ist (Leitstrang), ausgewählt wird (YATES et al., 2013). Beim Menschen enthält der microRNA Ribonukleoprotein-Komplex (miRNP) neben dem Argonautenprotein Homolog eIF2C2 auch die Helicasen Gemin 3 und Gemin 4 (BARTEL, 2004). Die biologische Funktion des Leitstranges ist die Anheftung an die jeweilige mRNA. Der verbleibende Strang (Passagierstrang) wird abgebaut (YATES et al., 2013). Die molekulare Auswahl des Leitstranges basiert auf der relativen Stabilität der Enden des RNA Duplexes. Der ausgewählte Leitstrang ist in den meisten Fällen der, dessen 5' Ende weniger stabil an den komplementären Passagierstrang gebunden ist. Aus diesem Grund tastet ein Helicase-ähnliches Enzym die Enden des Duplexes mehrfach ab, bevor mit der Entwindung der komplementären Stränge begonnen wird (BARTEL, 2004).

Bei bestimmten Genen kommt es zu der Konstellation, dass beide Stränge des RNA Duplexes vergleichbar akkumulieren, was darauf schließen lässt, dass beide eine biologische Funktion besitzen. Die jeweiligen Enden dieser microRNA Duplexe sind hierbei von ähnlicher Stabilität. In diesem Fall wählt das Helicase-ähnliche Enzym bei jedem gebildeten RISC jeweils nur einen der beiden Stränge aus. Dies erfolgt jedoch in beiden Fällen mit einer ähnlichen Häufigkeit (BARTEL, 2004).

Der im RISC enthaltene microRNA Leitstrang bindet an die 3'untranslatierte Region (UTR) der mRNA (YATES et al., 2013) und verhindert die Translation oder führt durch Deadenylierung der mRNA zu deren Abbau. Dies geschieht maßgeblich durch die Funktion der Argonautenproteine, denen eine zentrale Rolle in der mRNA degradierenden Funktion des RISC zukommt (PILLAI et al., 2007).

Der Grad der microRNA/mRNA Komplementarität gilt als zentraler Regulationsfaktor der mRNA (YATES et al., 2013). Je nach Grad der Komplementarität wird die Translation der mRNA verhindert (translational repression; siehe Abbildung 4) oder diese komplett gespalten und abgebaut (mRNA cleavage; siehe Abbildung 4) (OLENA, PATTON, 2010). Im Menschen existieren acht verschiedene Argonautenproteine, von denen vier (Ago 1 - Ago 4) in vielen Zelltypen koexprimiert sind (MEISTER et al., 2004; SASAKI et al., 2003). Obwohl alle Argonautenproteine (Ago 1-Ago 4) an die microRNAs binden, kann nur Ago 2 die endonukleolytische Spaltung der Ziel-mRNA steuern. Argonautenproteine verfügen über zwei charakteristische Proteindomänen, die PAZ und die PIWI Domäne (MEISTER et al., 2004). PAZ Domänen (nach den Proteinen Piwi, Argonaut und Zwillie benannt, in denen diese Domäne zuerst entdeckt wurde) verfügen über eine niedrigaffine Nukleinbindungsstelle und interagieren mit dem 3'Ende von einzelsträngigen RNA-Regionen, wie den microRNAs (BARTEL, 2004; SONG et al., 2003).

Die PIWI (P-element induced wimpy testis) Domäne ist nur in Argonautenproteinen zu finden (SONG et al., 2003). Das 5'Phosphatende der microRNA wird an die PIWI Domäne gebunden, welche eine Ribonuklease H (RNase H) ähnliche Faltung hat (MA et al., 2005; OZATA et al., 2019). Ribonukleasen H sind Enzyme, die im zellulären Stoffwechsel bei der im Rahmen von Reparatur und Replikation gebildeten RNA/DNA Hybriden die RNA hydrolysieren (CERRITELLI, CROUCH, 2009).

Somit katalysiert das Argonautenprotein die endonukleolytische Spaltung der zur microRNA komplementären mRNA. Dies geschieht unter dem Einsatz von 5'-3'- Exonukleasen (PILLAI et al., 2007).

2.3.5 MicroRNAs bei Tumorerkrankungen

Maligne Tumorerkrankungen gehören zu den schwersten Krankheiten überhaupt. Der Entstehung von Tumorzellen liegt eine multikausale Ätiologie zugrunde, wobei die exakten molekularen Mechanismen noch nicht genau geklärt sind. Das Expressionsprofil von Genen ist in verschiedenen Geweben unterschiedlich und ändert sich während der Onkogenese deutlich. Bei Tumorerkrankungen betrifft das insbesondere die Tumorsuppressorgene und Onkogene. Da microRNAs steuernd auf die Genexpression wirken können, kommt ihnen eine zentrale Rolle in der Regulation dieser beiden Gentyphen zu. Obwohl die konkreten Funktionen von microRNAs bei Tumorerkrankungen noch nicht ausreichend erforscht sind, konnte bei einer Vielzahl von Studien eine entsprechende Hoch- bzw. Herunterregulierung im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen werden (DALMAY, 2008). Auch eine fehlerhafte Regulation oder Biogenese bestimmter microRNAs kann zu einer Onkogenese beitragen (EL-GEWELY et al., 2016).

Mögliche Ansätze einer diesbezüglichen Therapie sind die Blockierung onkogener microRNAs oder die Überexpression von microRNAs mit Tumorsuppressoraktivität (DALMAY, 2008).

Der Zusammenhang zwischen Malignomen und microRNAs konnte im Jahr 2002 erstmals bei der chronisch lymphatischen B-Zell Leukämie (B-CLL) detektiert werden (CALIN et al., 2002).

Bis dato konnten deregulierte microRNAs bei vielen verschiedenen Malignomen, wie z.B. Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Cervixkarzinom und Bronchialkarzinom gefunden werden (ESQUELA-KERSCHER, SLACK, 2006; IORIO et al., 2005).

Eine besondere Rolle bei aktuellen Forschungen spielen microRNAs als mögliche diagnostische Marker bei Tumorerkrankungen (MONTANI, BIANCHI, 2016). MicroRNAs können aus vielen biologischen Geweben und Flüssigkeiten isoliert werden, darunter auch aus Blut (CHEN et al., 2008). Über 50 % der bisher bekannten microRNA Gene sind auf chromosomalen Regionen lokalisiert, die „fragile sites“ beinhalten (ESQUELA-KERSCHER, SLACK, 2006). Dies bezeichnet Abschnitte, die eine Anfälligkeit für chromosomale Brüche, Deletionen, Amplifikationen oder Fusionen aufweisen (ESQUELA-KERSCHER, SLACK, 2006; IORIO et al., 2005). Diese Chromosomenabschnitte sind bei Malignomen oftmals genetisch verändert (IORIO et al., 2005). Auch ein Verlust der Heterozygotie (LOH) spielt hierbei oftmals eine Rolle (ESQUELA-KERSCHER, SLACK, 2006).

Aus diesen Gründen sind die „oncomirs“, microRNAs welche mit Tumorerkrankungen assoziiert werden können, ein zunehmendes Thema in der Molekularbiologie. Dort spielen sie eine Rolle als onkogene und tumorsuppressive microRNAs. MicroRNAs haben einen regulierenden Einfluss auf Parameter wie das Zellwachstum und die Gewebedifferenzierung. Bei einer nichtphysiologischen microRNA Expression kann es zu für Tumore charakteristischen Störungen im Zellzyklus und der terminalen Zelldifferenzierung kommen. Im gesunden Zustand führt die physiologische Transkription, Prozessierung und Bindung von microRNAs an die jeweiligen Ziel-mRNAs zu einer präzisen regulatorischen Unterdrückung der Zielgentranslation. Das Ergebnis ist ein adäquates Verhältnis

zwischen Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Die Reduktion einer microRNA, die als Tumorsuppressor fungiert, führt somit zu einer übermäßigen Expression von Onkoproteinen. Dies resultiert in einer erhöhten Zellproliferation und einer verminderten Apoptoserate. Darüber hinaus kommt es zu einer verstärkten Invasivität bzw. Angiogenese sowie zu einer Vermehrung von un- oder entdifferenziertem Gewebe und somit zur Onkogenese. Auch das Gegenteil, eine Überexpression onkogener microRNAs, führt zu einer Tumorneubildung (ESQUELA-KERSCHER, SLACK, 2006).

Basierend auf den obigen Erkenntnissen könnten microRNAs zukünftig in der Onkologie sowohl diagnostische Hinweise geben als auch therapeutisch in Form von Gentherapien eingesetzt werden (ESQUELA-KERSCHER, SLACK, 2006).

2.3.6 MicroRNAs beim Meningeom

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass im soliden Meningeom verschiedene microRNAs im Vergleich zu gesundem Arachnoidalzellgewebe hoch- bzw. herunterreguliert sind (LUDWIG et al., 2015).

Die folgenden microRNAs sind auf Chromosomenabschnitten kodiert, welche für das Rezidivverhalten von Meningeomen eine entscheidende Rolle spielen (HEMMER et al., 2019; KETTER et al., 2007b).

Beim soliden Meningeom konnte die Hochregulierung der microRNA 21 detektiert werden (GALANI et al., 2017; KATAR et al., 2017). Des Weiteren fand sich im Blutserum eine erhöhte Expression der microRNA 409-3p im Vergleich zu gesunden Probanden (ZHI et al., 2016).

Darüber hinaus ist feststellbar, dass Meningeome der WHO Grade II und III eine signifikant höhere Expression der microRNA 21 aufweisen als Tumore des WHO Grads I (KATAR et al., 2017). Dies bedeutet einen Anstieg der microRNA 21 mit aufsteigendem histopathologischen Grad (GALANI et al., 2017; KATAR et al., 2017). Die microRNA 21 kann als Transkript eines Onkogens fungieren und bei erhöhter Expression zum Tumorwachstum beitragen (GALANI et al., 2017). Das entsprechende Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (Genomlokalisierung: 17q23.1) lokalisiert. Zugewinne der Chromosomenregion 17q können mit einem schnelleren, infiltrativeren Tumorwachstum und einer erhöhten Rezidivrate assoziiert werden im Vergleich zu Tumoren mit normalem Karyotyp. Allerdings sind bei Meningeomrezidiven auch Deletionen in der 17q-Chromosomenregion häufig detektierbar (HEMMER et al., 2019).

Zhi et al. konnten in einer Serumanalyse nachweisen, dass eine hohe Expression der microRNA 409-3p mit einer erhöhten Rate an Rezidiven korreliert. Des Weiteren zeigte sich in präoperativ entnommenen Serumproben von Meningeompatienten die microRNA 409-3p im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten signifikant hochreguliert (ZHI et al., 2016). Das Gen dieser microRNA ist

auf dem Chromosom 14 (Genomlokalisierung: 14q32.31) lokalisiert. Bei einer Monosomie 14 des Tumors liegt ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Meningeoms WHO Grad I zu einem Meningeom WHO Grad II vor (LINSLER et al., 2014).

Im soliden Meningeom konnte eine Herunterregulation der microRNA 34a-3p (LUDWIG et al., 2015; WERNER et al., 2017) beobachtet werden. Je höher der histopathologische Grad ist, desto niedriger ist die Expression der microRNA 34a-3p (LUDWIG et al., 2015; WERNER et al., 2017). In einem Experiment konnte gezeigt werden, dass erhöhte Spiegel der microRNA 34a-3p zu einer verminderten Meningeomzellproliferation in vitro führen (WERNER et al., 2017).

Auch die microRNA 200a (GALANI et al., 2017; SAYDAM et al., 2009) ist beim Meningeom im Vergleich zu gesundem Arachnoidalzellgewebe herunterreguliert.

Die microRNA 200a fungiert über einen Signalweg als Tumorsuppressor und ist in Meningeomen stark reduziert. Es konnte gezeigt werden, dass artifiziell erhöhte Spiegel der microRNA 200a das Tumorwachstum von Meningeomzellen in einem Xenograft-Tumormodell in vitro und in vivo hemmen. Eine Herunterregulierung der microRNA 200a in Meningeomzellen erhöht die Expression von β -Catenin und Cyclin D1, die bei der Zellproliferation mitwirken. Diesbezüglich existiert eine direkte Korrelation. Die microRNA 200a hemmt direkt die Translation der β -Catenin-mRNA sowie den Wnt/ β -Catenin Signalweg, der häufig bei Tumorerkrankungen eine Rolle spielt (SAYDAM et al., 2009). Die Gene der microRNAs 34a-3p und 200a sind auf dem Chromosomenabschnitt 1p (Genomlokalisierung: 34a-3p:1p36.22; 200a:1p36.33) lokalisiert, wobei der Verlust von 1p ein wichtiger genetischer Prognosemarker bei Meningeomen darstellt (KETTER et al., 2008; KETTER et al., 2007b; LINSLER et al., 2014).

2.4 Fragestellung

Chromosomale Veränderungen spielen eine entscheidende Rolle bei der Progression und dem Rezidivverhalten von Meningeomen (vgl. Abschnitt 2.2.6).

In dem onkogenetischen Baummodell von Ketter et al. (siehe Abschnitt 2.2.6) wird aufgezeigt, dass die Progression von Meningeomen mit einem nicht zufälligen Verlust von Chromosomen bzw. chromosomalen Abschnitten vergesellschaftet ist (KETTER et al., 2008).

In mehreren wissenschaftlichen Arbeiten konnte die Hochregulierung der microRNA 21 im soliden Meningeom nachgewiesen werden (GALANI et al., 2017; KATAR et al., 2017). Weiterhin wurde eine Erhöhung der Expression der microRNA 409 im Serum von Meningeompatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden detektiert (ZHI et al., 2016). Darüber hinaus zeigten sich die microRNA 34a und die microRNA 200a im soliden Meningeom herunterreguliert (GALANI et al., 2017; SAYDAM et al., 2009; WERNER et al., 2017). Diese vier microRNAs sind auf Chromosomenabschnitten lokalisiert, welche progressionsabhängig typische Aberrationen aufzeigen (siehe Abschnitt 2.2.6).

Primäres Ziel der Promotionsarbeit ist es herauszufinden, ob die Expressionsmuster dieser vier microRNAs auch mit dem Rezidivverhalten von Meningeomen in Verbindung gebracht werden können. Bezüglich des soliden Tumors gibt es bisher noch kaum Erkenntnisse hinsichtlich der Expressionsmuster von microRNAs, auf deren Basis erstdiagnostizierte Tumore von Rezidiven unterschieden werden können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob die vier gewählten microRNAs nicht nur im soliden Tumor, sondern zeitgleich im Blut der Betroffenen analysierbar sind. Bisher wurde bei Meningeompatienten noch keine vergleichende microRNA Analyse zwischen Tumor und Blut mittels endogener Kontrolle durchgeführt.

Darüber hinaus ist es von Interesse, die gewählten microRNAs im soliden Tumor bzw. Blutplasma mit klinischen Parametern wie dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorgöße und der Lokalisation zu korrelieren.

Weiterhin geht dieses Projekt der grundlegenden Frage nach, ob sich die Expressionsprofile der vier gewählten microRNAs im Blut von Meningeompatienten von dem Blut gesunder Probanden unterscheiden. Wenn dies der Fall sein sollte, könnten sich durch eine Blutanalyse Hinweise auf das Vorliegen eines Meningeoms gewinnen lassen. Oftmals lässt sich präoperativ rein aus der radiologischen Diagnostik keine sichere Aussage über die Art bzw. Dignität eines Tumors treffen. Da bei intrakraniellen Tumoren eine Biopsie oftmals zu invasiv ist, bestünde in einer aussagekräftigen blutbasierten Diagnostik (liquid biopsy) ein erheblicher Vorteil.

Basierend auf den zu gewinnenden Ergebnissen gälte es zu sondieren, ob mittels Plasmaanalyse präoperativ oder operationsunabhängig eine therapierrelevante, differentialdiagnostische Markerbestimmung von Meningeomen möglich wäre.

Der Vergleich der Expressionsprofile der vier genannten microRNAs im Blut von Meningeompatienten einerseits mit den microRNAs ihrer Tumore und andererseits mit den microRNAs im Blut gesunder Probanden könnte dazu beitragen, tiefere Einsichten in die biologischen Mechanismen der Entstehung und des Wachstums von Meningeomen zu gewinnen.

In einem weiteren Schritt könnte herausgefunden werden, ob mithilfe bestimmter microRNAs auch eine prognostische Aussage bzgl. der Ausprägung eines Rezidivrisikos getroffen werden kann.

Als Grundlage der Analyse der Expressionsmuster der untersuchten microRNAs im soliden Meningeom werden sämtliche Meningeome mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Aberrationen der Chromosomen 1, 9, 10, 14, 18 und 22 untersucht (Durchführung durch wissenschaftliche Mitarbeiterinnen der Forschungsabteilung für experimentelle Neurochirurgie in jeweils eigenen Projekten).

Darauf aufbauend werden die Expressionsmuster der microRNAs mit den jeweiligen chromosomalen Aberrationsmustern verglichen und somit sowohl die epigenetische als auch die molekularzytogenetische Ebene analysiert.

3. Material und Methodik

Die praktischen Versuche der Promotionsarbeit wurden von Juni 2019 bis März 2021 in der Forschungsabteilung für experimentelle Neurochirurgie (Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat) der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Oertel) durchgeführt.

Das Projekt wurde von Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat und Prof. Dr. med. Ralf Ketter betreut.

Die 51 untersuchten Tumor- und Blutproben wurden eigens von Patienten geborgen, die zwischen Juni 2019 und August 2020 in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes an einem Meningeom (WHO Grad I-III) operiert wurden.

Basierend auf der Neuetablierung der RNU6B als endogene Kontrolle im Blutplasma (siehe Abschnitt 3.2.4.4.1) wurden 43 Tumor- und Blutproben in die Auswertung dieser Promotionsarbeit eingeschlossen. Darüber hinaus wurde das Blut von 20 gesunden Probanden dem Blut der untersuchten Patienten gegenübergestellt.

Die Lokalisations- und Volumenbestimmung der untersuchten Meningeome wurde auf Basis der präoperativ angefertigten bildgebenden Untersuchungen mittels Kernspintomographie bzw. Computertomographie durchgeführt.

Die histopathologische Diagnosesicherung der Meningeome erfolgte durch das Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer).

Für die vorliegende Promotionsarbeit wurde eigens ein Ethikantrag bei der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes eingereicht, der mit einem positiven Votum (Kenn-Nr.: 02/20) beschieden wurde.

Neben einer ausführlichen Aufklärung über das Forschungsvorhaben wurde von allen in der Studie eingeschlossenen Patienten und Probanden das schriftliche Einverständnis für die wissenschaftliche Analyse von Blut bzw. operativ entnommenem Tumorgewebe eingeholt. Voraussetzung für die Aufnahme in die Untersuchungsstichprobe war die Volljährigkeit der Patienten und Probanden.

Die Ergebnisse wurden mit der Statistik- und Analyse-Software IBM SPSS Statistics erstellt. Dies erfolgte nach einer statistischen Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes (Direktor: Univ.-Prof. Dr. oec. publ. Stefan Wagenpfeil).

3.1 Material- und Herstellernachweis

3.1.1 Material- und Herstellernachweis für die Durchführung der RNA-Isolation, der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und der Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Tabelle 3: Substanz- und Verbrauchsmaterialien

Substanz und Verbrauchsmaterialien	Firma
Chloroform	Fisher Scientific, Loughborough, United Kingdom
Dekontaminationslösung RNase AWAY®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
EDTA S-Monovette (4,9 ml)	ISG Intermed Service GmbH & Co. KG, Geesthacht
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Ethanol 100 %	SigmaAldrich, Steinheim
Falcon® Zentrifugenröhrchen 50 ml	Fisher Scientific by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mini-Reaktionsgefäß 200 µl	Simport Scientific, Saint-Mathieu-de-Beloeil, Québec, Canada
miRNeasy® Mini Kit - Auffanggefäß (2ml) - QIAzol Lysis-Reagenz - RNase freies Wasser - RNeasy® Mini Spin Columns (je mit 2 ml Auffanggefäß) - RPE-Puffer - RWT-Puffer	Qiagen, Hilden
miRNeasy® Serum/Plasma Kit - Auffanggefäß (2ml) - QIAzol Lysis-Reagenz - RNase freies Wasser - RNeasy® MinElute® Spin Columns (je mit 2 ml Auffanggefäß) - RPE-Puffer - RWT-Puffer	Qiagen, Hilden
nukleasefreies Wasser	Alfa Aesar by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipettenspitze 10 µl	Sorensen, BioScience, Inc. Salt Lake City, Utah, USA
Pipettenspitze Avant 200 µl	Midwest Scientific, Missouri, USA
Pipettenspitze 1000µl	SARSTEDT, Nümbrecht
Polypropylen Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Primer für Reverse-Transkriptase PCR (RT-Primer)	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Primer für Realtime-PCR (TM-Primer)	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RT-PCR Grade Water (PCR Wasser)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit - dNTP Mix - Reverse Transkriptase - RNase-Inhibitor - RT-Puffer	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
---	--

Tabelle 4: Geräte/Software und Herstellerfirmen

Gerät und Software	Bezeichnung	Herstellerfirma
Homogenisierer-Dispergierer	Art-Micra D-8	ART Labortechnik, Müllheim
Kühlzentrifuge	Eppendorf 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge	Sigma 3-16 PK	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Minizentrifuge	Galaxy MiniStar	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Minizentrifuge	Sprout	Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois, USA
Pipette 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Plattenvortexmischgerät	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA
Real-Time PCR Gerät	StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
Real-Time PCR Gerät Software	StepOne Software v2.3	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
Spectrophotometer	NanoDrop ND-1000 UV/Vis	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermocycler (Peltier Thermal Cycler)	MJ Research PTC-200	Marshall Scientific, Hampton, New Hampshire, USA
Vortexmischgerät	Heidolph REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Vortexmischgerät	IKA MS1 Minishaker	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Zentrifuge	MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg

3.1.2 Material- und Herstellernachweis für die Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Tabelle 5: Lösungen/Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
De Launey Fixativ	<ul style="list-style-type: none"> • 100 ml 99 % Ethanol (99%) (vergällt) • 100 ml Aceton • 0,1 ml 1-molare Trichloressigsäure
Ethanol (70%)	<ul style="list-style-type: none"> • 700 ml vergälltes Ethanol (99%) • 300 ml Aqua dest. (destilliertes Wasser)
Ethanol (80%)	<ul style="list-style-type: none"> • 800 ml vergälltes Ethanol (99%) • 200 ml Aqua dest.
Nährmedium	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 10 % FBS (fötale Kälberserum) • 1 % MEM NEAA (minimum essential medium non essential amino acid solution) • 1 % PenStrep (Penicillin-Streptomycin)
1xPBS (phosphate-buffered saline)	<ul style="list-style-type: none"> • 200 ml 5xPBS (phosphate-buffered saline) • 800 ml Aqua dest.
5xPBS	<ul style="list-style-type: none"> • 1,0 g KCl (Kaliumchlorid) • 1,0 g KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat) • 40,0 g NaCl (Natriumchlorid) • 8,9 g Na_2HPO_4 (Dinatriumhydrogenphosphat) → in 800 ml Aqua dest. lösen → Einstellen des pH-Wertes auf 7,0 (mit HCl bzw. NaOH) und Auffüllung auf 1l
4% PFA/1xPBS	<ul style="list-style-type: none"> • 4 g PFA (Paraformaldehyd) • 100 ml 1xPBS
Pepsin (10 %)	<ul style="list-style-type: none"> • 1 g Pepsin • 10 ml Aqua dest.
RNase A	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mg RNase A • 5 ml 2xSSC
2xSSC (citratgepufferte Standardsalzlösung)/ 0,05 % Tween20 (Polysorbat 20; nichtionisches Tensid)	<ul style="list-style-type: none"> • 100 ml 20xSSC • 900 ml Aqua dest. • 0,5 ml Tween 20
2xSSC	<ul style="list-style-type: none"> • 100 ml 20xSSC • 900 ml Aqua dest.
20xSSC	<ul style="list-style-type: none"> • 3,0 molar NaCl → 175,32 g • 0,3 molar Natriumcitrat → 88,23 g → in 800 ml Aqua dest. lösen → Einstellen des pH-Wertes auf 7,0 (mit HCl bzw. NaOH) und Auffüllung auf 1l

Tabelle 6: Chemikalien/Substanzen

Chemikalien/Substanzen	Hersteller
Aceton	VWR Chemicals, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Antifade Mounting Medium for Fluorescence + Antifade Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA
Aqua dest. (destilliertes Wasser); Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	GIBCO®, Life Technologies, Darmstadt
Ethanol (99%), (vergällt)	Universität des Saarlandes, Zentrale für Beschaffung und Dienste
FBS (fötales Kälberserum)	Sigma Aldrich, Steinheim
HCl (Salzsäure)	Merck KGaA, Darmstadt
Hybridisierungsmix mit je lokusspezifischer DNA-Sonde	MetaSystems GmbH, Altlußheim
KCl (Kaliumchlorid)	Merck KGaA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck KGaA, Darmstadt
MEM NEAA (minimum essential medium non essential amino acid solution)	GIBCO®, Life Technologies, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	VWR Chemicals, Leuven, Belgien
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
PBS (phosphate-buffered saline)	GIBCO®, Life Technologies, Darmstadt
PenStrep	GIBCO®, Life Technologies, Darmstadt
Pepsin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
PFA (Paraformaldehyd)	Merck KGaA, Darmstadt
RNase A	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Trichloressigsäure	VWR Chemicals, Leuven, Belgien
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Deckglas 18 x 18 mm; 24 x 60 mm		VWR Chemicals, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Reaktionsgefäß 1,5 ml		Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäß 1,5 ml, lichtgeschützt		Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Immersionsöl		Merck KGaA, Darmstadt
Montagekleber	Fixogum	Marabu GmbH & Co. KG, Tamm
Objektträger	SuperFrost® Plus Adhäsionsobjektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Objektträger	SuperFrost 76 x 26 mm, Mattrand	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Petrischale	Cellstar	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
pH-Meter	SevenEasy S20	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Pipettenspitzen 10 µl	OneTouch™ Ergo-Friendly tips	Sorensen, BioScience, Inc. Salt Lake City, Utah, USA
Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl		Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen

Tabelle 8: Geräte/Software und Herstellerfirmen

Geräte/ Software	Bezeichnung	Hersteller
(Thermo) Brutschrank	Jouan, EB55	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Fluoreszenzmikroskop (Auflichtmikroskop)	OLYMPUS, BX43	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Imaging Software	OLYMPUS, CellSens Dimension 1.9	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Lichtmikroskop	Primo Vert	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Mikroskop-Kamera	OLYMPUS, XC30	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mini-Tischzentrifuge		Labnet Inc., Edison, New Jersey, USA
Pipetten 10µl, 1000µl	Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten 100µl, 200µl		Gilson, Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Sterilbank	Heraeus LaminAir® HB 2448 K	Heraeus Instruments, Osterode
Vortexmischer	MS1 Minishaker	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad		GFL GmbH, Burgwendel

3.2 Methodik

3.2.1 Gewinnung von Plasma aus Vollblut

In einem ersten Schritt wurde unmittelbar präoperativ vor der Narkoseeinleitung des Patienten eigens für die dargestellte Untersuchung Vollblut in einem EDTA-Röhrchen (4,9 ml) abgenommen. Direkt anschließend wurde dieses für zehn Minuten in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C und einer Fallbeschleunigung von 1900 g zentrifugiert. Dann wurde je 1 ml des abpipettierten Plasmas auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei 4 °C und einer Fallbeschleunigung von 16000g wieder für zehn Minuten zentrifugiert um weitere Zellfragmente abzutrennen.

Das im Anschluss erneut abpipettierte Plasma wurde bei einer Temperatur von -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.2.2 RNA-Isolation aus Blutplasma mittels Qiagen miRNeasy® Serum/Plasma Kit durch eigene Weiterentwicklung des Isolationsschemas

Die RNA-Isolation der präoperativ gewonnenen Blutproben wurde basierend auf der Anleitung des kommerziell erhältlichen Qiagen miRNeasy® Serum/Plasma Isolationskits durchgeführt.

Für den weiteren Ablauf der Experimente nach erfolgter RNA-Isolation ist eine Konzentration zwischen 17 und 23 ng RNA/µl Eluat erforderlich. Diese Konzentration war mit der Anleitung des Qiagen miRNeasy® Serum/Plasma Kits für die bearbeiteten Proben in den meisten Fällen nicht realisierbar. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit das bestehende Isolationsschema weiterentwickelt.

Vor Beginn des Versuches wurden die mitgelieferten Waschpuffer RWT und RPE mit einer entsprechend den Angaben des Herstellers definierten Menge Ethanol (100 %) ergänzt.

In einem ersten Schritt wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 200 µl des gewonnenen Plasmas mit 1000 µl QIAzol Lysis-Reagenz versetzt und für zehn Sekunden unter Zuhilfenahme eines Vortexmischgerätes durchmischt. Nach erfolgter Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur (15-25 °C) wurde das Gemisch mit 200 µl Chloroform versetzt und nun für 15 Sekunden mit dem Vortexmischgerät durchmischt.

Nach einer erneuten Inkubation für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g für 15 Minuten.

Um die abschließend erforderliche RNA-Konzentration zu erreichen, wurden die bisher beschriebenen Schritte in Punkt 3.2.2 für jede Probe doppelt durchgeführt.

Nach der Zentrifugation waren in jedem 1,5 ml Reaktionsgefäß drei Phasen erkennbar. Die unterste, rötliche Phase enthielt Proteine, darüber erschien eine schmale, weiße Phase mit der DNA und Proteinen und darüber eine klare, wässrige Phase, welche die RNA enthielt (QIAGEN, 2020). Von der obersten Phase wurden schrittweise 600 µl in ein unbenutztes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach der Hinzugabe von 900 µl Ethanol (100 %) das Gemisch durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert.

Darauffolgend wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes sukzessive in das RNeasy® MinElute® Spin Column der Firma Qiagen überführt und jeweils für 15 Sekunden bei 8000g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen.

In einem nächsten Schritt wurden 700 µl des RWT Puffers in das Spin Column pipettiert und bei geschlossenem Deckel für 15 Sekunden bei 8000g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Dieses Prozedere wurde mit 500 µl des RPE Puffers wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000g und Raumtemperatur wurde der Durchfluss verworfen. Nach Hinzugabe von 500 µl Ethanol (80 %) und anschließender Zentrifugation für zwei Minuten bei 8000g und Raumtemperatur wurden der Durchfluss und das Auffanggefäß des Spin-Columns verworfen.

Das Spin Column wurde dann auf ein neues Auffanggefäß gestellt und bei geöffnetem Deckel für fünf Minuten bei Raumtemperatur bei der höchstmöglichen Fallbeschleunigung von 21460g zentrifugiert. Das Ziel hierbei war die Membran des Spin Columns von Ethanolrückständen zu trocknen (QIAGEN, 2020). Im Anschluss wurde auch dieses Auffanggefäß verworfen.

In einem abschließenden Schritt wurde das Spin Column auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Nach Hinzugabe von 20 µl RNase freiem Wasser war eine Einwirkzeit von 5 Minuten erforderlich. Danach erfolgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 21460 g und Raumtemperatur mit dem Ziel die RNA zu eluieren. Um die Menge der gewonnenen RNA zu erhöhen, wurde das Eluat erneut auf die Membran des Spin Columns gegeben und nach fünf Minuten wieder für eine Minute bei 21460g zentrifugiert.

Im Verlauf der Forschungsarbeiten stellte sich heraus, dass die entwickelten Schritte mit verlängerter Einwirkzeit des RNase freien Wassers auf der Membran des Spin Columns unerlässlich waren, um die erforderliche Konzentration zwischen 17 und 23 ng RNA/µl Eluat zu erhalten.

Bei dem beschriebenen Durchlauf wurden 20 µl RNase freies Wasser zum Eluieren der RNA eingesetzt. Um die für die weiteren Reaktionsschritte erforderliche Gesamtmenge von mindestens 30 µl an Eluat zu erhalten, wurden alle in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Schritte zwei Mal durchgeführt. Somit wurde insgesamt für jede bearbeitete Plasmaprobe eine Menge von 40 µl Eluat synthetisiert.

In einem abschließenden Schritt wurde je 1 µl des gewonnenen Eluates in ein NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometer gegeben um die erzielte RNA-Konzentration zu quantifizieren.

3.2.3 RNA-Isolation aus solidem Tumorgewebe mittels Qiagen miRNeasy® Mini Kit

Für die Arbeit wurde intraoperativ gewonnenes Tumorgewebe, welches nicht zur histopathologischen Begutachtung benötigt wurde, unmittelbar postoperativ bei -80 °C tiefgefroren.

Die RNA-Isolation der operativ gewonnenen Meningeomproben wurde gemäß der Anleitung des kommerziell erhältlichen Qiagen miRNeasy® Mini Kits durchgeführt.

Vor Beginn des Versuches wurden die mitgelieferten Waschpuffer RWT und RPE mit einer entsprechend den Angaben des Herstellers definierten Menge Ethanol (100 %) ergänzt.

In einem ersten Schritt wurde ein etwa 0,05 cm³ großes Stück Tumor zusammen mit 700 µl QIAzol Lysis-Reagenz in ein konisches Zentrifugenröhrchen (50 ml) gegeben und im Anschluss mit einem Homogenisierer lysiert, bis keine soliden Gewebestandteile mehr erkennbar waren. Dann wurde der Versuch in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Nach erfolgter Inkubation für fünf Minuten bei 15-25 °C wurde das Gemisch mit 140 µl Chloroform versetzt und für 15 Sekunden mit dem Vortexmischgerät durchmischt. Nach einer erneuten Inkubation für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur folgten eine Zentrifugation bei 4 °C und einer Fallbeschleunigung von 12000 g für 15 Minuten.

Nach der Zentrifugation waren, ähnlich wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben, drei verschiedene Phasen erkennbar. Von der obersten, RNA enthaltenden, wässrigen Phase wurden schrittweise 350 µl entnommen und in ein unbenutztes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Hinzugabe von 525 µl Ethanol (100 %) wurde das Gemisch durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert.

Darauffolgend wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes in zwei Schritten in das RNeasy® Mini Spin Column überführt und jeweils für 15 Sekunden bei 8000g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen.

In einem nächsten Schritt wurden 700 µl des RWT Puffers in das Spin Column pipettiert und bei geschlossenem Deckel für 15 Sekunden bei 8000g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Dieses Prozedere wurde zwei Mal mit jeweils 500 µl des RPE Puffers wiederholt. Beim ersten Durchlauf erfolgte eine Zentrifugation für 15 Sekunden und dann für zwei Minuten jeweils bei 8000g und Raumtemperatur. Der Durchfluss wurde stets verworfen.

Das Spin Column wurde nun auf ein neues Auffanggefäß gestellt und bei geöffnetem Deckel für eine Minute bei der höchstmöglichen Drehzahl von 21460g zentrifugiert. Dieser Schritt diente dem Ziel, jegliche Rückstände des RPE Puffers zu entfernen (QIAGEN, 2020). Im Anschluss wurden auch hier der entstandene Durchfluss und das Auffanggefäß verworfen.

Dann wurde das Spin Column auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Nach Hinzugabe von 40 µl RNase freiem Wasser erfolgte die Zentrifugation für eine Minute bei 21460 g und Raumtemperatur mit dem Ziel die RNA zu eluieren. Nun wurden erneut 30 µl RNase freies Wasser auf die Membran des Spin-Columns gegeben und das erneut gewonnene Eluat in einem zweiten Zentrifugationsschritt

für eine Minute bei 21460 g und Raumtemperatur zu dem bereits bestehenden Eluat hinzuzentrifugiert.

Abschließend wurde die erzielte RNA-Konzentration durch die Einschleusung von 1 µl des gewonnenen Eluates in ein NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometer quantifiziert.

3.2.4 Analyse der Tumor- und Blutproben mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

3.2.4.1 Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion wurde 1987 publiziert und erweist sich heute als eine der bedeutendsten Methoden der Molekularbiologie (MULLIS, FALOONA, 1987). Bei diesem Prozess wird der physiologische Ablauf der DNA-Replikation imitiert (HOLZAPFEL, WICKERT, 2007). Durch dieses Verfahren ist es möglich eine spezifische Nukleinsäuresequenz unter vielen in einem zyklischen Prozess in vitro exponentiell zu amplifizieren. Grundlage der Untersuchung ist die Kenntnis der terminalen Abschnitte der zu amplifizierenden Sequenzen, damit spezielle Oligonukleotide (Primer) daran binden können. Primer sind für die Initiierung der Amplifikationsreaktion obligat. Diese wird durch eine hitzestabile DNA-Polymerase katalysiert. Diese Taq-Polymerase wird durch die nach jedem Amplifikationsschritt notwendige thermische Denaturierung bei 95 °C nicht beeinträchtigt (MULLIS, FALOONA, 1987). Dank dieses Verfahrens ist es möglich, eine Vielzahl gleicher Nukleinsäurekopien zu generieren, welche als Ausgangsprodukt für weitergehende Analysen dienen (KUBISTA et al., 2006). Der Prozess teilt sich somit in drei sich wiederholende Schritte (siehe Tabelle 9). In einem ersten Schritt wird der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang bei 90-95 °C denaturiert. Bei dem anschließenden Prozess des Annealing lagern sich bei 55-60 °C synthetische Oligonukleotide (Primer) an die so entstandenen einzelsträngigen DNA-Moleküle an. Die Primer dienen der DNA-Polymerase als Orientierung, von wo die Elongation (Extension) des komplementären DNA-Stranges durchgeführt wird. Dieser dritte Schritt wird bei 72 °C mit der rekombinanten DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) aus dem thermophilen Bakterium „*Thermus aquaticus*“ durchgeführt (HOLZAPFEL, WICKERT, 2007).

Tabelle 9: Abfolge der Reaktionsschritte der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (modifiziert nach Holzapfel und Wickert) (HOLZAPFEL, WICKERT, 2007)

Abfolge	Schritt	Temperatur [°C]
1.	Denaturierung	90-95
2.	Annealing	55-60
3.	Elongation (Extension)	72

3.2.4.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Bei der durch das Enzym Reverse Transkriptase (BALTIMORE, 1970; TEMIN, MIZUTANI, 1970) vermittelten Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem es möglich ist, RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben (SPIEGELMAN et al., 1971). Die cDNA gilt als Ausgangsmaterial für die sich anschließende Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (Punkt 3.2.4.3.2).

3.2.4.2.1 Durchführung der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mittels TaqMan® microRNA-spezifischen stem-loop Primern

Vor Beginn der Experimente wurde die gesamte Arbeitsfläche mittels der Dekontaminationslösung RNase AWAY® von einer möglichen Kontamination durch RNasen befreit.

In einem ersten Schritt wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß der Generalmastermix erstellt. Dieser setzte sich pro untersuchter microRNA/RNU und Patientenprobe aus einer jeweils fest definierten Menge aus dNTP Mix, RT-Puffer, RNase-Inhibitor, dem Enzym der Reversen Transkriptase (TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit) und PCR-Wasser zusammen (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Komponenten des Mastermixes für die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion bezogen auf eine untersuchte microRNA/RNU und Patientenprobe

Produkt	Volumen [μ l] pro Reaktion
dNTP Mix	0,15
RT-Puffer	1,5
RNase Inhibitor	0,19
Reverse Transkriptase	1
PCR-Wasser	4,16
Gesamtvolumen	7

Nach dem Durchmischen wurde dieser Mastermix auf sechs 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Diese Anzahl ergibt sich aus den sechs zu untersuchenden Primersequenzen der microRNAs bzw. RNUs (siehe Tabellen 11 und 12).

Tabelle 11: Auflistung der TaqMan® Assays der untersuchten microRNAs

Assay-Name	Assay-ID
hsa-miR-21-3p	002438
hsa-miR-34-3p	002316
hsa-miR-200a-3p	000502
hsa-miR-409-3p	002332

Tabelle 12: Auflistung der TaqMan® Assays der endogenen Kontrollen

Assay-Name	Assay-ID
RNU48	001006
RNU6B	001093

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Expressionsanalyse der microRNAs 21-3p, 34a-3p, 200a-3p, 409-3p und der RNUs 48 und 6B als endogene Kontrolle.

Nach der Umverteilung wurde in jedes 1,5 ml Reaktionsgefäß microRNA- bzw. RNU-spezifischer stem-loop Primer für die reverse Transkription hinzugegeben (APPLIED_BIOSYSTEMS, 2005). Die Menge betrug jeweils 3 µl pro untersuchter Patientenprobe. Stem-loop Primer weisen bezüglich der Effizienz und Spezifität bessere Ergebnisse als herkömmliche lineare Primer auf. Dies basiert unter anderem auf der Insensitivität gegenüber DNA und den Vorläufersequenzen der entsprechenden microRNA. Des Weiteren wird durch die räumliche Beschränkung der Stamm-Schleife die Assay-Spezifität im Vergleich zu herkömmlichen linearen RT-Primern verbessert (CHEN et al., 2005).

Von diesem Gemisch wurden je 10 µl (7 µl Mastermix + 3 µl RT-Primer) in ein 200 µl Mini-Reaktionsgefäß gegeben und dann 5 µl des RNA-Eluates (Gewinnung 3.2.2 und 3.2.3) hinzugegeben. Das gewonnene Eluat der RNA-Isolation aus solidem Tumorgewebe wurde hierfür auf eine Konzentration von 23 ng RNA/µl verdünnt. Das 200 µl Mini-Reaktionsgefäß wurde dann mitsamt des Inhalts für die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion in den Thermocycler gegeben. Die Abfolge der Reaktionsschritte war fest vorgegeben (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Abfolge der Reaktionsschritte der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
1. Annealing	30	16	1
2. Extension	30	42	1
3. Denaturierung	5	85	1
4. Lagerung	∞	4	1

3.2.4.3 Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die qPCR basiert auf dem Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion. Diese Methode ermöglicht einerseits die Amplifikation bestimmter Nukleinsäuresequenzen und andererseits gleichzeitig deren Quantifizierung in Echtzeit. Die qPCR basiert auf dem Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen.

Hierbei sind unter anderem die drei folgenden Methoden möglich: der Einsatz von Hydrolisierungs sonden (TaqManTM), Molecular Beacons oder auch Hybridisierungs sonden.

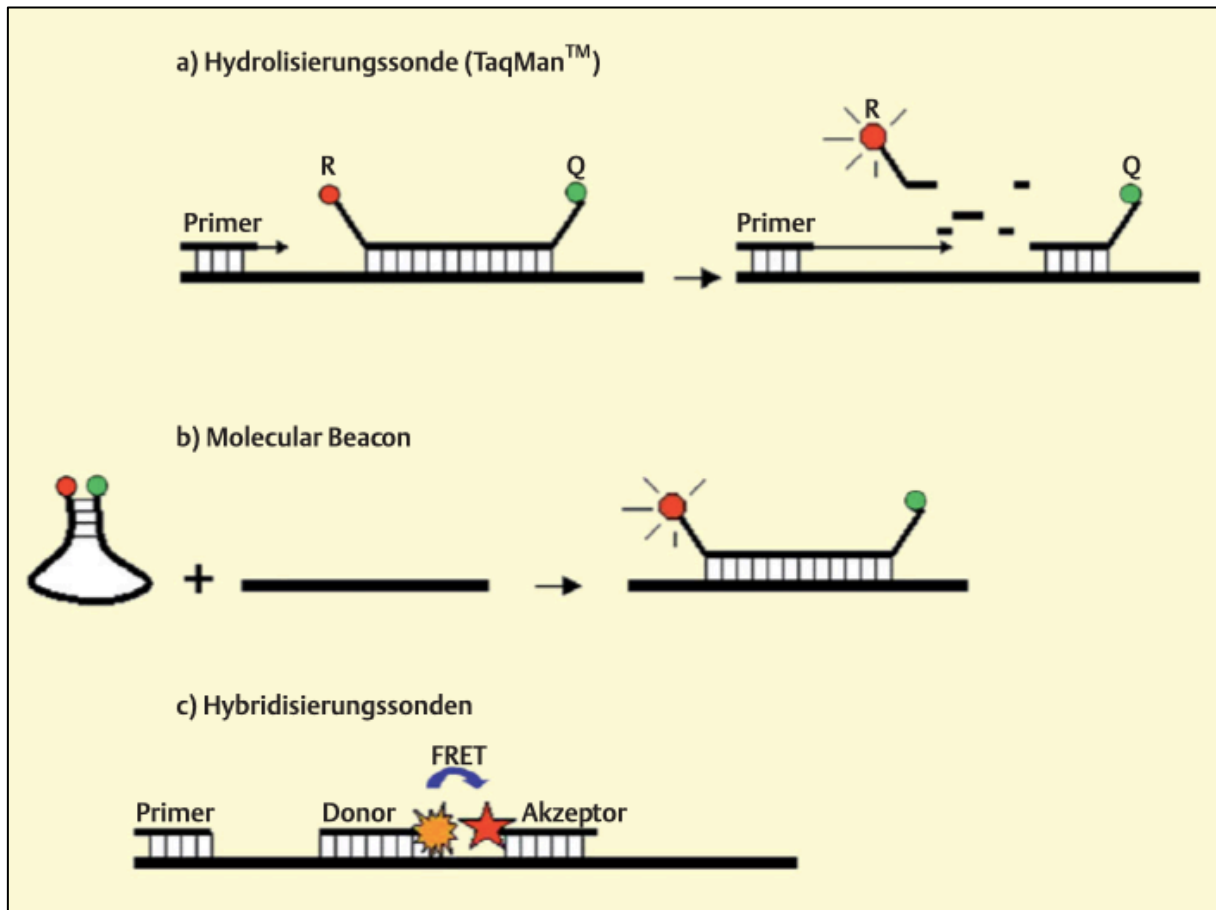
Bei den Hydrolisierungs sonden (TaqManTM) bindet ein Oligonukleotid, an dessen einem Ende sich ein Reporter- und am anderen Ende ein Quencherfarbstoff befindet, an die zu amplifizierende Sequenz. Das emittierte Signal des Reporterfarbstoffs wird durch die räumliche Nähe des Quenchers neutralisiert. Zusätzlich bindet auch der passende Primer an die Nukleinsäuresequenz. Im weiteren Verlauf wird der zu amplifizierende gegenläufige Strang durch die Taq-Polymerase elongiert. Dabei spielt die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase eine entscheidende Rolle. Durch die Aktivität dieses Enzyms wird der Reporterfarbstoff freigesetzt und das Signal kann detektiert werden. Das emittierte Signal wird umso stärker, je mehr DNA synthetisiert wird.

Molecular Beacons sind Sonden, welche ebenfalls über einen Reporter- und einen Quencherfarbstoff an ihren Enden verfügen. Sie stellen eine Weiterentwicklung von TaqManTM Primern dar. Hierbei sind das 5'Ende und das 3'Ende der Sonde zueinander komplementär, sodass sich eine haarnadelförmige Sekundärstruktur ausbildet. Auch bei dieser Methode wird das emittierte Signal des Reporterfarbstoffs durch die räumliche Nähe des Quenchers neutralisiert. Bei der Anlagerung an eine komplementäre DNA-Sequenz vergrößert sich der Abstand zwischen Reporter und Quencher und das emittierte Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffs kann nun gemessen werden.

Bei den Hybridisierungs sonden binden zwei Primer in einem geringen Abstand von einem bis fünf Nukleotiden nebeneinander an die zu amplifizierende Sequenz. Einer der Primer trägt am 3'Ende einen Akzeptor und der andere am 5'Ende einen Donor. Wenn beide Primer an die Nukleinsäuresequenz binden, findet ein Energietransfer statt und das Signal wird emittiert.

Die Gemeinsamkeit all dieser Methoden ist die Zunahme der Fluoreszenzsignale proportional zur Menge der Produkte der qPCR. Ein entscheidender Nachteil der fluoreszenzmarkierten Primer ist die begrenzte Haltbarkeit (HOLZAPFEL, WICKERT, 2007).

Abbildung 5: Methoden der Fluoreszenzmessung bei der qPCR (modifiziert nach Holzapfel und Wickert) (HOLZAPFEL, WICKERT, 2007); (FRET: Förster-Resonanzenergietransfer; Q: Quencher; R: Reporterfarbstoff)



Die qPCR findet ihren Einsatz typischerweise in der Detektion genetischer Erkrankungen oder der Bestimmung der Viruslast nach Infektionen (BACHMAN, 2013; HOLZAPFEL, WICKERT, 2007). Des Weiteren ist es möglich, quantitative Genexpressionsanalysen in verschiedenen Zellen und Geweben in der Molekularbiologie und in der medizinischen Diagnostik durchzuführen (BACHMAN, 2013; JOZEF CZUK, ADJAYE, 2011).

Die qPCR gilt als Goldstandard des zuverlässigen Nachweises und der exakten Quantifizierung von microRNAs (HIRSCHBERGER et al., 2019).

3.2.4.3.1 Prinzip der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mittels TaqMan® MicroRNA Assays

Die Experimente in dieser Arbeit erfolgten unter dem Einsatz von TaqMan™ Hydrolyse-Sonden. Die hierbei eingesetzten TaqMan® MicroRNA Assays bestehen aus Primern und spezifischen Hydrolyse-Sonden (TaqMan®-Sonden). Die Primer lagern sich am 3' Ende der cDNA an, die Hydrolyse-Sonden an eine komplementäre Sequenz innerhalb des Stranges zwischen den Andockstellen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer. Diese fluoreszenzmarkierten Sonden verfügen am 5' Ende über den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (F) und am 3' Ende über einen Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) sowie einen Minor-Groove-Binder (MGB) (THERMO_FISHER_SCIENTIFIC, ohne Jahresangabe). Während der PCR werden die Sonden mit Licht einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm angeregt (SCHILD, ohne Jahresangabe).

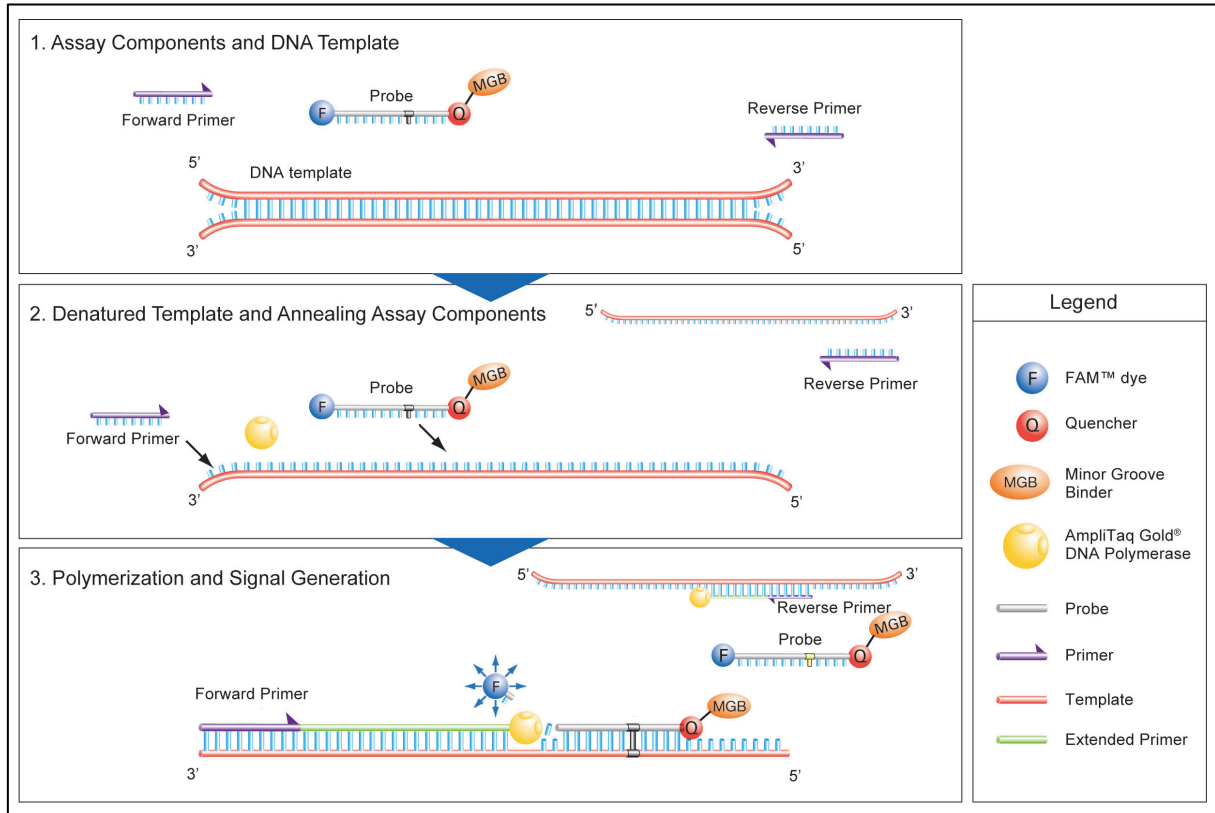
Vor Aktivitätsbeginn der im TaqMan™ Gene Expression Master Mix enthaltenen AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase UP (Ultra Pure) wird bei intakter Sonde das emittierte Signal des Reporter-Fluoreszenzfarbstoffes vom Akzeptor-Fluorochrom unterdrückt. Dies basiert auf der räumlichen Nähe zwischen Reporter und Quencher (THERMO_FISHER_SCIENTIFIC, ohne Jahresangabe).

Nach der Enzymaktivierung für zehn Minuten bei 95 °C erfolgen im Anschluss die Schritte Denaturierung sowie Annealing (Anlagerung des Primers an die DNA) und Extension (Verlängerung des zu amplifizierenden Stranges) in einer vorher definierten Anzahl im Wechsel (THERMO_FISHER_SCIENTIFIC, 2019).

Während jeder Extensionsphase wird die TaqMan®-Sonde durch die DNA Polymerase hydrolysiert und der Reporter-Farbstoff wird vom Quencher abgetrennt. Dieses Reaktionsprinzip basiert auf der zusätzlichen 5'-3'- Exonuklease-Aktivität der Polymerase (THERMO_FISHER_SCIENTIFIC, ohne Jahresangabe). Pro abgelaufenem Reaktionszyklus kommt es zu einer kontinuierlichen Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 520 nm (THERMO_FISHER_SCIENTIFIC, 2016b). Das hierbei detektierte Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zu der Anzahl der freigesetzten Reporter-Farbstoffe und dementsprechend auch zur Menge der amplifizierten DNA Stränge (THERMO_FISHER_SCIENTIFIC, ohne Jahresangabe).

Die theoretische Größe bei der Quantifizierung stellt hierbei der Ct-Wert (cycle threshold) dar. Der Ct-Wert ist hierbei der Punkt, an dem die jeweilige Amplifikationskurve einen vorher festgelegten Schwellenwert, welcher innerhalb ihres exponentiellen Wachstumsbereiches lokalisiert sein muss, übersteigt. Durch diesen Wert wird die Menge der Zielsequenz dargestellt, welche sich in der untersuchten Probe befindet. Je mehr Kopien der gesuchten Nukleinsäuresequenz im zu analysierenden Versuchsaufbau vorliegen, desto niedriger liegt der Ct-Wert (THERMO_FISHER_SCIENTIFIC, 2016a).

Abbildung 6: Prinzip der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mittels TaqMan® MicroRNA Assays nach Thermo Fisher Scientific (THERMO_FISHER_SCIENTIFIC, ohne Jahresangabe); (FAM: fluorescein amidite (Fluoresceinamidit))



3.2.4.3.2 Durchführung der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mittels TaqMan® MicroRNA Assays

Die Realtime-Polymerase-Kettenreaktion wurde auf einer 96-Well Mikrotiterplatte durchgeführt. In sämtliche Wells wurden für jede untersuchte microRNA bzw. RNU als endogene Kontrolle 9 µl eines eigens synthetisierten Gesamtmastermixes (siehe Tabelle 14) vorgelegt und im Anschluss jeweils 1 µl der synthetisierten cDNA hinzugegeben (siehe Abschnitt 3.2.4.2.1). Jede einzelne der untersuchten microRNA- bzw. RNU- cDNA Proben wurde als Triplett pipettiert. Für jede untersuchte microRNA bzw. RNU erfolgte die Pipettierung einer Negativkontrolle mit 1 µl RNase freiem Wasser.

Tabelle 14: Komponenten des Gesamtmastermixes für die Realtime-Polymerase-Kettenreaktion

Produkt	Volumen [μ l] pro Reaktion
TM-Primer	0,5
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	5
PCR Wasser	3,5
Gesamtvolumen	9

Abschließend wurde die Mikrotiterplatte mit einer selbstklebenden Folie (MicroAmp™ Optical Adhesive Film) verschlossen und der Inhalt mit Hilfe eines Plattenvortexmischgerätes vermischt. Danach wurde die Mikrotiterplatte bei einer Temperatur von 4 °C und einer Fallbeschleunigung von 1000g für eine Minute zentrifugiert.

Die Durchführung und Messung des Experimentes erfolgte durch das StepOnePlus™ Realtime PCR System und der korrespondierenden StepOne Software v2.3.

Die Abfolge der Reaktionsschritte sind in Tabelle 15 aufgezeigt. Die Enzymaktivierung wurde einmalig zu Beginn durchgeführt und im Anschluss erfolgten die Schritte Denaturierung sowie Annealing und Extension 45-mal im Wechsel.

Tabelle 15: Abfolge der Reaktionsschritte der Realtime-Polymerase-Kettenreaktion

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

3.2.4.4 Datennormalisierung bei der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Das Ergebnis einer microRNA Analyse mittels qPCR wird durch mehrere Variablen determiniert. So verändern verschiedene Faktoren wie die Probengewinnung, ihre Aufbereitung, Weiterverarbeitung, Lagerung und die Effizienz der eingesetzten Enzyme die Messwerte der Analyse (SCHWARZENBACH et al., 2015; VANDESOMPELE et al., 2002). Auch die jeweiligen Spezifitäten der biologischen Ursprungsorganismen (zirkadianer Rhythmus, Nahrungsaufnahme und allgemeiner Lebensstil) tragen hierzu bei (SCHWARZENBACH et al., 2015).

Daher ist eine dementsprechende Datennormalisierung erforderlich. Bei der Analyse der Ergebnisse der qPCR existiert die Option einer absoluten oder einer relativen Quantifizierung der amplifizierten Sequenzen.

Die absolute Quantifizierung der RNA basiert auf Standardkurven, wobei die RNA Qualität nicht berücksichtigt wird. Aus diesem Grund hat sich diese Art der Quantifizierung als nicht optimal herausgestellt und kann nur bei guter RNA Qualität angewendet werden (SCHWARZENBACH et al., 2015).

Bei der relativen Quantifizierung wird die bei der qPCR ermittelte Zyklusschwelle (Ct-Wert) der gesuchten microRNA mit einer endogenen Kontroll-RNA aus derselben Probe verglichen, welche stabil exprimiert ist („Housekeeping“-Transkript). Diese sollte in den analysierten Geweben bzw. Zellen oder als Reaktion auf eine Intervention nicht variieren. Mit Hilfe einer solchen endogenen Kontrolle ist es möglich, Faktoren, welche die Qualität der RNA beeinflussen, sowie Probeentnahmeunterschiede (in Quantität und Qualität der RNA) rechnerisch zu eliminieren. Dies basiert darauf, dass sowohl die gesuchte microRNA als auch die endogene Kontrolle von sämtlichen Variablen, die das Ergebnis einer microRNA Analyse determinieren können, betroffen sind (SCHWARZENBACH et al., 2015; VANDESOMPELE et al., 2002).

Ein universal einsetzbares, allgemein anerkanntes Referenzgen („Housekeeping“ – Transkript) für alle möglichen Arten von Proben existiert nicht (SCHWARZENBACH et al., 2015).

Aus diesem Grund ist es erforderlich, die zu ermittelnden Genexpressionsniveaus durch eine sorgfältig ausgewählte, stabile, endogene Kontrolle zu normalisieren. Dabei muss die vermutete Expressionsstabilität ordnungsgemäß validiert werden (VANDESOMPELE et al., 2002).

Es existiert auch die Möglichkeit einer exogenen Kontrolle. Hierbei wird vor der reversen Transkription der RNA ein exogenes Referenzgen zugefügt. Dies ist in den meisten Fällen die microRNA cel-miR-39 des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Diese Spike-in-Kontrollen berücksichtigen nicht die Qualität der untersuchten Proben und die Umstände der jeweiligen Entnahme (SCHWARZENBACH et al., 2015).

In der Fachwelt existiert kein Konsens über die optimale Datennormalisierung. Die bestmögliche Normalisierungsstrategie basiert auf einer genauen Validierung der Referenzgene für die untersuchten microRNAs (SCHWARZENBACH et al., 2015).

3.2.4.4.1 Etablierung der RNU6B als endogene Kontrolle im Blutplasma

Im Rahmen der durchgeführten Arbeit wurden die beiden endogenen Kontrollen RNU48 und RNU6B als Methode zur relativen Quantifizierung der untersuchten microRNAs eingesetzt.

RNUs (small nuclear ribonucleic acid) sind kleine nukleäre Ribonukleinsäuren, welche in Vorarbeiten häufig als endogene Kontrolle für die Datennormalisierung bei der Untersuchung von microRNAs mittels qPCR verwendet wurden (SCHWARZENBACH et al., 2015).

Die RNU48 wurde bereits im Vorfeld von der Forschungsabteilung für experimentelle Neurochirurgie erfolgreich bei der Expressionsanalyse von microRNAs im Glioblastom eingesetzt. Der Einsatz der RNU6B wurde für die Untersuchung von microRNAs im Blut von Meningeompatienten vollkommen neu etabliert.

Die Wahl der RNU6B bei der Untersuchung von microRNAs in Meningeomen basiert auf Vorarbeiten, welche die microRNA Expression im soliden Meningeom untersucht haben (LUDWIG et al., 2015; SAYDAM et al., 2009). Die RNU6B findet häufig beim Expressionsvergleich verschiedener microRNAs mittels qPCR ihren Einsatz (JACOBSEN et al., 2016). Vor dem Hintergrund, dass eine endogene Kontrolle, die in allen Geweben eingesetzt werden kann, bisher nicht bekannt ist (SCHWARZENBACH et al., 2015), wurden für spezifische Projekte in diversen Vorarbeiten jeweils verschiedene bekannte endogene Kontrollen miteinander verglichen und diejenigen mit der stabilsten Expression verwendet (JACOBSEN et al., 2016; POPOV et al., 2015).

In der dargestellten Promotionsarbeit zeigte sich bei allen Expressionen der RNU6B im Tumor eine Standardabweichung der Ct-Werte von 1,3 um den Mittelwert von 25,05. In Vorarbeiten wurden Standardabweichungen des Ct-Wertes der RNU6B von deutlich über 1,3 um den Mittelwert als akzeptabel angegeben (DUAN et al., 2018). Aus diesem Grund wurde in der dargestellten Arbeit der Grenzwert der Standardabweichung um den Mittelwert mit dem Ziel der Etablierung der RNU6B als endogene Kontrolle im Plasma auf den Wert 1 festgesetzt.

Die RNU48 zeigte eine instabile Expression, da die Ct-Werte bei den Tumor- und Blutproben mehr als eine Standardabweichung um den Mittelwert entfernt lagen. Bei einigen Plasmaproben war die RNU48 nicht detektierbar. Aus diesem Grund ist ihr Einsatz als endogene Kontrolle in dieser Arbeit nicht geeignet.

Die RNU6B zeigte bei den meisten Plasmaproben eine stabile Expression, da die Ct-Werte bei 43 von 51 Patienten innerhalb der Grenze von einer Standardabweichung um den Mittelwert lagen. Damit wurde der Beweis für die erfolgreiche Etablierung der RNU6B als endogene Kontrolle der Quantifizierung von microRNAs im Blutplasma beim Meningeom erbracht. Die Plasmaproben, die nicht verwendet werden konnten, waren vergleichsweise lange im Gefrierschrank gelagert und der

Ct-Wert vergleichsweise zu hoch. Dies deutet auf eine mit der Zeit verringerte Menge an RNU6B im gefrorenen Blutplasma hin.

Die weitere statistische Analyse wurde auf Basis der RNU6B durchgeführt.

3.2.5 Quantitative Analyse der Ergebnisse der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Expressionsmuster der untersuchten microRNAs wurden mittels der RNU6B als endogene Kontrolle normalisiert. Dafür wurde die relative Expression berechnet, welche bei der Auswertung von Expressionsmustern bei microRNAs verwendet werden kann (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001). Die Formel wird im Rahmen dieser Arbeit wie folgt angewendet:

$$2^{-(\Delta Ct)} = 2^{-(Ct(\text{microRNA}) - Ct(\text{RNU6B}))}$$

Somit werden die Ct-Werte der untersuchten microRNAs zu dem jeweiligen Ct-Wert der endogenen Kontrolle (RNU6B) ins Verhältnis gesetzt. Dem Verfahren liegt eine einheitliche Amplifikationseffizienz der Polymerase-Kettenreaktion von 100 % zugrunde. Der Wert „2“ ergibt sich durch eine Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus (KOPKOVA et al., 2019). Die Werte der relativen Expression werden für die statistische Auswertung dieser Arbeit benutzt.

3.2.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Tumorproben wurden zusätzlich mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf mögliche Chromosomenteilverluste bzw. Zugewinne untersucht, die bei der Progression von Meningeomen eine entscheidende Rolle spielen. Dies dient der Detektion einer möglichen Korrelation der untersuchten Marker hinsichtlich der molekularzytogenetischen und der epigenetischen Ebene.

Diese Experimente wurden von Frau Celine Schuster, B.Sc., und Frau Nina-Christin Bewersdorf, B.Sc., in jeweils eigenen Projekten durchgeführt und nun im Rahmen der beschriebenen Promotionsarbeit auf die entsprechenden klinischen Daten bezogen und ausgewertet. Für zwei Meningeome lagen keine Ergebnisse vor, so dass insgesamt 41 Tumore untersucht wurden.

Die analysierten Genloci sind in Tabelle 16 angegeben.

Tabelle 16: Übersicht über die analysierten Genloci der Chromosomen

Chromosom	Genlocus
1	1p36
9	9p21
10	10q23
14	14q24
18	18q21
22	22q11

3.2.6.1 Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist es möglich, bestimmte Chromosomenanomalien zu detektieren (OZKAN, LACERDA, 2021). Der Begriff „in-situ“ beruht auf dem Nachweis in dem jeweiligen Präparat bzw. Gewebe (MULISCH, WELSCH, 2010). Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gilt als Standardmethode in der humangenetischen Diagnostik und Erforschung verschiedener Erkrankungen, wie z.B. angeborener genetischer Erkrankungen, hämatologischer Malignitäten oder solider Tumoren. Neben der Diagnostik kommt diese Methode auch in der zielgerichteten Therapiebestimmung (z.B. hämatologisch-onkologische Erkrankungen) zum Einsatz (OZKAN, LACERDA, 2021).

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung werden bestimmte, künstlich hergestellte Nucleotidanaloga (Sonden) eingesetzt, die an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt sind und an den jeweilig komplementären, zu untersuchenden DNA Abschnitt binden (MULISCH, WELSCH, 2010; OZKAN, LACERDA, 2021). Diese Hybridisierung wird erst durch eine Trennung

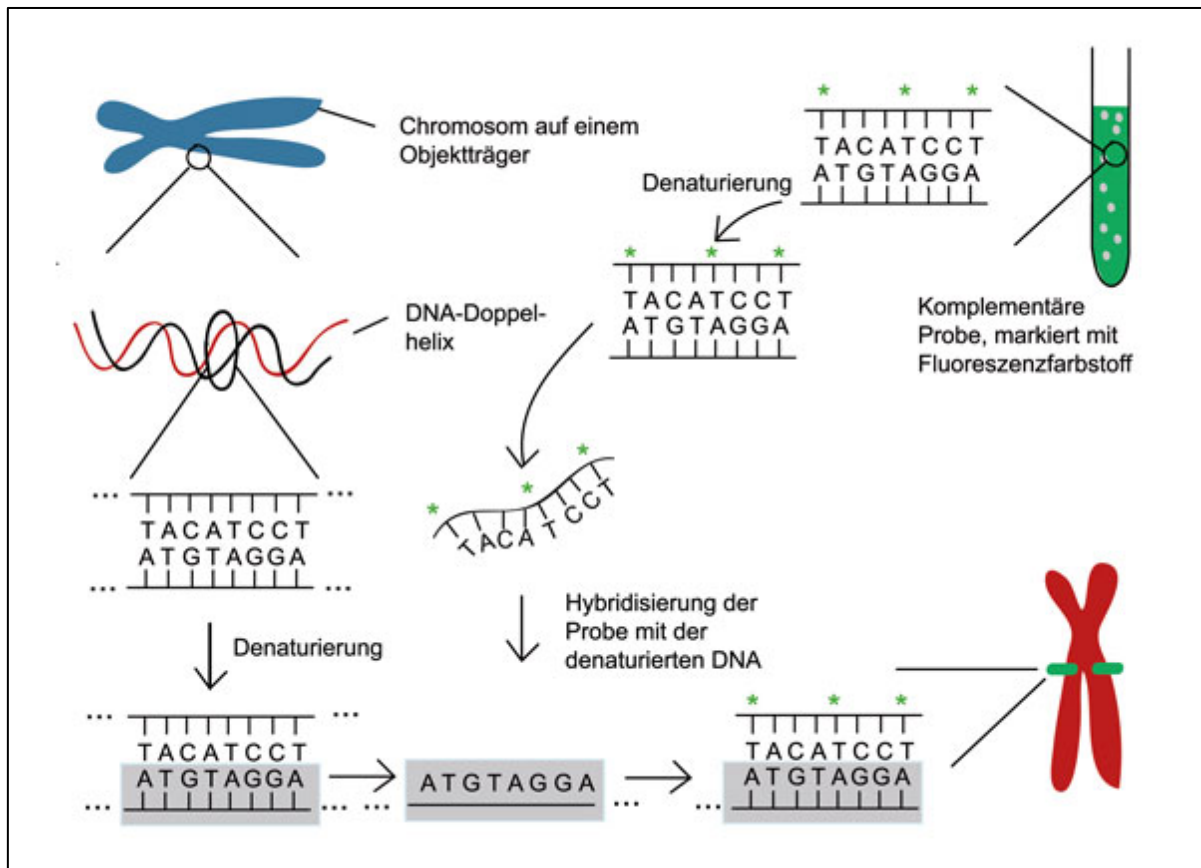
(Denaturierung) der im ursprünglichen Zustand doppelsträngig vorliegenden DNA ermöglicht (siehe Abbildung 7). Die Sonde kann dann mittels Autoradiographie, Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie innerhalb der jeweiligen Strukturen detektiert werden (MULISCH, WELSCH, 2010). Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist es möglich, Inversionen, Insertionen, Translokationen, Mikrodeletionen und Mikroduplikationen nachzuweisen (OZKAN, LACERDA, 2021).

Grundlegend für das Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist die exakte Spezifität der Sonde zu der jeweiligen Zielsequenz. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, muss diese im gesamten Genom einzigartig sein. Bereits kurze Sequenzen, wie Mini- oder Mikrosatelliten oder Transposonelemente können ursächlich für eine Kreuzhybridisierung der Sonde mit zusätzlichen Loci sein. Eine sorgfältige Vorbehandlung der Präparate ist für den Erfolg der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung unerlässlich. Die zentrale Schwierigkeit bei diesem Verfahren ist die Zugänglichkeit der Zielmoleküle für die Hybridisierung mit der Sonde. Die Ziel-DNA oder -RNA ist durch Proteine und weitere Zellbestandteile maskiert. Aus diesem Grund ist der optimale Zustand zwischen Permeabilität und struktureller Integrität des jeweiligen Präparates der entscheidende Faktor für den Erfolg des Experiments und die Aussagekraft des Ergebnisses (MULISCH, WELSCH, 2010).

Zentraler Vorteil der FISH ist der gleichzeitige Nachweis verschiedener Zielsequenzen in einem Präparat durch den Einsatz mehrerer Sonden (multi color-FISH). Das Auflösungsvermögen hängt vom Kondensationsgrad der untersuchten DNA ab. Bei der Analyse von mitotischen Metaphasechromosomen beträgt dieses etwa ein Megabasenpaar (1 Mbp). Im Pachytänstadium aus meiotischen Zellen liegt das Auflösungsvermögen bei etwa 50 Kilobasenpaaren (50 kbp) (MULISCH, WELSCH, 2010).

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Prinzips der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (PAPAN, WEBER, 2019);

Die zu untersuchende Ziel-DNA-Doppelhelix und die DNA-Sonden werden denaturiert. In der Folge entstehen jeweils zwei DNA-Einzelstränge. Die einzelsträngige DNA-Sonde, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, bindet an die komplementäre Ziel-DNA. Dieser Vorgang der Hybridisierung kann im Anschluss unter einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden (PAPAN, WEBER, 2019).



3.2.6.2 Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

3.2.6.2.1 Tumor-Tupfpräparate und Fixierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde an Tumor-Tupfpräparaten durchgeführt. Die Herstellung erfolgte unter sterilen Bedingungen nach dem laboreigenen Standardprotokoll „Anfertigung der Tupfpräparate von Tumoren“ der Forschungsabteilung für experimentelle Neurochirurgie der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes.

Hierbei wurde in einem ersten Schritt direkt operativ reseziertes Tumorgewebe verwendet, welches unmittelbar in einem Nährmedium bei -80 °C gelagert wurde. Dieses Medium setzte sich aus DMEM mit 10 % FBS, 1 % MEM NEAA und 1 % PenStrep zusammen.

Im Anschluss wurde das Tumorgewebe in eine Petrischale gegeben und zentral ein etwa 1-2 mm großes Stück mit einer sterilen Schere entnommen. Das gewonnene Gewebestück wurde mit einer sterilen Pinzette auf sechs Thermo Fisher Scientific™ SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger getupft. Hierbei wurden pro Objektträger jeweils vier Tupfreihen gebildet. Bei diesem Prozedere wurde das Tumorstück gerade von oben auf den Objektträger gedrückt, um verformte und damit nicht auswertbare Zellen zu verhindern.

Die betupften Objektträger wurden für 15 Minuten luftgetrocknet. Die anschließende Fixierung diente dem Strukturerehalt der Zellen. Dieser Schritt erfolgte mit einer mit DeLauney Fixativ gefüllten Glasfärbeküvette für 30 Sekunden unter einer Abzugshaube. Nach einer anschließenden Trockenzeit von 10 Minuten wurden drei Objektträger mittels mikroskopischer Kontrolle ausgewählt. Diese Zahl basiert auf dem Einsatz von drei Kombinationssonden mit Zweifarbenhybridisierung. Zentrales Kriterium ist hierbei die Erkennbarkeit von Zellen. Für die weitere Bearbeitung wurde mit einem Diamantschreiber ein ca. 18x18 mm großer Bereich markiert, in dem die Zellzahl am größten war. Dieses Areal stellte das Gebiet für die spätere Hybridisierung dar. Im Anschluss wurden die betupften Objektträger für 2-3 Tage bis zur Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.6.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde nach dem laboreigenen Standardprotokoll „FISH an Tupf- und Tropfpräparaten für Meningeome mit direkt markierten Sonden Firma Metasystems“ der Forschungsabteilung für experimentelle Neurochirurgie der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt. Diese Methode wurde in Vorpublikationen der Arbeitsgruppe bereits eingesetzt (HEMMER et al., 2019).

3.2.6.2.3 RNase-Verdau

Der RNase-Verdau wurde durchgeführt um unspezifische Sonden-Bindungen zu vermeiden. Die hierbei eingesetzte RNase A baut einzelsträngige Ribonukleinsäuren ab, die im Zellkern oder im Zytoplasma vorhanden sind. Dieser Schritt wurde vor der eigentlichen Hybridisierung durchgeführt um zu vermeiden, dass die eingesetzten DNA-Sonden fälschlicherweise an unspezifische RNA binden, was zu einer fehlerhaften Interpretation der Signale führen könnte (MULISCH, WELSCH, 2010).

Pro untersuchtem Tupfpräparat (in dieser Arbeit drei pro Tumor) wurden 100 µl steril filtriertes 2xSSC und 1 µl RNase A in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend in einem

Vortexmischgerät durchmischt und zentrifugiert. Danach wurden 100 µl von dem erzeugten RNase A Ansatz auf jeden Objektträger pipettiert und ein Deckglas (24 x 60 mm) luftblasenfrei aufgelegt. In einem weiteren Schritt wurden die Präparate für 30 Minuten in einer Feuchtekammer abgelegt, welche bei 37 °C in einem Brutschrank gelagert wurde. Dann wurden das Deckglas abgenommen und die Proben dreimal für jeweils 5 Minuten in 2xSSC gewaschen. Dies diente der Entfernung überschüssiger RNasen.

3.2.6.2.4 Pepsinbehandlung und Fixierung

Im nächsten Schritt wurden die Tupfpräparate mit einem Gemisch aus Pepsin und Salzsäure (HCl) behandelt. Dieses Vorgehen hat das Ziel Nukleasen (DNasen und RNasen) abzubauen und trägt zur Permeabilitätserhöhung des Präparates bei. Somit können die DNA-Sonden einfacher durch die Zelle zur Ziel-DNA gelangen (MULISCH, WELSCH, 2010).

Für diesen Schritt wurde eine Glasfärbeküvette mit 100 ml Aqua dest. und 120 µl Salzsäure (25 %) befüllt und bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Im Anschluss wurden 30 Sekunden vor dem Eintauchen der Objektträger 100 µl Pepsin (10 %) in die verdünnte Salzsäure pipettiert und für 1:55 Minuten in der entstandenen Lösung inkubiert. Dann erfolgte für fünf Minuten ein Waschvorgang in 1x PBS bei Raumtemperatur. Als nächstes wurden die Tupfpräparate für zehn Minuten in einer 4 % PFA/1xPBS Lösung mit einer Temperatur von 4 °C fixiert. Zuletzt erfolgte ein Spülvorgang in 1xPBS und ein weiteres Auswaschen in frisch angesetzttem 1xPBS bei Raumtemperatur.

3.2.6.2.5 Ethanolreihe

Im nächsten Schritt wurden die Tupfpräparate in einer aufsteigend konzentrierten Ethanolreihe für jeweils fünf Minuten dehydriert. Hierfür wurden drei Glasfärbeküvetten mit jeweils 70 %, 80 % und 99 % vergälltem Ethanol befüllt. Nach dem Entwässerungsvorgang erfolgte die Lufttrocknung für 30 Minuten.

3.2.6.2.6 Denaturierung und Hybridisierung

Im nun folgenden Schritt wurde - bei einem möglichst geringen Lichteinfall - die eigentliche Hybridisierung mittels DNA-Sonden durchgeführt. Die Sonden, welche jeweils zu 20 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert sind, müssen vor der Verwendung vorsichtig aufgetaut werden. In dieser Arbeit wurden drei Kombinationssonden mit Zweifarbenhybridisierung benutzt (1p36/22q11,

9p21/10q23, 14q24/18q23). Die Sonden-Reaktionsgefäße wurden kurz mit einem Vortexmischgerät durchmischt und abzentrifugiert. Pro Objektträger wurden 5 µl des jeweiligen Hybridisierungsmixes mit einer Pipette aufgetragen und mit einem Deckglas (18 x 18 mm) luftblasenfrei fixiert. Um die Hybridisierungsreaktion von der Raumluft dauerhaft abzuschirmen, wurde an den Rändern der Deckgläser eine geringe Menge des Montageklebers (Fixogum) aufgetragen, der für 30 Minuten unter einem Dunkelhut trocknete. Für die erforderliche Denaturierung der DNA wurden die Tupfpräparate auf eine Heizplatte gelegt und bei 75 °C für zwei Minuten unter einem Dunkelhut aufgeheizt. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte in einer feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 37 °C über Nacht.

3.2.6.2.7 Stringenzwaschung und DAPI-Eindeckung

Bei der Stringenzwaschung wurden DNA-Sonden, die unspezifisch gebunden waren, entfernt. Die Stringenz ist hier der Grad der Exaktheit der Hybridisierung von Nucleinsäuren. Je höher die Stringenz ist, desto höher ist die Anzahl der Bindungen zwischen der jeweiligen Sonde und der Ziel-DNA. Die anschließende Eindeckung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) markierte die DNA in den Zellkernen um diese fluoreszenzmikroskopisch auswerten zu können (MULISCH, WELSCH, 2010).

Der Montagekleber Fixogum wurde vorsichtig entfernt und die Deckgläser in 2xSSC abgeschwemmt. Die Stringenzwaschung erfolgte für zwei Minuten mit 0,4xSSC in einer Glasküvette bei 72°C im Wasserbad und in einem weiteren Waschschriff für 30 Sekunden in 2xSSC/0,05 % Tween20 bei Raumtemperatur.

In einem nächsten Schritt wurden die Proben in Aqua dest. gespült und für 30 Minuten unter einen Dunkelhut gestellt um zu trocknen. Anschließend wurden die Objektträger mit Antifade DAPI eingedeckt. Hierbei wird in einem Verhältnis von 1:1 25 µl Vectashield® Antifade Mounting Medium + Antifade Mounting Medium with DAPI aufgetragen. Abschließend erfolgte die erneute Versiegelung mit einem Deckglas (24 x 60 mm) und die Einlagerung der Präparate im Kühlschrank für 1-2 Tage bei 4 °C.

3.2.6.3 Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die abschließende Auswertung der erstellten Tumor-Tupfpräparate wurde mit einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (OLYMPUS BX43) durchgeführt.

Die Auszählung der Fluoreszenzsignale erfolgte auf der Grundlage von Hopman et al. (HOPMAN et al., 1988). Hierbei werden keine Signale von sich überlappenden Zellen gezählt. Des Weiteren werden gepaarte, dicht aneinander liegende Signale als ein Signal und nur klar voneinander abgrenzbare

Signale mit mindestens einer Signalbreite Abstand getrennt gezählt. Sehr kleine Signale gingen in die Auswertung nicht ein. Die Lokalisation der Zellkerne erforderte UV-Licht mit einer Wellenlänge von 465 nm. Aufgrund der Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) erschienen diese blau. Das Zählen der Fluoreszenzsignale erfolgte in einem Bereich, in dem sich die Zellkerne so wenig wie möglich überlappen. Die Anregung fand für die grünen Fluorophore bei 480 nm und für die roten Fluorophore bei 535 nm statt.

Die Auswertung basierte auf den Signalen von 200 Zellkernen pro Kombinationssonde. Die farbigen Signale pro Zelle wurden gezählt und mit Hilfe einer Strichliste dokumentiert. Das Ergebnis wurde im Anschluss in Prozentwerte umgerechnet und unter Berücksichtigung der Verteilung der Prozentsätze und Höhe des Cut-off Wertes als Verlust oder Zugewinn gewertet.

3.2.6.4 Bestimmung des Cut-off Wertes

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung basiert neben der chromosomalen Bindungsspezifität der Sonden auch auf den jeweiligen Versuchsbedingungen. Somit ist es erforderlich einen Grenzwert festzulegen, um zu detektieren, ob ein chromosomaler Verlust oder Zugewinn vorliegt. Dieser Grenzwert (Cut-off Wert) stellt einen prozentualen Anteil der Zählung dar, der erreicht werden muss, damit eine Signifikanz erzielt wird. Ein Wert der Zählung, der unter dem Cut-off Wert liegt, wird als nicht signifikant angesehen.

Die Bestimmung des Cut-off Wertes basiert auf der Auswertung von drei Lymphozytenpräparaten von gesunden männlichen Probanden. Diese Referenzproben werden analog den Meningeomzellproben vorbehandelt und mit den drei Kombinationssonden hybridisiert. Da es sich hierbei nicht um pathologisch veränderte Zellen handelt, sollten in jedem Zellkern jeweils zwei Fluoreszenzsignale pro angewendeter Sonde detektierbar sein. Falls mehr oder weniger als zwei Signale gezählt werden können, ist dieses Ergebnis als nicht authentisch anzusehen. Der Cut-off Wert wird als Differenz zwischen den gezählten Zellen und den fehlerhaften Signalen berechnet und in Prozent angegeben. Der Cut-off Wert bei dieser Versuchsreihe lag bei 6 %.

3.2.7 Immunreaktiver Score (IRS Score)

Der Immunreaktive Score ist ein Schema zur Quantifizierung von Progesteron- und Östrogenrezeptoren auf der Oberfläche von Zellen. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren der Immunhistochemie. Der Immunreaktive Score berechnet sich aus der Färbeintensität und dem Anteil positiver Zellen (THOMAS, 2005). Diese Bestimmung erfolgte im Rahmen der histopathologischen Untersuchung der Meningeompräparate durch das Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer).

4. Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Die Auswertung der Ergebnisse basiert auf einem Patientenkollektiv von 43 Patienten. Alle Patienten wurden in regelmäßigen Follow-up Untersuchungen weiter betreut. Die mittlere Follow-up Zeit lag bis zu dem untersuchten Stichtag vom 15.01.2021 bei 21,8 Monaten. Bis zu diesem Datum waren 5 der 43 Patienten verstorben.

Tabelle 17: Patientenkollektiv (Geschlecht: w: weiblich; m: männlich; Einheit des Patientenalters: Jahre; Lokalisations- und Volumenbestimmung: siehe Anmerkung am Tabellenende); Einheit des berechneten Tumorumfanges: Kubikzentimeter (cm³); Einheit der „time to progression“ (TTP): Monate)

Nummer	Geschlecht	Alter	WHO Grad	Lokalisation	Volumen	Präsentation	TTP
1	w	64	1	5	27,42	Erstdiagnose	
2	w	68	1	1	13,46	Rezidiv	230
3	m	76	1	1	35,87	Erstdiagnose	
4	m	46	1	6	10,42	Erstdiagnose	
5	w	49	1	6;9	10,47	Erstdiagnose	
6	w	82	1	1	20,71	Erstdiagnose	
7	w	45	2	3	39,38	Erstdiagnose	
8	w	79	1	7	134,01	Erstdiagnose	
9	w	76	2	2	7,46	Rezidiv	64
10	w	75	1	1;2	53,81	Rezidiv	98
11	w	45	2	1	133,71	Erstdiagnose	
12	m	76	1	2	35,87	Erstdiagnose	
13	w	75	1	8	10,12	Erstdiagnose	
14	m	60	1	6	26,93	Erstdiagnose	
15	w	80	1	4	51,67	Erstdiagnose	
16	w	58	1	1	31,82	Erstdiagnose	
17	w	43	1	2	48,64	Erstdiagnose	
18	w	50	1	6	6,68	Erstdiagnose	
19	w	57	1	6	22,62	Erstdiagnose	
20	w	55	1	5	46,96	Erstdiagnose	
21	w	75	1	4	7,02	Erstdiagnose	
22	m	48	3	1	15,38	Rezidiv	121
23	w	89	2	2	38,85	Erstdiagnose	

Nummer	Geschlecht	Alter	WHO Grad	Lokalisation	Volumen	Präsentation	TTP
24	w	50	1	5	8	Erstdiagnose	
25	w	80	2	9	13,71	Rezidiv	40
26	w	36	1	2	113,31	Erstdiagnose	
27	w	60	1	8	9,7	Erstdiagnose	
28	w	57	1	9	4,32	Erstdiagnose	
29	m	66	1	7	25,59	Rezidiv	61
30	w	49	1	5	11,73	Erstdiagnose	
31	w	82	1	1	9,55	Erstdiagnose	
32	m	53	1	3	5,81	Erstdiagnose	
33	w	68	1	7	2,43	Erstdiagnose	
34	m	55	1	6	23,04	Erstdiagnose	
35	w	68	1	1	64,09	Erstdiagnose	
36	m	72	1	3	64,63	Erstdiagnose	
37	m	78	2	6;1;5	8,29	Rezidiv	86
38	w	63	1	7	36,92	Erstdiagnose	
39	w	32	1	6	46,86	Erstdiagnose	
40	m	56	1	4	2,19	Erstdiagnose	
41	w	47	2	1	122,04	Erstdiagnose	
42	w	55	1	1	17,86	Erstdiagnose	
43	w	55	1	1	156,9	Erstdiagnose	

Anmerkungen zu Tabelle 17:

Die Lokalisationseinteilung der Meningeome erfolgte nach Ketter et al. (KETTER et al., 2008) mit der zusätzlichen Untergruppe „petroclival“, welche der Hauptlokalisierung „Schädelbasis“ zugeordnet wurde.

Die Ziffern von 1-9 stehen für folgende neuroanatomische Lokalisationen:

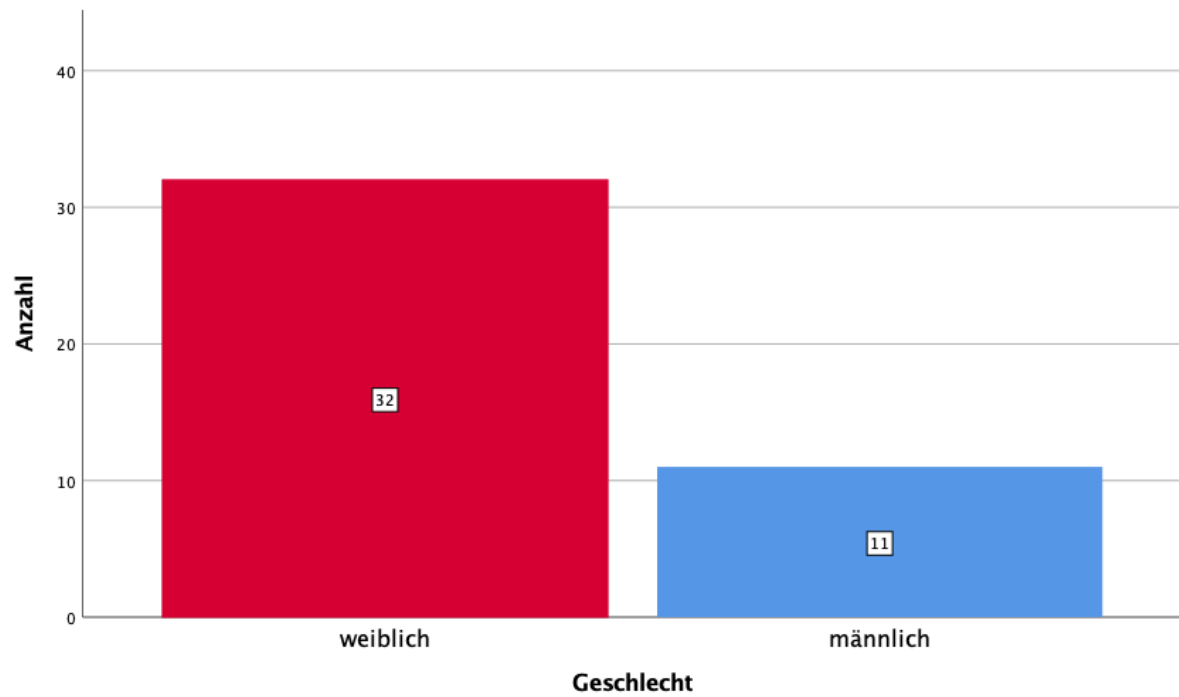
1: Konvexität; 2: parasagittal; 3: Tentorium; 4: hintere Schädelgrube; 5: Falx cerebri;
6: Keilbeinflügel; 7: Olfaktoriusrinne; 8: Tuberculum sellae; 9: petroclival

Die Volumenbestimmung der Meningeome im Transversalschnitt der jeweiligen Bildgebung (Kernspintographie bzw. Computertomographie) erfolgte nach Dang et al. (DANG et al., 2013) gemäß der Formel:

$$\frac{1}{6} \pi d_1 d_2 (s \times t)$$

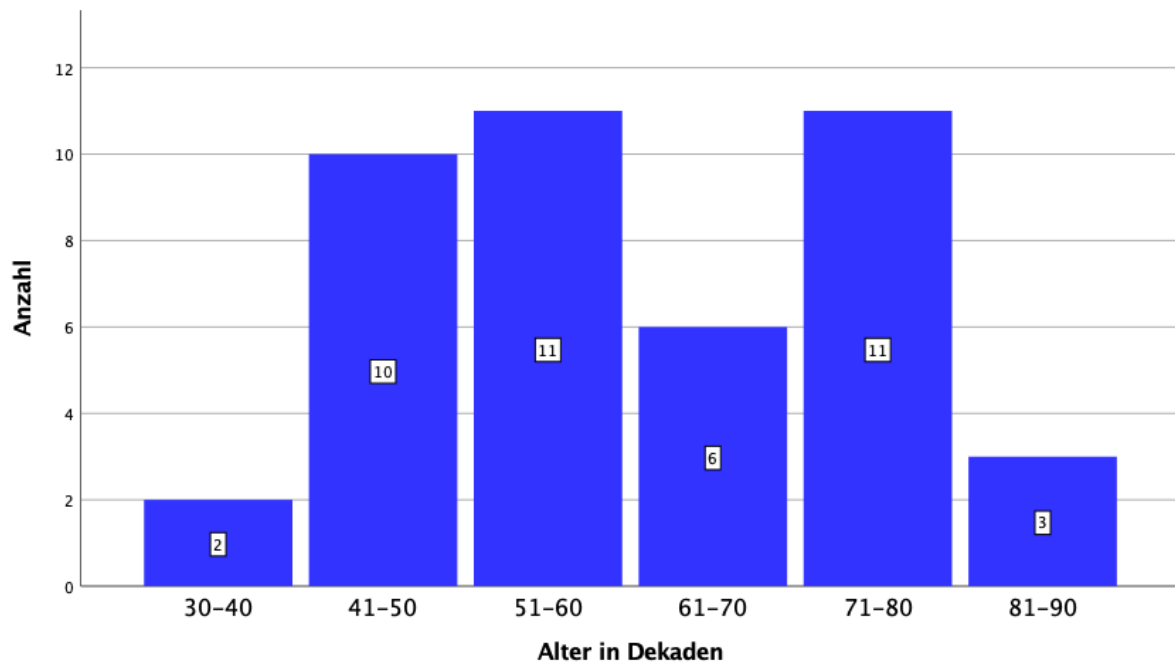
Dabei sind d_1 und d_2 die jeweiligen orthogonalen Diameter des Tumors, s steht für die Nummer der detektierten Schichten in der Bildgebung und t ist die jeweilige Schichtdicke (Längeneinheit: cm).

Abbildung 8: Geschlechtsverteilung im untersuchten Patientenkollektiv



Das Geschlechtsverhältnis zwischen Frauen und Männern lag bezogen auf das Gesamtkollektiv der Patienten bei etwa 3:1 (32 Frauen und 11 Männer).

Abbildung 9: Altersverteilung im untersuchten Patientenkollektiv



Das Patientenalter erstreckte sich auf den Bereich zwischen 32 und 89 Jahren, wobei der Mittelwert bei 61,7 Jahren und der Median bei 60 Jahren lag. Die Standardabweichung lag bei 13,85 Jahren. Der Altersmittelwert bei den Frauen lag bei 61,5 Jahren und bei den Männern bei 62,4 Jahren.

Abbildung 10: Verteilung der WHO Grade im untersuchten Patientenkollektiv

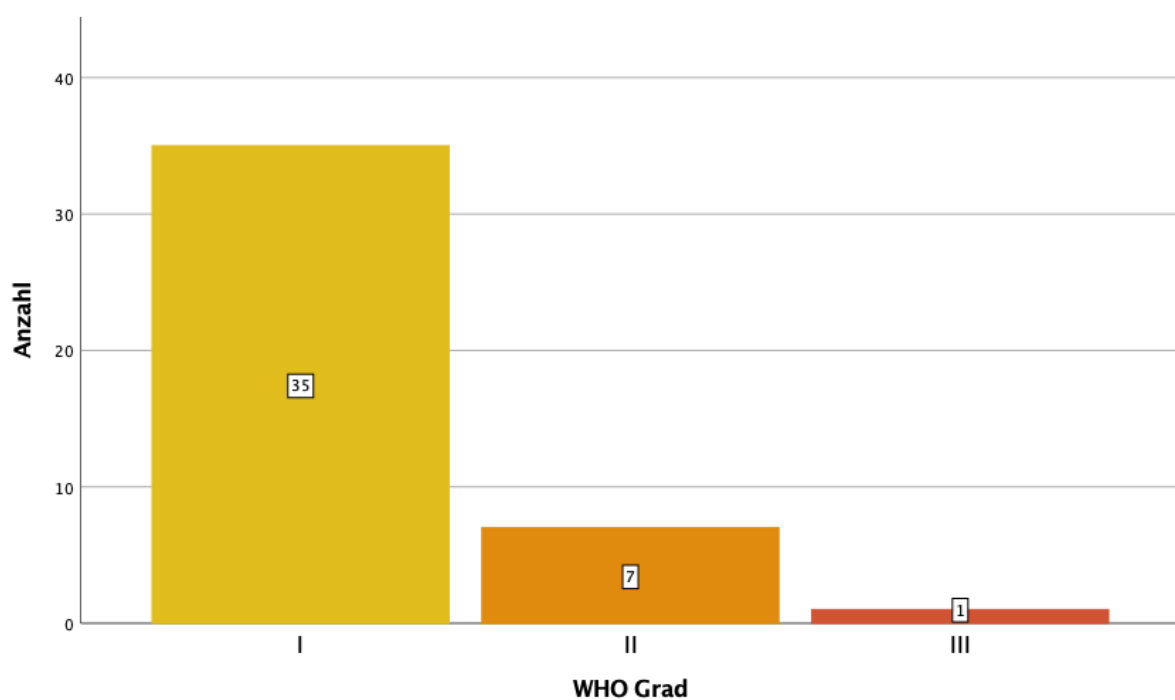
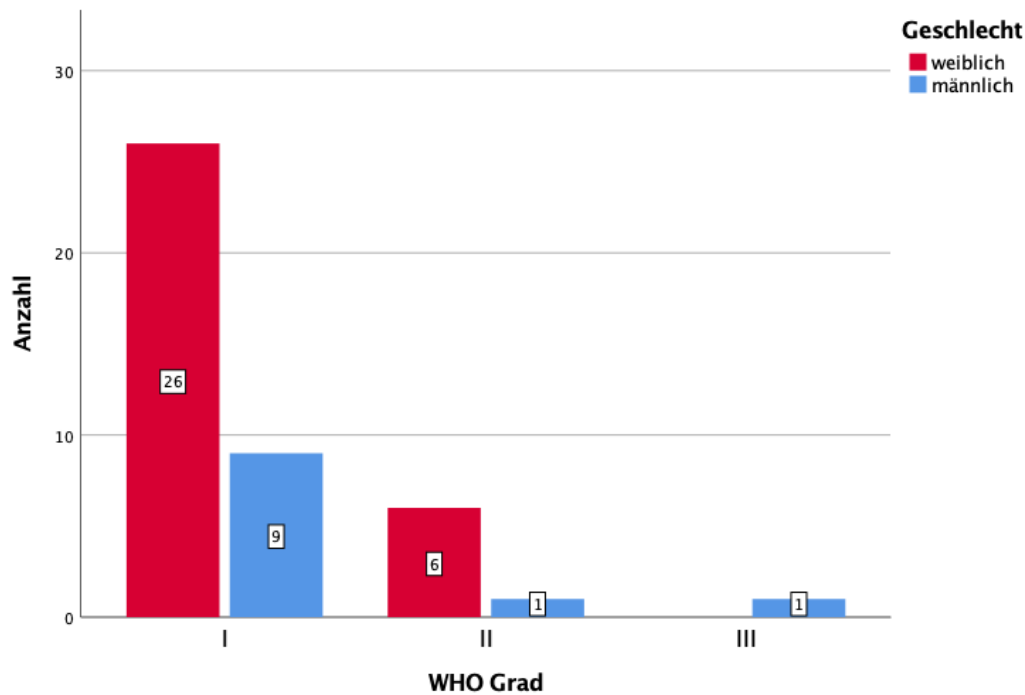


Abbildung 11: Verteilung der WHO Grade unter Berücksichtigung der Clustervariable Geschlecht im untersuchten Patientenkollektiv



Bei den 43 untersuchten Tumorproben handelte es sich bei 35 Fällen (81,4 %) um einen WHO Grad I, gefolgt von 7 Fällen (16,3 %) mit dem WHO Grad II. Lediglich ein männlicher Patient (2,3 %) war von einem Meningeom WHO Grad III betroffen.

Bei den WHO Grad I und II Meningeomen waren mehrheitlich Frauen betroffen. Die Relation von Frauen zu Männern lag beim WHO Grad I bei 2,9:1 und beim WHO Grad II bei 6:1.

Abbildung 12: Häufigkeiten der Tumorlokalisationen: Konvexität vs. Schädelbasis

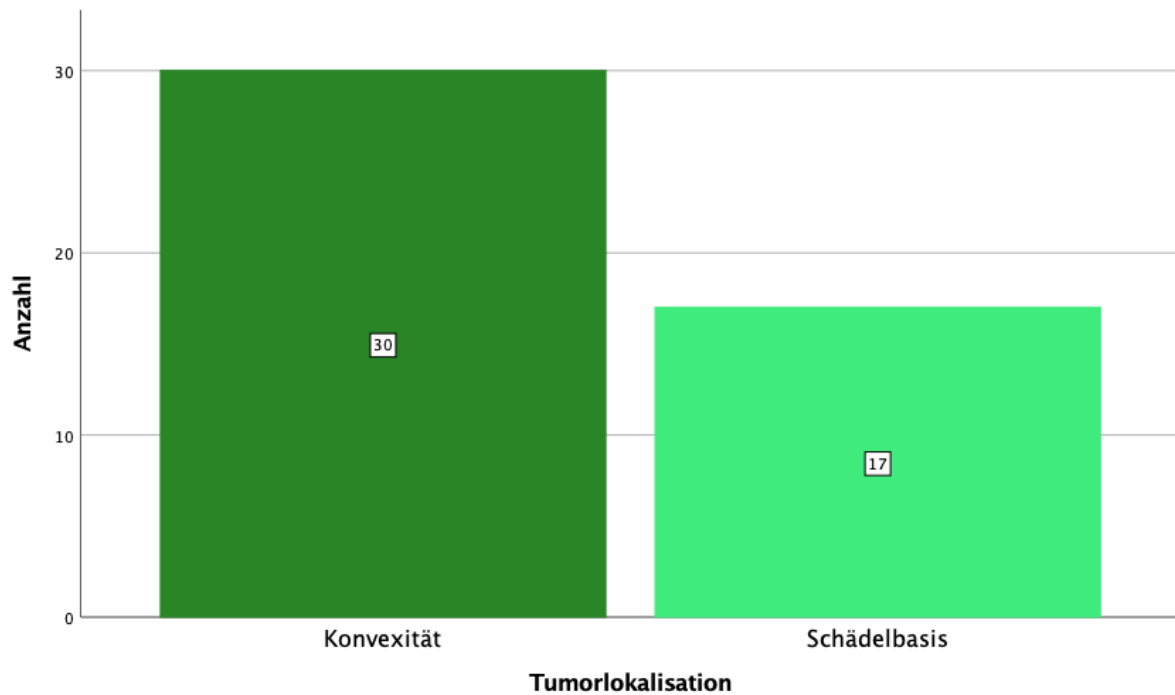
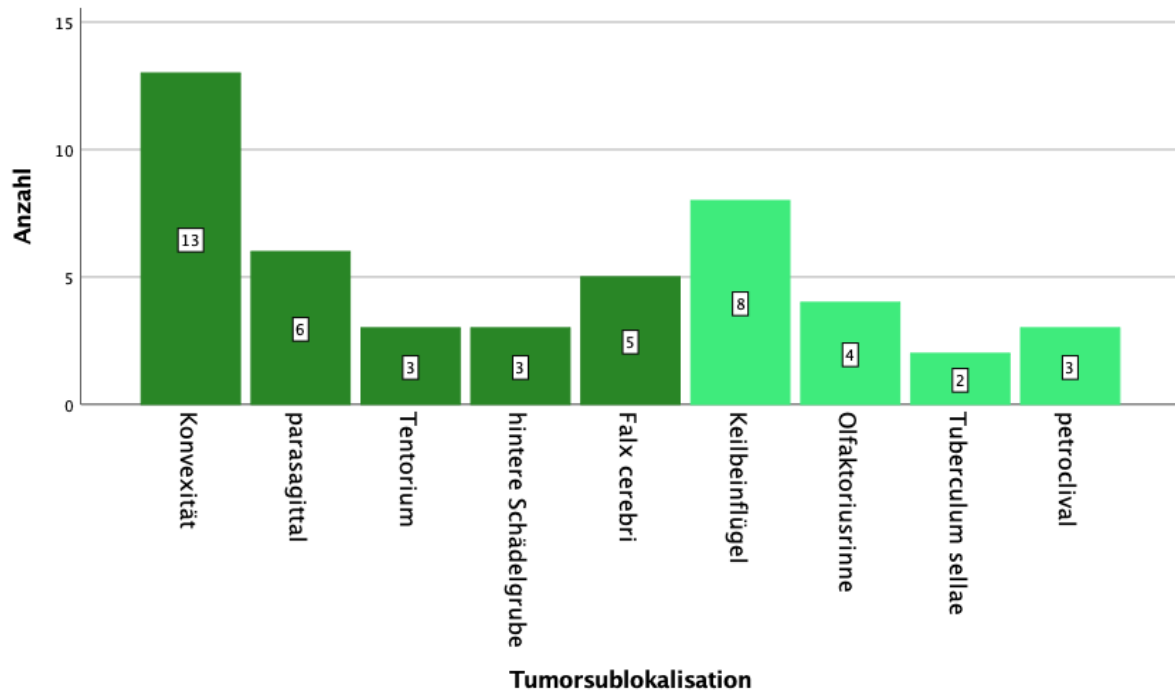


Abbildung 13: Häufigkeiten der Tumorsublokalisationen der Entitäten Konvexität vs. Schädelbasis



Die Einteilung der Lokalisationen der Meningeome erfolgte nach Ketter et al. (KETTER et al., 2008) mit der zusätzlichen Untergruppe „petroclival“ im Bereich der Schädelbasistumore (siehe Abbildung 13). Insgesamt waren 40 der 43 Patienten von einem Meningeom betroffen, welches auf eine Lokalisation beschränkt war. Bei zwei Erkrankten fand sich ein Tumor an zwei und bei einem Patienten an drei Lokalisationen.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass der überwiegende Teil der Tumore (63,8 %) an der Konvexität zu finden war. Das Verhältnis zwischen Tumoren der Konvexität und der Schädelbasis betrug 1,76:1. Die Tumore der Konvexität kann man wiederum in die fünf Untergruppen Konvexität, parasagittal, Tentorium, hintere Schädelgrube und Falx cerebri einteilen. Ein geringerer Teil der Meningeome war an der Schädelbasis lokalisiert (36,2 %), wo wiederum zwischen Keilbeinflügel, Olfaktoriusrinne, Tuberculum sellae und petroclival zu differenzieren war.

Abbildung 14: Präsentation der Tumore (Erstdiagnose vs. Rezidiv) im untersuchten Patientenkollektiv

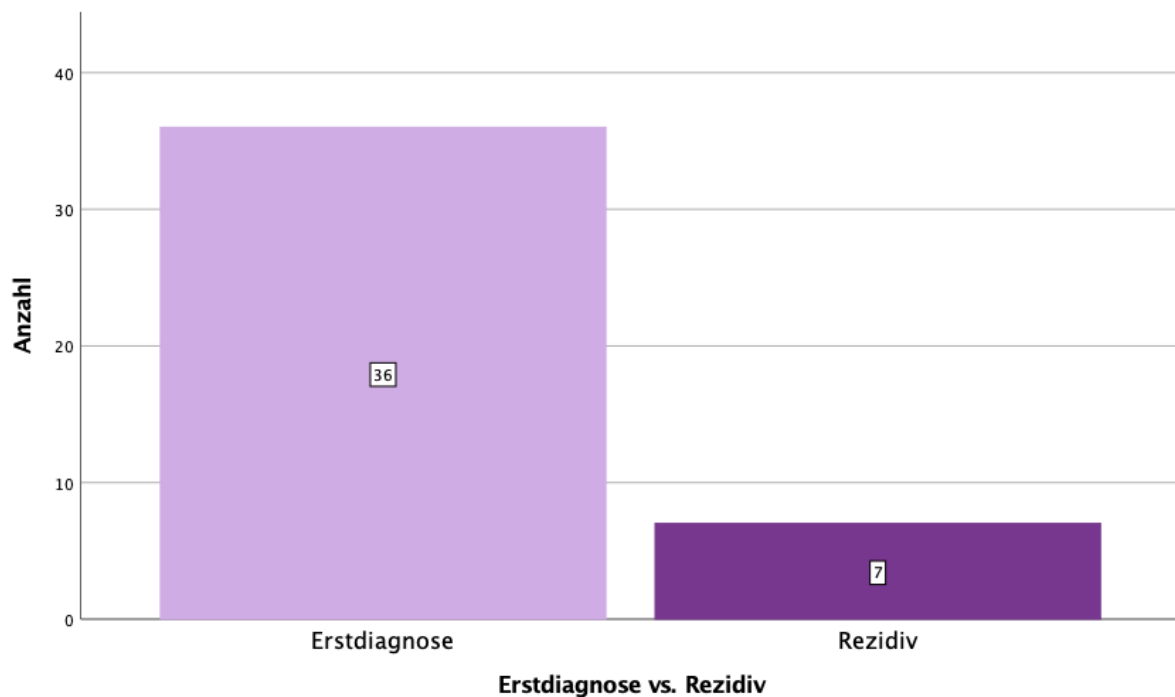
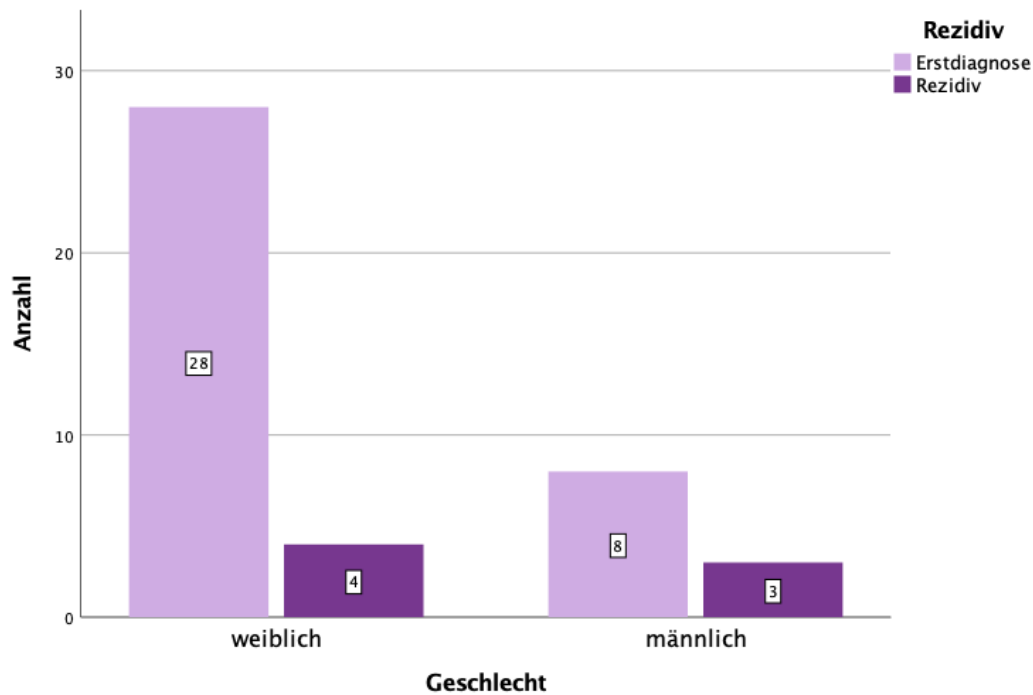


Abbildung 15: Geschlechtsverteilung unter Berücksichtigung der Clustervariable Rezidiv im untersuchten Patientenkollektiv



Insgesamt handelte es sich bei 36 (83,7 %) der untersuchten Meningeome um eine Erstdiagnose und bei 7 (16,3 %) Tumore um ein Rezidiv. Bezogen auf die Patientinnen entfielen 28 (87,5 %) auf Erstdiagnosen und 4 (12,5 %) auf Rezidive. Bei einer näheren Betrachtung der männlichen Patientenkohorte waren 8 Meningeome (72,7 %) erstdiagnostizierte Tumore und 3 (27,3 %) waren Rezidivtumore.

Die mittlere Zeitspanne, bis ein Rezidivtumor nach initialer Tumorresektion auftrat (time to progression; TTP), lag bei 100 Monaten (8,3 Jahren), der Median bei 86 Monaten (7,2 Jahren).

Abbildung 16: Altersverteilung unter Berücksichtigung der Clustervariable Rezidiv im untersuchten Patientenkollektiv

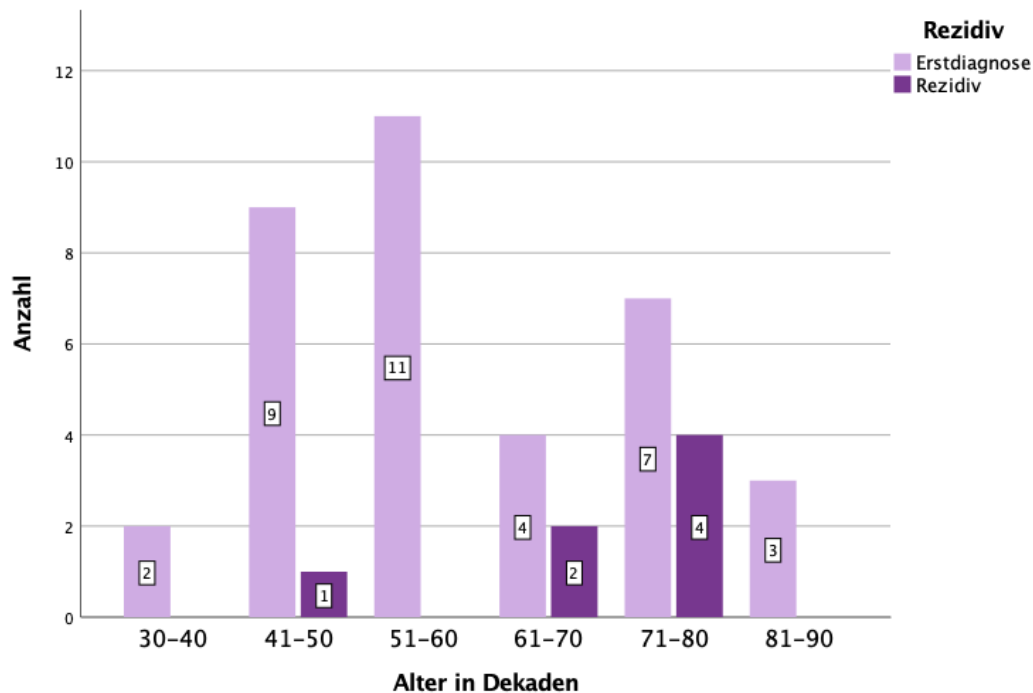
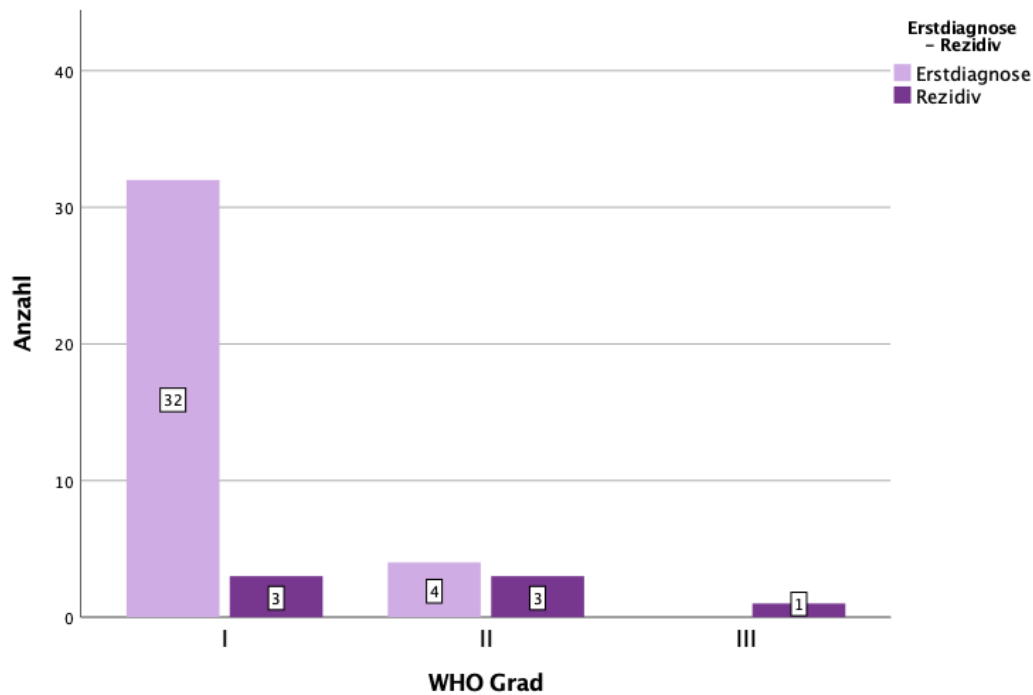


Tabelle 18: Vergleich der Altersverteilung zwischen Erstdiagnosen und Rezidiven im untersuchten Patientenkollektiv

Deskriptive Statistik						
Rezidiv		N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.-Abweichung
Erstdiagnose	Alter der Patienten	36	32,00	89,00	60,0556	14,06301
	Gültige Werte (Listenweise)	36				
Rezidiv	Alter der Patienten	7	48,00	80,00	70,1429	11,02162
	Gültige Werte (Listenweise)	7				

Das mittlere Patientenalter bei der Erstdiagnose lag bei etwa 60 Jahren, wohingegen dieser Wert bei der Detektion von Rezidiven im Mittel 10 Jahr später lag. Die meisten primär diagnostizierten Meningeome traten in der Alterskohorte der 51- bis 60-Jährigen auf (30,6 %), bei den Rezidivtumoren lag der Gipfel in der Gruppe der 71- bis 80-Jährigen (57,14 %).

Abbildung 17: Einteilung der Tumore nach WHO Graden unter Berücksichtigung der Clustervariable Rezidiv im untersuchten Patientenkollektiv



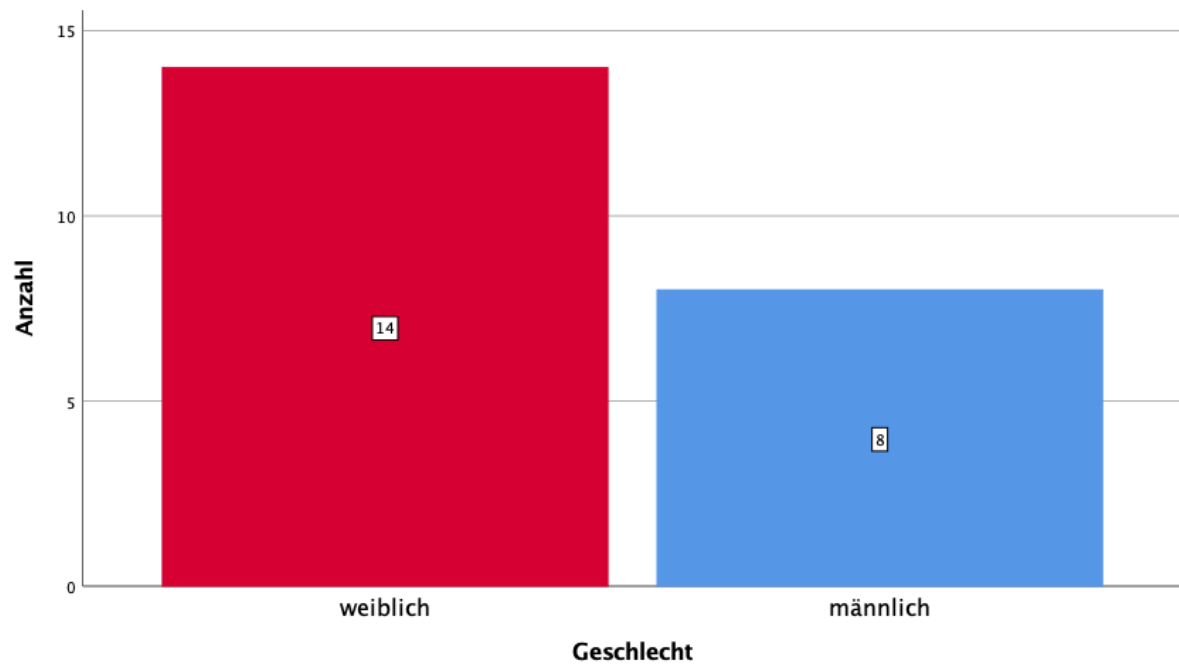
Die überwiegende Anzahl der Erstdiagnosen wurde mit dem WHO Grad I (32 Tumore) klassifiziert, gefolgt von 4 Tumoren, welche auf den WHO Grad II entfielen. Bei den Rezidiven zeigte sich der Unterschied zwischen den WHO Graden weit weniger ausgeprägt. Je 3 Meningeome lagen im Bereich des WHO Grads I und II und ein Tumor entsprach dem WHO Grad III.

4.2 Kollektiv der gesunden Probanden

Tabelle 19: Kollektiv der gesunden Probanden (Geschlecht: w: weiblich; m: männlich; Einheit des Probandenalters: Jahre)

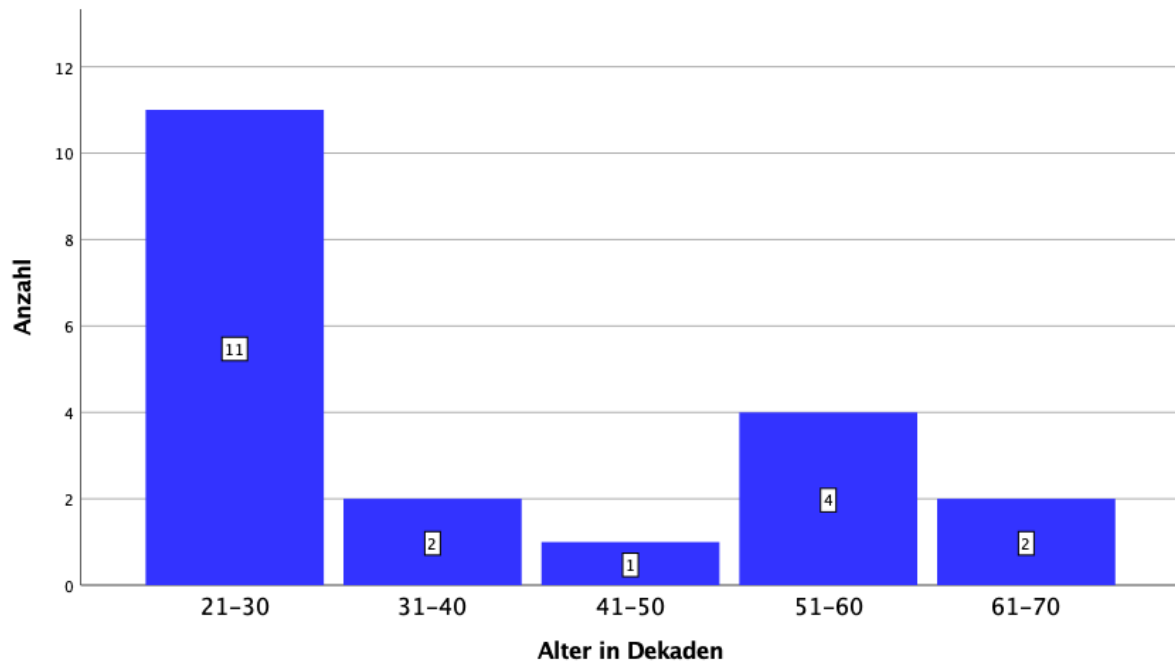
Nummer	Geschlecht	Alter
1	m	28
2	m	26
3	m	53
4	m	34
5	m	23
6	m	65
7	m	30
8	m	62
9	w	23
10	w	27
11	w	55
12	w	24
13	w	22
14	w	23
15	w	42
16	w	51
17	w	31
18	w	29
19	w	24
20	w	57

Abbildung 18: Geschlechtsverteilung im untersuchten Kollektiv der gesunden Probanden



Das Geschlechtsverhältnis zwischen Frauen und Männern lag bezogen auf das Kollektiv der gesunden Probanden bei 1,75:1 (14 Frauen und 8 Männer).

Abbildung 19: Altersverteilung im untersuchten Kollektiv der gesunden Probanden



Das Probandenalter erstreckte sich auf den Bereich zwischen 22 und 65 Jahren, wobei der Mittelwert bei 36,5 Jahren und der Median bei 29,5 Jahren lag. Die Standardabweichung lag bei 14,52 Jahren. Der Altersmittelwert bei den Frauen betrug 34 Jahre und bei den Männern 40,2 Jahre.

4.3 Expressionsmuster der microRNAs 21, 34a, 200a und 409

Tabelle 20: Relative Expressionen der microRNAs 21, 34a, 200a und 409 im Tumorgewebe (T) und im Blut (B) im untersuchten Patientenkollektiv normalisiert auf die RNU6B

Nummer	21 (T)	34a (T)	200a (T)	409 (T)	21 (B)	34a (B)	200a (B)	409 (B)
1	0,0270	0,2382	0,0015	0,0145	3,9109	18,0245	1,9020	44,6652
2	0,0345	0,3041	0,0040	0,7488	5,8757	9,7745	3,1160	0,8793
3	0,0261	0,1049	0,0026	0,0013	2,0116	0,5241	2,6735	12,8183
4	0,1872	0,6364	0,0227	0,0739	3,7626	2,6162	9,1726	17,1389
5	0,1071	1,0486	0,0167	0,1683	1,3093	1,0094	1,2901	3,0846
6	0,1453	1,7292	0,0482	0,1193	0,8159	0,4911	0,8336	4,4028
7	0,0720	0,4933	0,3756	0,9734	31,2695	29,8314	411,1438	172,3453
8	0,0364	1,0694	0,0346	0,9627	7,5182	0,2127	6,1672	48,9070
9	0,0483	0,1146	0,0016	0,1082	2,3701	1,0480	3,7909	24,4668
10	0,0657	0,3015	0,0005	0,0378	3,5074	1,6972	8,8726	4,1589
11	0,1114	0,1782	0,0068	0,6580	1,7374	0,7422	5,1137	4,7659
12	0,0208	0,6560	0,0168	0,0047	1,2388	0,1326	1,6914	3,1570
13	0,0542	0,4184	0,0026	0,0521	2,2769	0,9001	3,2437	1,4046
14	0,1576	1,0748	0,0185	0,6163	4,6630	1,2363	5,2612	4,6439
15	0,0267	0,8742	0,0058	0,3498	5,7530	19,6033	28,7411	41,4788
16	0,0443	1,3467	0,0261	0,7982	5,5680	2,1288	5,7891	11,5110
17	0,0210	1,1074	0,0090	0,4169	2,6995	0,2356	2,0372	2,2746
18	0,2975	4,8117	0,0360	4,3230	8,5395	3,8665	12,4258	1,9558
19	0,0479	0,7393	0,0209	0,4926	3,7021	2,5577	11,3560	6,7587
20	0,0309	1,0521	0,0259	0,2493	6,8970	2,2165	4,5216	7,7020
21	0,0643	0,8161	0,0419	0,1141	1,5885	0,9255	2,6058	3,4657
22	0,0140	0,1686	0,0043	0,3287	3,9347	3,1343	10,0061	30,3835
23	0,0244	0,0989	0,0008	0,0021	2,3779	0,6891	4,3330	3,1147
24	0,0062	0,0310	0,0004	0,0504	0,8663	0,5159	1,3758	0,9745
25	0,0168	0,4601	0,0018	0,0017	2,3540	1,6627	1,9468	2,5420
26	0,0106	0,1997	0,0016	0,3856	2,1651	0,5680	5,9917	1,4672
27	0,0052	0,0604	0,0008	0,1819	3,7599	0,9125	2,7110	6,0870
28	0,0103	0,1285	0,0024	0,0657	4,1716	0,2592	3,4709	45,3514
29	0,0698	1,0171	0,0034	0,2131	2,8562	1,4145	4,2611	4,2071
30	0,0335	0,2474	0,0082	0,0117	3,2888	0,8289	3,4329	4,9548
31	0,0452	1,4580	0,0104	0,3626	0,5384	0,4769	0,5760	1,8244
32	0,0200	1,1064	0,0111	0,3152	1,0221	8,0588	2,3068	3,1342
33	0,0742	1,1131	0,0162	0,1726	0,8201	0,7121	3,0728	1,7365
34	0,0305	0,4308	0,0085	0,2528	1,0430	6,8491	0,5143	2,5553
35	0,0337	2,1922	0,0525	1,0379	0,7184	0,2071	0,5448	0,6247

Nummer	21 (T)	34a (T)	200a (T)	409 (T)	21 (B)	34a (B)	200a (B)	409 (B)
36	0,0388	1,3055	0,0224	0,7020	0,6925	0,4689	4,6027	16,4351
37	0,0524	0,6892	0,0060	0,0542	1,2039	0,4938	1,8611	1,3893
38	0,0252	0,3025	0,0027	0,1450	1,5471	0,1143	0,5458	0,2809
39	0,0835	0,4267	0,0078	0,4038	3,3195	0,3253	0,9005	0,2342
40	0,0975	0,3891	0,0098	0,2962	1,1883	0,9542	2,7681	1,5897
41	0,0515	0,6892	0,0094	1,6591	4,4046	1,0760	2,1748	18,7464
42	0,0969	0,4009	0,0146	0,4035	0,4096	0,2506	0,3900	0,4750
43	0,0240	0,8470	0,0159	0,1490	0,3650	0,0808	0,6290	0,4048

Tabelle 21: Relative Expressionen der microRNAs 21, 34a, 200a und 409 im Blut im untersuchten Probandenkollektiv normalisiert auf die RNU6B

Nummer	21	34a	200a	409
1	11,5781	9,7811	8,1842	7,4224
2	3,5163	1,8758	1,6123	6,9431
3	0,4145	0,4772	0,3125	16,6390
4	1,6471	0,3198	1,1728	49,6279
5	1,2615	0,5250	1,4581	0,6055
6	0,8455	1,4184	1,5658	0,9802
7	8,9296	5,8750	0,6283	4,2834
8	9,4607	8,3041	0,8538	7,3504
9	2,0367	0,2393	1,2376	1,1816
10	4,2694	1,3650	6,4309	8,2097
11	5,4588	2,0763	3,2934	2,9140
12	3,4417	1,4727	4,5528	18,4592
13	9,1800	6,1639	8,0728	8,8257
14	0,2152	0,2251	0,3494	0,8757
15	0,6324	0,1283	9,7514	1,5464
16	2,0825	0,5704	11,8138	5,2812
17	8,1683	2,8268	1,8606	3,9019
18	12,0364	1,7869	2,0704	4,2916
19	23,5128	1,6082	2,8186	7,0043
20	9,7320	1,0026	0,9048	5,9118

Die relativen Expressionen der untersuchten microRNAs bezogen auf die RNU6B als endogene Kontrolle in Blut und Tumor wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung untersucht (siehe Tabelle 22 und 23). Keiner der untersuchten Parameter zeigte sich als normalverteilt.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der rangbasierte Spearman-Rho-Korrelationskoeffizient als Parameter benutzt, um mögliche Korrelationen zu bestimmen.

Tabelle 22: Untersuchung der Expressionsmuster der microRNAs auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test im untersuchten Patientenkollektiv

	Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz
Expression der microRNA 21 im Tumor (normalisiert auf die RNU6B)	,753	43	,000
Expression der microRNA 34a im Tumor (normalisiert auf die RNU6B)	,695	43	,000
Expression der microRNA 200a im Tumor (normalisiert auf die RNU6B)	,310	43	,000
Expression der microRNA 409 im Tumor (normalisiert auf die RNU6B)	,539	43	,000
Expression der microRNA 21 im Blut (normalisiert auf die RNU6B)	,498	43	,000
Expression der microRNA 34a im Blut (normalisiert auf die RNU6B)	,509	43	,000
Expression der microRNA 200a im Blut (normalisiert auf die RNU6B)	,183	43	,000
Expression der microRNA 409 im Blut (normalisiert auf die RNU6B)	,456	43	,000

Tabelle 23: Untersuchung der Expressionsmuster der microRNAs auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test im untersuchten Probandenkollektiv

	Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz
Expression der microRNA 21 im Blut (normalisiert auf die RNU6B)	,840	20	,004
Expression der microRNA 34a im Blut (normalisiert auf die RNU6B)	,748	20	,000
Expression der microRNA 200a im Blut (normalisiert auf die RNU6B)	,806	20	,001
Expression der microRNA 409 im Blut (normalisiert auf die RNU6B)	,605	20	,000

In der untersuchten Population befand sich nur ein Meningeom des WHO Grads III, was eine sinnvolle Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests in diesem Fall nicht erlaubt. Dieser Test wird bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen in einer beliebigen quantitativen Verteilung eingesetzt. Daher wurde die Unterscheidung möglicher Expressionsunterschiede der microRNAs bzw. Chromosomenaberrationen zwischen Tumoren des WHO Grads I und II mit dem Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben und einer beliebigen quantitativen Verteilung untersucht. Ergebnisse werden ab einem Niveau von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

4.3.1 Expression der microRNA 21

Zu diesem Zweck wurde mittels den relativen Expressionen untersucht, ob eine signifikante Korrelation der Expression der microRNA 21 zwischen Tumor und Blut besteht. Dies zeigte sich als nicht zutreffend ($p = 0,821$). Auch ein möglicher Zusammenhang der Expression zwischen Tumor bzw. Blut und dem Tumolvolumen (Tumor: $p = 0,467$; Blut: $p = 0,372$) konnte nicht detektiert werden.

Mittels des Mann-Whitney-U-Tests bei unabhängigen Stichproben konnte sowohl im Vergleich zwischen den Geschlechtern (männlich, weiblich) (Tumor: $p = 0,816$; Blut: $p = 0,276$) als auch im Vergleich zwischen den Altersgruppen der unter 60-Jährigen und der älter/gleich 60-Jährigen (Tumor: $p = 0,865$, Blut: $p = 0,466$) kein signifikanter Expressionsunterschied der microRNA 21 in Tumor bzw. Blut detektiert werden. Auch bei der Korrelation der microRNA 21 mit dem Alter konnte kein signifikantes Ergebnis erzielt werden (Tumor: $p = 0,746$, Blut: $p = 0,125$).

Mittels des Mann-Whitney-U-Tests bei unabhängigen Stichproben konnte kein signifikanter Unterschied der Expression der microRNA 21 zwischen den WHO Graden I und II bezogen auf Tumor ($p = 0,692$) und Blut ($p = 0,508$) festgestellt werden.

Zwischen den Kategorien Erstdiagnose vs. Rezidiv (Tumor: $p = 0,860$; Blut: $p = 0,410$) und den Lokalisationsentitäten Konvexität vs. Schädelbasis (Tumor: $p = 0,212$; Blut: $p = 0,222$) zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Dies traf auch auf eine neu gefasste Einteilung (siehe Abschnitt 4.4.2) der Konvexität und deren Gegenüberstellung zu Schädelbasistumoren zu (Tumor: $p = 0,114$; Blut: $p = 0,451$).

Der blutbasierte Vergleich der Expression der microRNA 21 zwischen Patienten und gesunden Probanden ergab keine diesbezügliche Signifikanz im rangbasierten Mann-Whitney-U-Test ($p = 0,114$).

4.3.2 Expression der microRNA 34a

Bei dem Expressionsvergleich der microRNA 34a zwischen Tumor und Blut konnte keine signifikante Korrelation erzielt werden ($p = 0,873$). Dies traf auch für einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von Tumorgewebe bzw. Blut und dem Tumolvolumen zu (Tumor: $p = 0,610$; Blut: $p = 0,178$).

Bei dem Vergleich zwischen den Geschlechtern (männlich, weiblich) (Tumor: $p = 0,794$; Blut: $p = 0,450$) und der Gegenüberstellung der Altersgruppen der unter 60-Jährigen und der älter/gleich 60-Jährigen (Tumor: $p = 0,716$; Blut: $p = 0,319$) wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Expressionen der microRNA 34a in Tumor bzw. Blut berechnet. Dies traf auch für die Korrelation mit dem Alter zu (Tumor: $p = 0,263$; Blut: $p = 0,163$).

Bei den WHO Graden I und II konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Expressionen der microRNA 34a in Tumor ($p = 0,099$) und Blut ($p = 0,446$) detektiert werden.

Des Weiteren konnten zwischen den Kategorien Erstdiagnose vs. Rezidiv (Tumor: $p = 0,187$; Blut: $p = 0,097$) und Konvexität vs. Schädelbasis (Tumor: $p = 0,572$; Blut: $p = 0,844$) keine Signifikanz hinsichtlich eines Expressionsunterschiedes errechnet werden. Dies konnte auch bei einer neuen Einteilung (siehe Abschnitt 4.4.2) der Konvexitätstumore im Vergleich zu den Schädelbasismeningeomen bestätigt werden (Tumor: $p = 0,166$; Blut: $p = 0,215$).

Die microRNA 34a im Tumor zeigte eine hochsignifikante Korrelation ($p \leq 0,001$) mit den Ergebnissen möglicher Aberrationen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) für den Chromosomenabschnitt 1p.

Bei dem Expressionsvergleich der microRNA 34a im rangbasierten Mann-Whitney-U-Test zeigte sich zwischen gesunden Probanden und Patienten kein signifikanter Unterschied ($p = 0,434$).

4.3.3 Expression der microRNA 200a

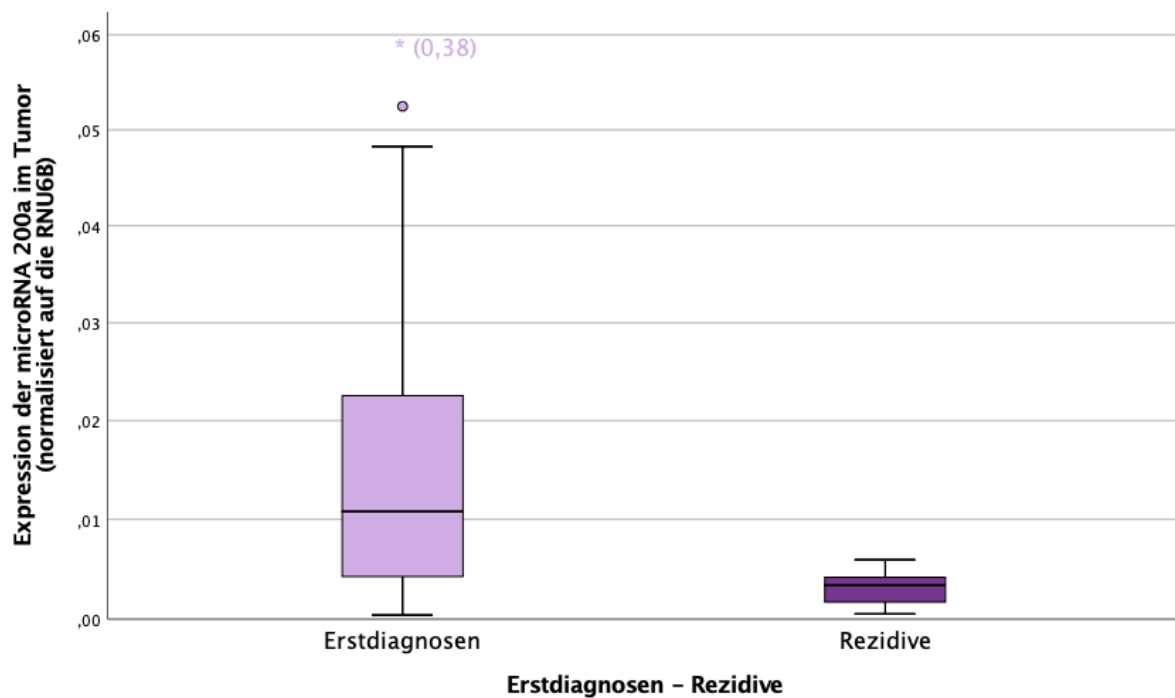
Bei dem Vergleich zwischen Blut und Tumor konnte keine signifikante Korrelation zwischen den Expressionen der microRNA 200a erzielt werden ($p = 0,674$). Dies bezog sich auch auf eine mögliche Korrelation zwischen der Expression von Tumor bzw. Blut mit dem Tumolvolumen (Tumor: $p = 0,596$; Blut: $p = 0,490$).

Bei dem Vergleich zwischen den Geschlechtern (männlich, weiblich) (Tumor: $p = 0,671$; Blut: $p = 0,816$) und einer Differenzierung des Patientenalters in Gruppen der unter 60-Jährigen und der älter/gleich 60-Jährigen (Tumor: $p = 0,224$; Blut: $p = 0,528$) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Expressionen der microRNA 200a in Tumor bzw. Blut detektiert werden. Auch bei einer Korrelation der Expressionen der microRNA 200a mit dem Alter konnte kein signifikantes Ergebnis erzielt werden (Tumor: $p = 0,886$; Blut: $p = 0,406$).

Bei einem möglichen Unterschied der microRNA Expressionen zwischen den WHO Graden I und II wurde keine Signifikanz festgestellt (Tumor: $p = 0,257$; Blut: $p = 0,487$).

Allerdings zeigte sich die microRNA 200a im Tumor bei Rezidiven (Median: 0,0034, Interquartilsabstand: 0,0027) signifikant geringer exprimiert als bei erstdiagnostizierten Meningeomen (Median: 0,0108, Interquartilsabstand: 0,0191) ($p = 0,009$). Der Median betrug somit in der Rezidivkohorte 31,5 % im Vergleich zu dem Äquivalent in der Kohorte der Erstdiagnosen. Eine entsprechend signifikant verringerte Expression der microRNA 200a bei Rezidiven konnte bei den Blutuntersuchungen nicht gefunden werden ($p = 0,410$).

Abbildung 20: Vergleich der Expressionsmuster der microRNA 200a zwischen erstdiagnostizierten Tumoren und Rezidiven ($p = 0,009$)



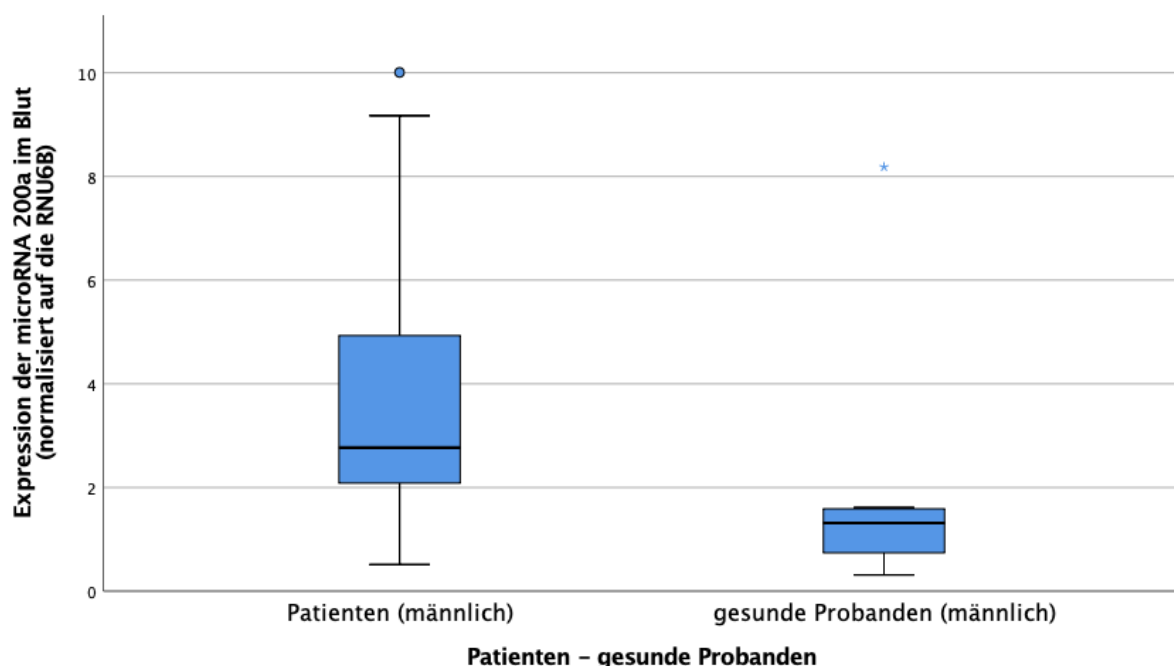
Es zeigte sich kein Unterschied der microRNA Expression zwischen Tumoren der Konvexität und der Schädelbasis (Tumor: $p = 0,990$; Blut: $p = 0,763$). Auch ein Vergleich der Konvexität nach der neuen Definition der Einteilung ihrer Sublokalisationen mit Meningeomen der Schädelbasis (siehe Abschnitt 4.4.2) ergab keinen signifikanten Unterschied (Tumor: $p = 0,244$; Blut: $p = 0,274$).

Allerdings konnte eine deutliche Signifikanz ($p \leq 0,001$) bei der Korrelation der microRNA 200a im Tumor mit den Ergebnissen möglicher Aberrationen der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) für den kurzen Arm des Chromosoms 1 (1p) detektiert werden.

Im rangbasierten Mann-Whitney-U-Test zeigte sich die microRNA im Blut von Meningeompatienten höher exprimiert als bei gesunden Probanden, allerdings in nicht signifikantem Ausmaß ($p = 0,114$). Bei einer geschlechtsspezifischen Differenzierung konnte bei Männern diesbezüglich eine Signifikanz erzielt werden ($p = 0,016$).

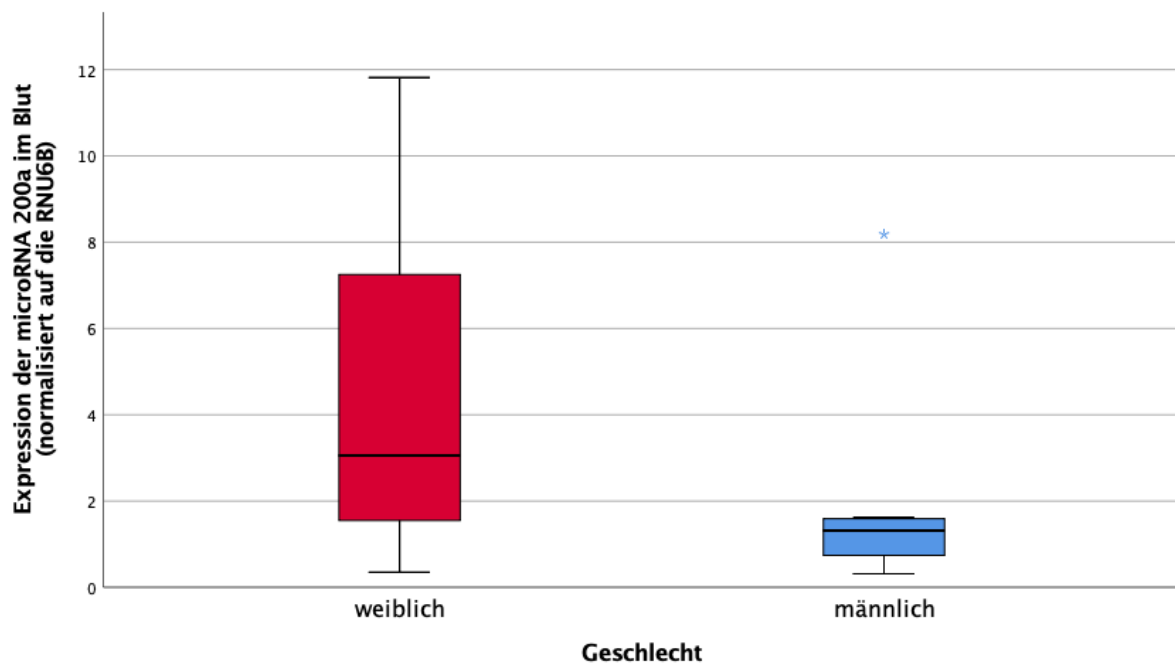
Der Medianwert der Expression der microRNA 200a im Blut betrug bei den Patienten 2,7681 und war damit 2,1-fach höher als bei den gesunden Probanden (1,3155). Der Interquartilsabstand betrug bei der erkrankten Kohorte 3,4001 und bei den gesunden Vergleichspersonen 0,9160.

Abbildung 21: Vergleich der Expressionsmuster der microRNA 200a im Blut zwischen gesunden Probanden und Patienten (männliche Kohorte, $p = 0,016$).



Bei einem geschlechtsspezifischen Vergleich konnte eine höhere Expression der microRNA 200a bei gesunden Probandinnen detektiert werden. Eine diesbezügliche Signifikanz wurde knapp verpasst ($p = 0,057$). Der Medianwert bei den Frauen lag hier bei 3,0560 und damit 2,32-fach so hoch wie bei den Männern (1,3155). Der Interquartilsabstand betrug 6,2689 vs. 0,9160.

Abbildung 22: Vergleich der Expressionsmuster der microRNA 200a im Blut zwischen gesunden Probandinnen und Probanden ($p = 0,057$)



4.3.4 Expression der microRNA 409

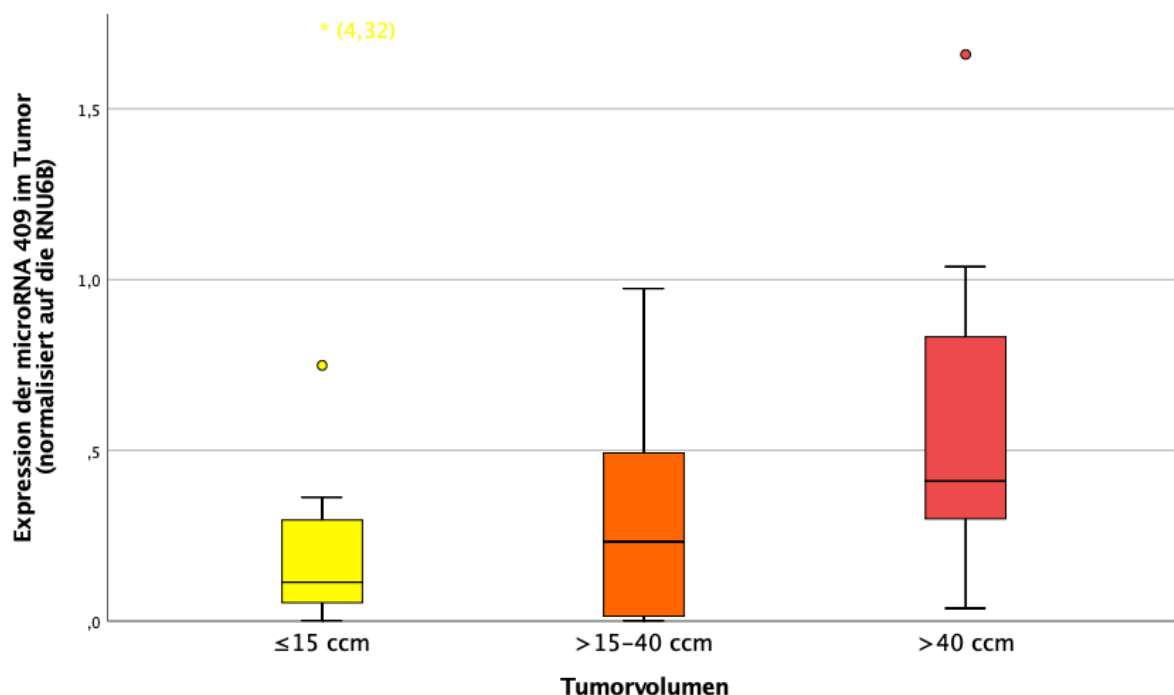
Bei dem Expressionsvergleich der microRNA 409 zwischen Tumor und Blut konnte keine signifikante Korrelation erzielt werden ($p = 0,827$).

Bei dem Vergleich der microRNA 409 im Tumor mit dem jeweiligen Tumolvolumen konnte eine signifikante Korrelation festgestellt werden ($p = 0,043$). Beim Vergleich der microRNA 409 im Blut mit dem Tumolvolumen lag keine signifikante Korrelation vor ($p = 0,412$).

Der Kruskal-Wallis-Test zur zusätzlichen Unterscheidung der Expression der microRNA 409 über drei Entitäten von aufsteigenden Tumorgrößen ($\leq 15 \text{ cm}^3$, $> 15 \text{ cm}^3$ bis 40 cm^3 und $> 40 \text{ cm}^3$) kam zum Ergebnis, dass entsprechend zunehmender Tumorgrößen in der beobachteten Gruppe auch die jeweilige Expression der microRNA 409 im Tumor signifikant erhöht war ($p = 0,031$).

In der Gruppe der Tumore mit der geringsten Größe lag der Median der Expression der microRNA 409 bei 0,1141. Für die mittlere Gruppe betrug dieser Wert 0,2329. Bei den größten Tumoren lag der Median bei 0,4104, somit war dieser Wert 3,6-fach so hoch wie das Äquivalent in der Gruppe der kleinsten Tumore. Der Interquartilsabstand betrug jeweils 0,2525, 0,5114 und 0,6230.

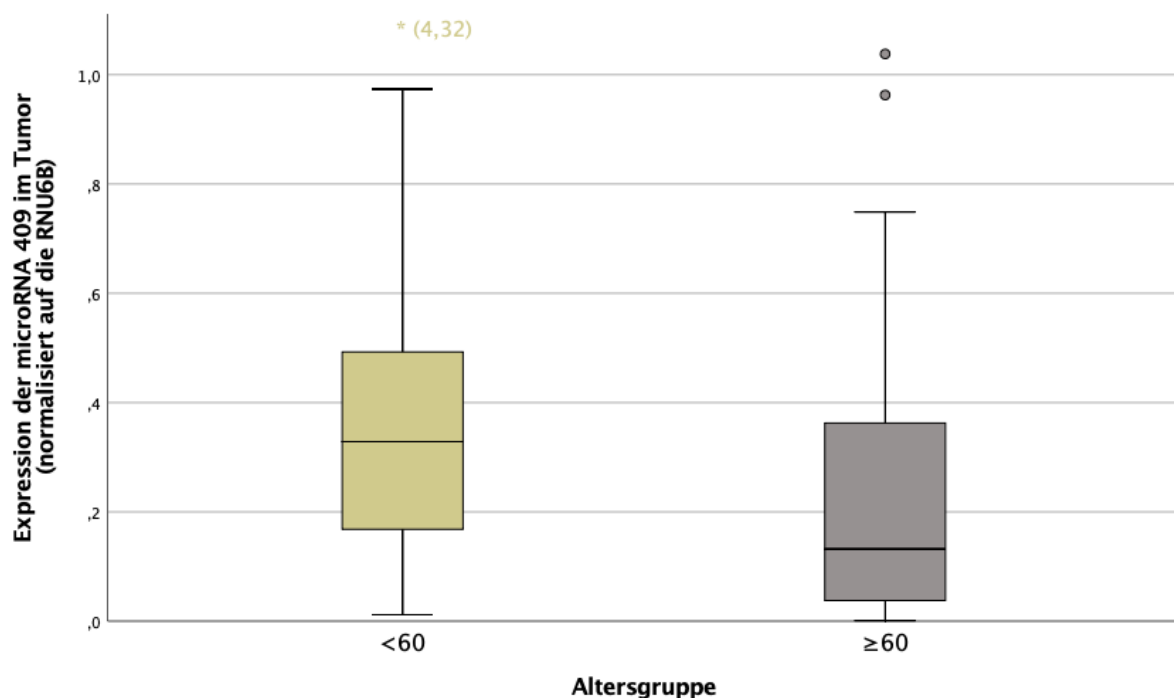
Abbildung 23: Vergleich der Expressionsmuster der microRNA 409 zwischen drei Gruppen von aufsteigenden Tumorgrößen mittels Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben (Gruppe 1: $\leq 15 \text{ cm}^3$; Gruppe 2: $> 15 \text{ cm}^3$ bis 40 cm^3 ; Gruppe 3: $> 40 \text{ cm}^3$) ($p = 0,031$)



Die Expression der microRNA 409 im Tumor korrelierte signifikant negativ mit dem Alter ($p = 0,012$). Dies war bei den Blutuntersuchungen nicht der Fall ($p = 0,588$).

Des Weiteren konnte eine signifikant höhere Expression der microRNA 409 im Tumor bei Patienten unter 60 Jahren im Vergleich zu Patienten detektiert werden, die 60 Jahre oder älter waren ($p = 0,046$). Der Median lag bei der Gruppe der Patienten, die jünger als 60 Jahre waren bei 0,3287 und war damit 2,49-fach so hoch wie in der älteren Kohorte (0,1322). Der Interquartilsabstand betrug hier 0,4165 bzw. 0,3940. Dieser signifikante Unterschied fand im Blut keine Entsprechung ($p = 0,981$).

Abbildung 24: Vergleich der Expressionsmuster der microRNA 409 zwischen zwei Altersgruppen (Gruppe 1: < 60-Jährige; Gruppe 2: ≥ 60 -Jährige) ($p = 0,046$)



Ein signifikanter Expressionsunterschied der microRNA 409 lag weder zwischen Tumoren der WHO Grade I und II (Tumor: $p = 0,792$; Blut: $p = 0,257$) noch zwischen Erstdiagnosen und Rezidiven vor (Tumor: $p = 0,223$; Blut: $p = 0,962$). Dies traf auch für den Vergleich zwischen den Geschlechtern (weiblich, männlich) zu (Tumor: $p = 0,483$; Blut: $p = 0,501$).

Auch zwischen den Lokalisationsentitäten Konvexität vs. Schädelbasis, jeweils bezogen auf Blut und Tumor, konnte kein Unterschied der Expression der microRNA 409 festgestellt werden (Tumor: $p = 0,906$; Blut: $p = 0,609$).

Dies trifft auch auf eine neu gebildete Einteilung (siehe Abschnitt 4.4.2) der Konvexitätsmeningeome im Vergleich zu Tumoren der Schädelbasis zu (Tumor: $p = 0,576$; Blut: $p = 0,827$).

Bei dem Vergleich der microRNA 409 im Tumor mit den Ergebnissen möglicher Aberrationen der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) für das Chromosom 14 konnte eine hochsignifikante Korrelation ($p \leq 0,001$) erreicht werden.

Bei einer Anwendung des rangbasierten Mann-Whitney-U-Tests konnte kein signifikanter Expressionsunterschied der microRNA 409 zwischen gesunden Probanden und Meningeompatienten detektiert werden ($p = 0,565$).

4.4 Aberrationen der Chromosomen 1, 9, 10, 14, 18 und 22

Im weiteren Verlauf werden Ergebnisse der chromosomalen Teilverluste bzw. Zugewinne auf der Basis klinischer Parameter vorgestellt.

Tabelle 24: Aberrationsmuster der untersuchten Chromosomen (Chr.);
(Angaben der durchschnittlichen Verluste bzw. Zugewinne pro untersuchter 200 Zellkerne in %;
kA: keine Angabe)

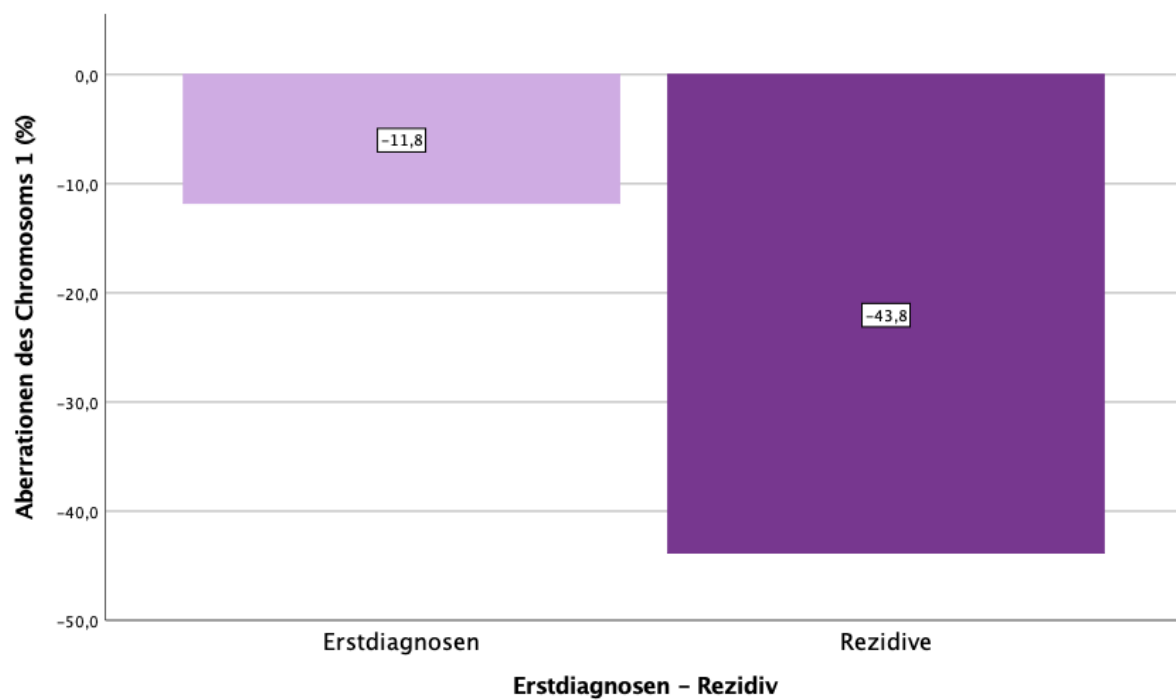
Nummer	Chr. 1	Chr. 9	Chr. 10	Chr. 14	Chr. 18	Chr. 22
1	0	0	0	-60	0	-70
2	-17,5	0	0	0	0	-88,5
3	-90	-52,5	0	-92	-92	-90
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	-10,5	0	-13
6	0	0	0	0	0	0
7	kA	kA	kA	kA	kA	kA
8	0	0	0	0	0	0
9	kA	kA	kA	kA	kA	kA
10	-70	0	-75	-65,5	-65,5	-70
11	-86	-15	-80,5	0	-19	-86
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	-10
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	-79
16	0	0	0	0	0	-79
17	0	0	0	0	0	-89
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	-57,5
20	0	0	0	0	0	-55
21	0	0	0	0	0	-10
22	-97	0	0	0	-92,5	0
23	-28	0	-44,5	-83,5	0	-28
24	-65	0	-68,5	0	-69,5	-65
25	-6	0	0	-89,5	0	-83
26	0	8	83,5	135,5	66,5	0
27	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	-7
29	0	0	0	0	0	0
30	-68,5	0	0	-84,5	0	-78
31	0	0	0	0	0	-67
32	0	0	0	0	0	-86
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0

Nummer	Chr. 1	Chr. 9	Chr. 10	Chr. 14	Chr. 18	Chr. 22
35	20	17	17	19	19	-57
36	0	0	0	9	15	-75,5
37	-72,5	0	0	-86,5	0	0
38	-7	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0
41	-88	0	0	0	0	-98
42	0	75,5	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	-58

4.4.1 Erstdiagnosen im Vergleich zu Rezidiven

Bei der Differenzierung zwischen Erstdiagnosen und Rezidiven konnte gezeigt werden, dass bei den Rezidivtumoren signifikant mehr Verluste des Chromosomenabschnittes 1p auftraten als bei den erstdiagnostizierten Meningeomen ($p = 0,013$).

Abbildung 25: Aberrationsvergleich des Chromosoms 1 zwischen erstdiagnostizierten Tumoren und Rezidiven ($p = 0,013$)

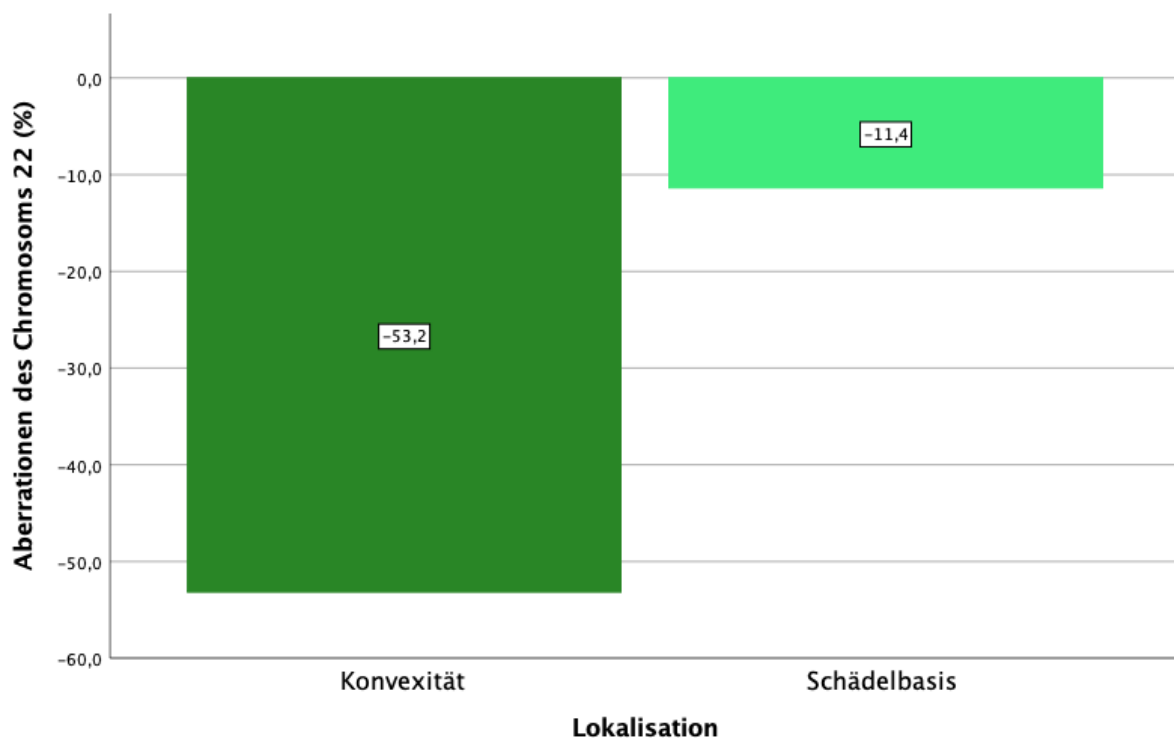


Bezogen auf alle anderen untersuchten Chromosomen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Erstdiagnosen und Rezidiven festgestellt werden (Chromosom 9: $p = 0,928$; Chromosom 10: $p = 0,627$; Chromosom 14: $p = 0,102$; Chromosom 18: $p = 0,237$; Chromosom 22: $p = 0,900$).

4.4.2 Tumore der Konvexität im Vergleich zur Schädelbasis

Die Einteilung möglicher Lokalisationen eines Meningeoms erfolgte nach Ketter et al. (KETTER et al., 2008) mit der zusätzlichen Untergruppe „petroclival“. Bei der Unterscheidung dieser beiden Kategorien im Bezug auf Chromosomenaberrationen konnten an der Konvexität signifikant mehr Verluste des Chromosoms 22 als an der Schädelbasis festgestellt werden ($p = 0,002$).

Abbildung 26: Aberrationsvergleich des Chromosoms 22 zwischen Tumoren der Konvexität und der Schädelbasis ($p = 0,002$)



Bei den anderen untersuchten Chromosomen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Tumoren der Konvexität und der Schädelbasis detektiert werden (Chromosom 1: $p = 0,211$; Chromosom 9: $p = 0,847$; Chromosom 10: $p = 0,679$; Chromosom 14: $p = 0,868$; Chromosom 18: $p = 0,679$).

Bei einer etwas anders gewichteten Differenzierung zwischen den Kategorien Konvexität und Schädelbasis, bei der die Unterkategorien Konvexität, parasagittal und Falx cerebri als Konvexität zusammengefasst und den anderen Kategorien als Schädelbasis (Tentorium, hintere Schädelgrube, Keilbeinflügel, Olfaktoriusrinne, Tuberculum sellae, petroclival) gegenübergestellt werden (neue Definition), konnte gezeigt werden, dass sowohl das Chromosom 22 ($p = 0,011$) als auch das Chromosom 1 ($p = 0,043$) an der Konvexität von signifikant mehr Verlusten behaftet ist als an der Schädelbasis. Die dargestellte Unterscheidung wurde durchgeführt, weil die Regionen Tentorium und

hintere Schädelgrube in unmittelbarer Umgebung der Schädelbasis lokalisiert sind und dieser deshalb auch zugeordnet werden können.

Abbildung 27: Aberrationsvergleich des Chromosoms 22 zwischen Tumoren der Konvexität und der Schädelbasis (neue Definition) ($p = 0,011$)

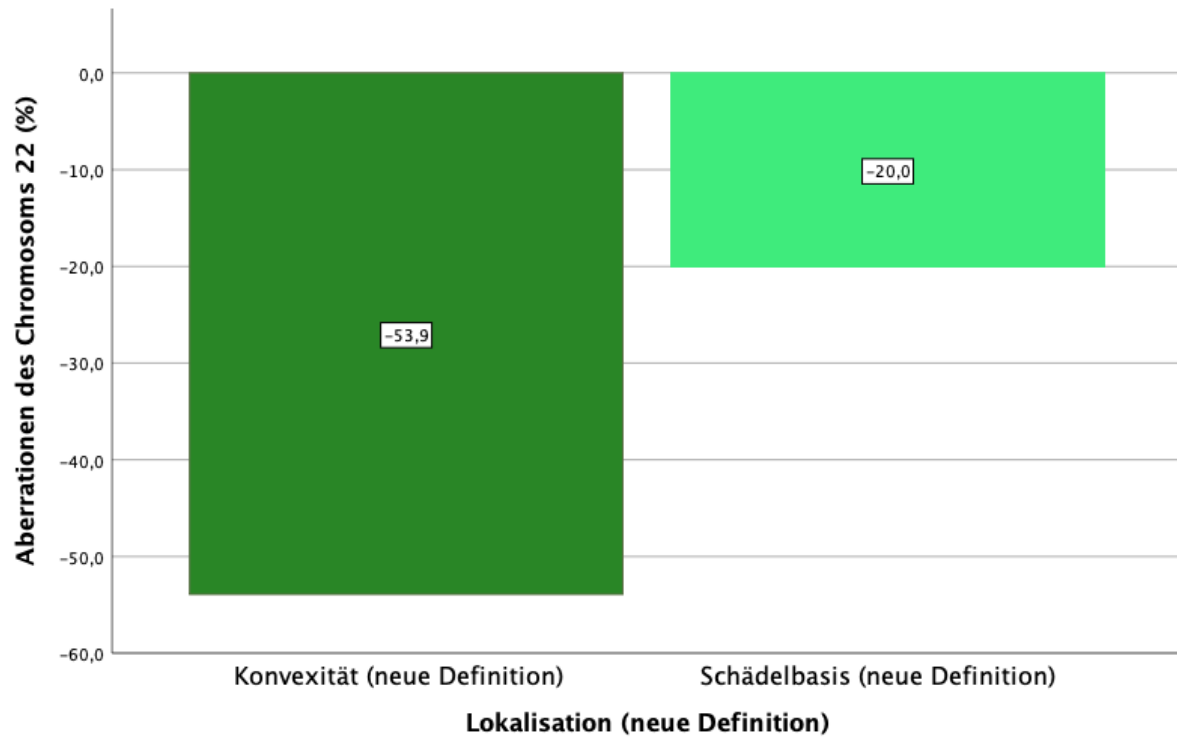
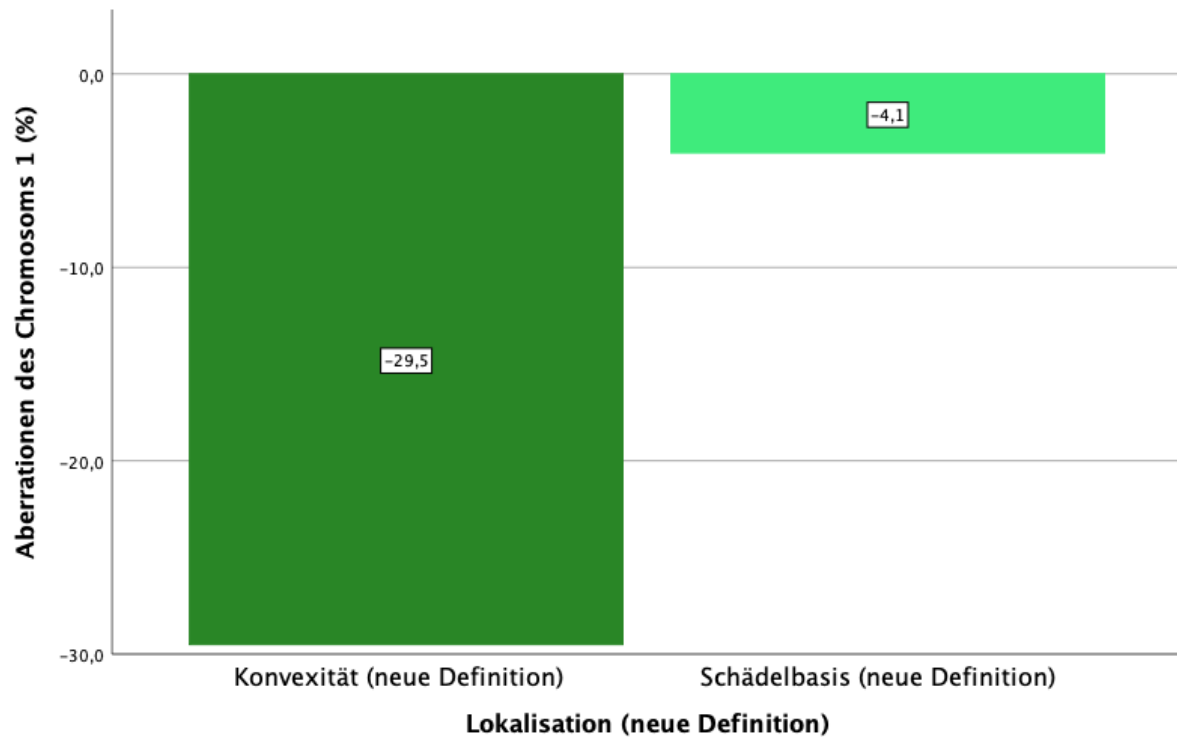


Abbildung 28: Aberrationsvergleich des Chromosoms 1 zwischen Tumoren der Konvexität und der Schädelbasis (neue Definition) ($p = 0,043$)



Bei allen anderen untersuchten Chromosomen konnte auch bei der neuen Einteilung kein signifikanter Unterschied zwischen Aberrationen der Konvexität und der Schädelbasis detektiert werden (Chromosom 9: $p = 0,630$; Chromosom 10: $p = 0,373$; Chromosom 14: $p = 0,726$; Chromosom 18: $p = 0,152$).

4.4.3 Unterschiede zwischen den WHO Graden

In der untersuchten Patientenkohorte befindet sich nur ein Meningeom des WHO Grads III, was eine sinnvolle Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests nicht rechtfertigt.

Aus diesem Grund wurden die Unterschiede zwischen Tumoren des WHO Grads I und II mit dem Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben hinsichtlich möglicher Chromosomenaberrationen untersucht. Das Ergebnis fiel für das Chromosom 1 dahingehend hochsignifikant aus, dass bei WHO Grad II Tumoren deutlich mehr Verluste als bei WHO Grad I Meningeomen vorliegen ($p = 0,001$). Bei der Untersuchung des Chromosoms 14 wurde eine Signifikanz knapp verpasst ($p = 0,058$).

Abbildung 29: Aberrationsvergleich des Chromosoms 1 zwischen Tumoren des WHO Grads I und II ($p = 0,001$)

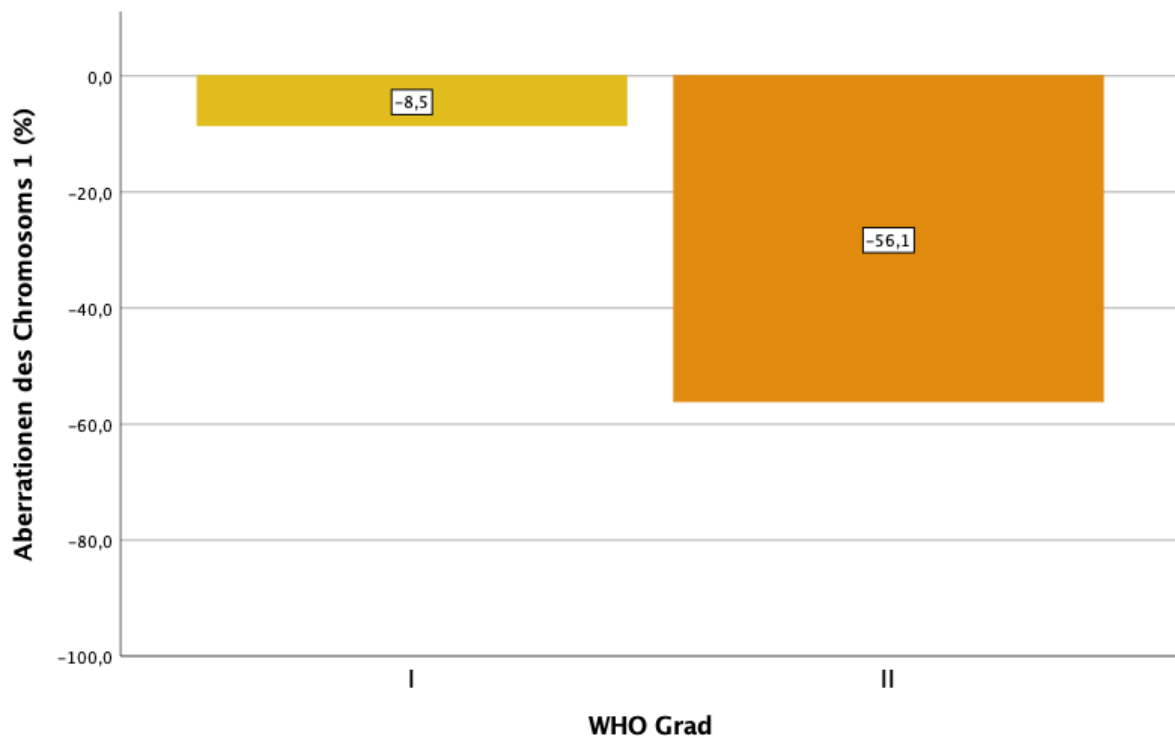
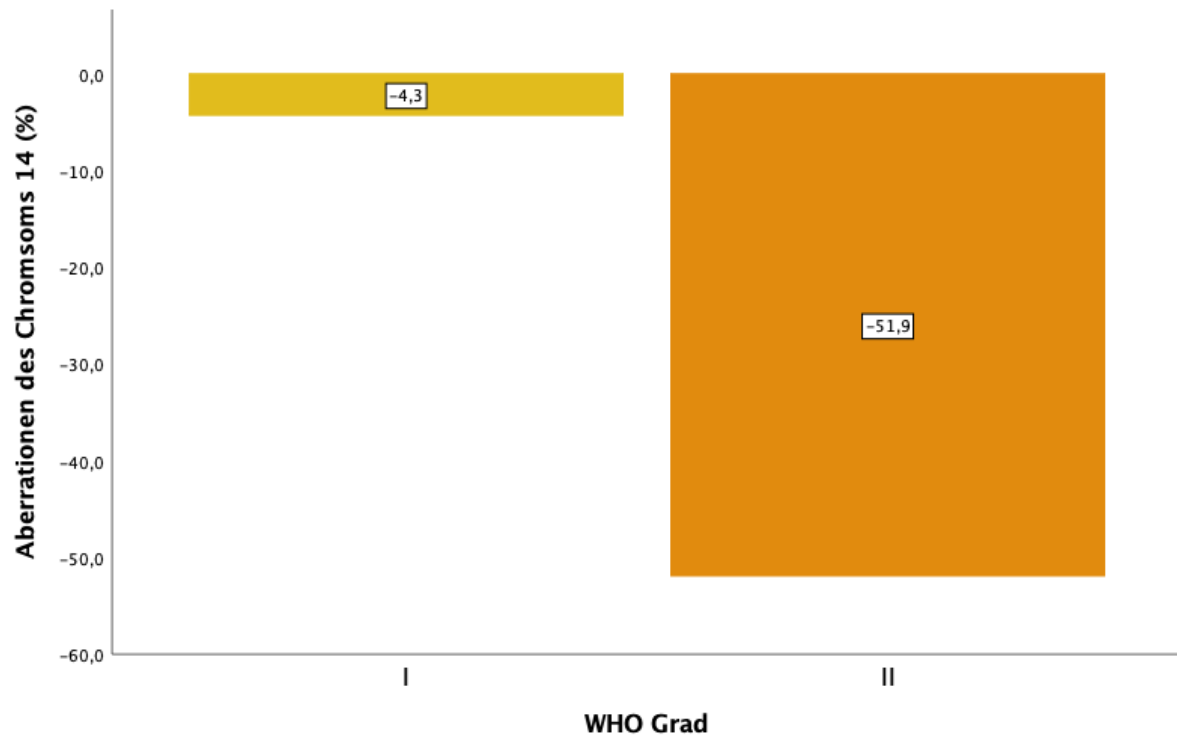


Abbildung 30: Aberrationsvergleich des Chromosoms 14 zwischen Tumoren des WHO Grads I und II ($p = 0,058$)



Bei einer dementsprechenden Analyse der anderen untersuchten Chromosomen konnte hierfür kein Signifikanzniveau erreicht werden (Chromosom 9: $p = 0,425$; Chromosom 10: $p = 0,183$; Chromosom 18: $p = 0,578$; Chromosom 22: $p = 0,145$).

4.4.4 Unterschiede zwischen den unter 60-jährigen und den älter/gleich 60-jährigen Patienten

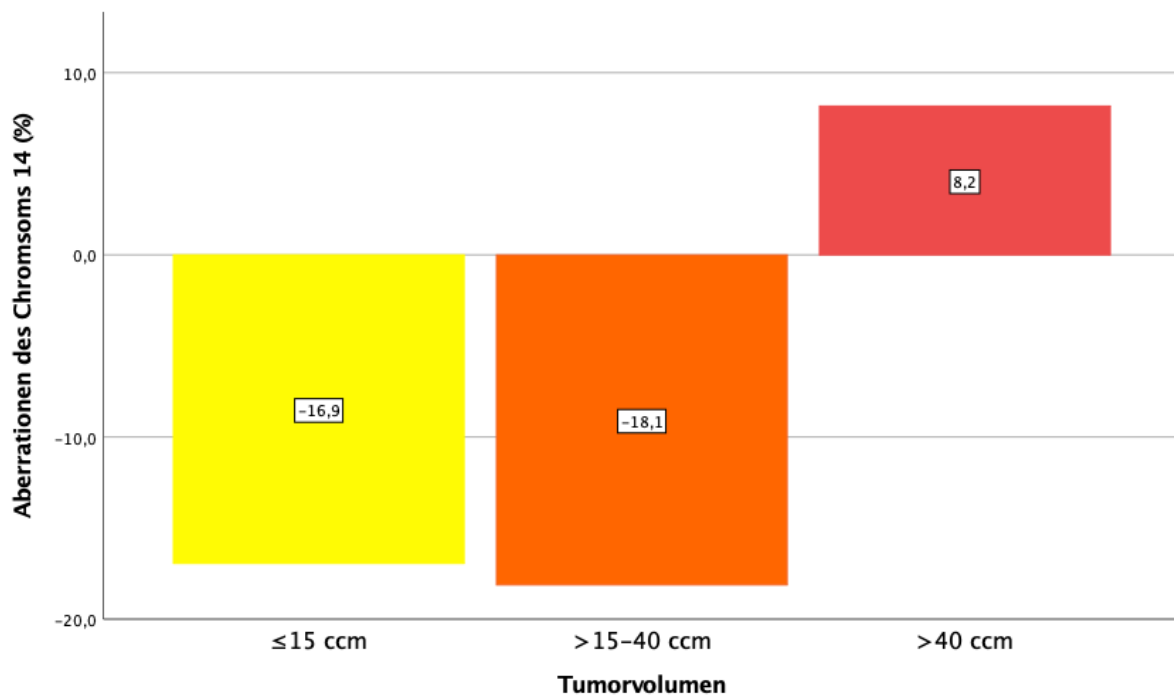
Bei dem Aberrationsvergleich der untersuchten Chromosomen zwischen Tumoren der unter 60-jährigen und der älter/gleich 60-jährigen Patienten konnte für keinen der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied detektiert werden (Chromosom 1: $p = 0,987$; Chromosom 9: $p = 0,630$; Chromosom 10: $p = 0,966$; Chromosom 14: $p = 0,277$; Chromosom 18: $p = 0,497$; Chromosom 22: $p = 0,776$).

4.4.5 Unterschiede zwischen Gruppen aufsteigender Tumorgrößen

Bei einem Aberrationsvergleich zwischen drei Gruppen aufsteigender Tumorgrößen konnte für die untersuchten Chromosomen unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests kein signifikanter Unterschied detektiert werden (Chromosom 1: $p = 0,872$; Chromosom 9: $p = 0,793$; Chromosom 10: $p = 0,930$; Chromosom 14: $p = 0,074$; Chromosom 18: $p = 0,358$; Chromosom 22: $p = 0,160$).

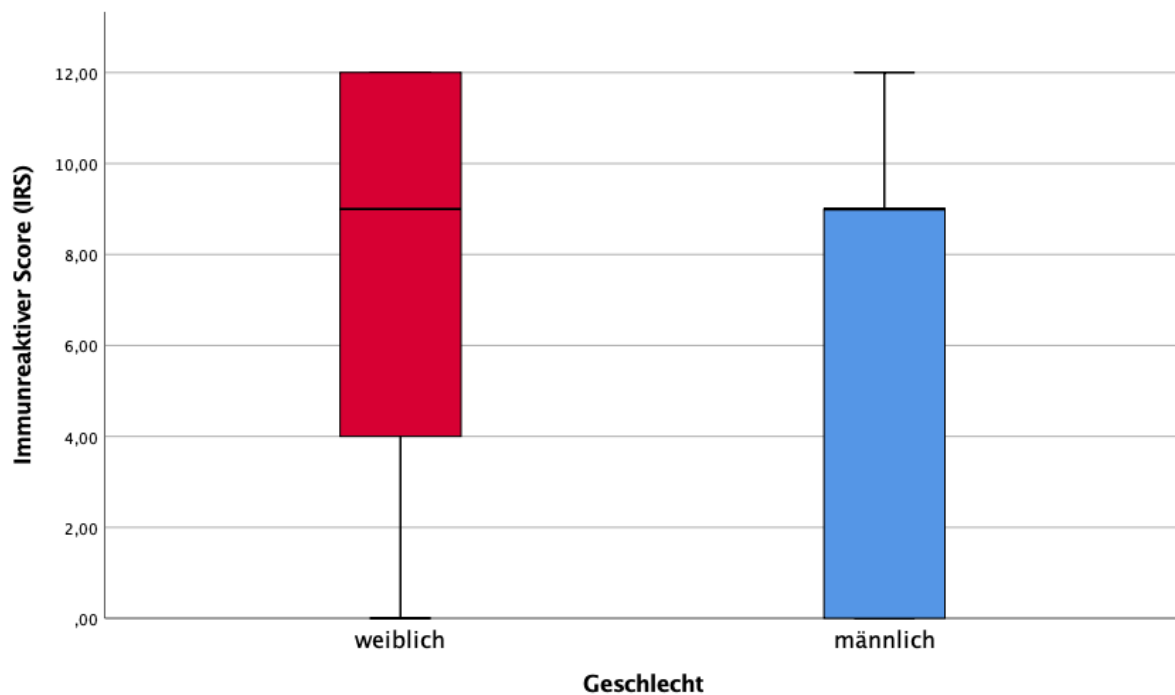
Der Signifikanzwert von $p = 0,05$ wurde für das Chromosom 14 jedoch nur knapp verpasst. Hier zeigte sich, dass in der Gruppe der größten Tumore ($> 40 \text{ cm}^3$) chromosomale Zugewinne tendenziell überwiegen, wohingegen kleinere Tumore eher chromosomale Verluste aufweisen.

Abbildung 31: Übersicht über den Aberrationsvergleich des Chromosoms 14 zwischen drei Gruppen von aufsteigenden Tumorgrößen mittels Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben (Gruppe 1: $\leq 15 \text{ cm}^3$; Gruppe 2: $> 15 \text{ cm}^3$ bis 40 cm^3 ; Gruppe 3: $> 40 \text{ cm}^3$) ($p = 0,074$)



4.5 Immunreaktiver Score (IRS) im Vergleich zwischen Frauen und Männern

Abbildung 32: Vergleich des Immunreaktiven Scores (IRS) zwischen Frauen und Männern ($p = 0,421$)



Für 36 Proben der 43 untersuchten Meningeome lag ein Immunreaktiver Score (IRS) vor. Dieser zeigte unter Anwendung des rangbasierten Mann-Whitney-U-Tests keinen signifikanten Unterschied zwischen Frauen und Männern auf ($p = 0,421$). Der Median beträgt in beiden Kohorten 9. Der Interquartilsabstand beträgt bei den Frauen 8 und bei den Männern 9.

5. Diskussion

Die Expressionsmuster der untersuchten microRNAs 21, 34a, 200a und 409 werden im Folgenden unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Aberrationsmuster der Chromosomen 1, 9, 10, 14, 18 und 22 und vielfältiger klinisch relevanter Parameter diskutiert.

5.1 Erkenntnisse über das Patientenkollektiv

Bei Frauen zeigte sich über alle Altersklassen hinweg eine höhere Inzidenz von Meningeomen als bei Männern (LOUIS et al., 2016a). Dies spiegelt sich auch in der Zusammensetzung der Stichprobe dieser Arbeit wider, in der Frauen mit einem deutlich höheren Verhältnis von etwa 3:1 im Vergleich zu Männern betroffen waren.

In einer im Jahr 2019 veröffentlichten epidemiologischen Studie über Meningeome im Saarland lag das durchschnittliche Erkrankungsalter bei 63 Jahren. Hierbei wurden Meningeome analysiert, die zwischen den Jahren 2000 und 2015 erstmals diagnostiziert worden waren (HOLLECZEK et al., 2019). Der Altersdurchschnitt der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten lag mit 61,7 Jahren nur geringfügig darunter und ist vergleichbar mit den wissenschaftlichen Vorergebnissen.

Mit einem Anteil von etwa 69,7 % an allen Meningeomen hat der WHO Grad I den höchsten Anteil gefolgt von 27,5 % WHO Grad II Tumoren. Das Meningeom WHO Grad III tritt mit 2,8 % der Fälle verhältnismäßig selten auf (HOLLECZEK et al., 2019). Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tumorproben handelte es sich bei 81,4 % um einen WHO Grad I. Dies stellt einen höheren Anteil im Vergleich zur vorerwähnten Publikation dar. Meningeome des WHO Grads II sind demgegenüber weniger häufig (16,3 %). Der WHO Grad III ist mit einem Anteil von 2,3 % vergleichbar mit der Angabe von 2,8 % in der Literatur. Hier ist allerdings zu konstatieren, dass in unserer Stichprobe nur ein Tumor auf den WHO Grad III entfiel, was die Belastbarkeit dieser Aussage stark einschränkt. Insgesamt ist hier die Fallzahl von 43 Patienten im Vergleich zu 992 Patienten in der Vergleichspublikation deutlich geringer. Dies könnte die Unterschiede zwischen den differierenden Prävalenzen der WHO Grade erklären. Dort wurde der Anteil von Meningeomen der WHO Grade II und III mit 39 % bei Männern signifikant höher als bei Frauen mit 27 % angegeben ($p = 0,003$) (HOLLECZEK et al., 2019). Dies konnte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Hier beträgt der Anteil der WHO Grade II und III 18 % bei Männern und 19 % bei Frauen bezogen auf das jeweilige geschlechtsspezifische Patientenkollektiv.

Von den 43 in diese Promotionsarbeit eingeschleusten Patienten hatten zwei Erkrankte ein Meningeom an zwei Lokalisationen und ein Betroffener sogar einen Tumor an drei Stellen. Ketter et al. unterteilten Regionen, an denen Meningeome auftreten, in drei Haupt- und neun Unterlokalisationen. Die Hauptlokalisation Konvexität teilt sich in die Untergruppen Konvexität, parasagittal, tentoriell, hintere Schädelgrube und Falx cerebri. Die Schädelbasis wurde weiter in

Keilbeinflügel, Olfaktoriusrinne und Tuberculum sellae eingeteilt (KETTER et al., 2008). Hier wurde noch die weitere Sublokalisierung petroclival ergänzt.

Meningeome des Spinalkanals, welche bei Ketter et al. die dritte Hauptlokalisierung darstellten (KETTER et al., 2008), waren nicht Bestandteil dieser Arbeit. Hier wurden 30 Tumore an der Konvexität 17 Tumoren der Schädelbasis gegenübergestellt, was einem Verhältnis von 1,76:1 entspricht.

In der genannten Publikation von Ketter et al. waren 379 Meningeome an der Konvexität und 196 an der Schädelbasis lokalisiert, was einem Verhältnis von 1,93:1 entspricht (KETTER et al., 2008). Trotz deutlich unterschiedlicher Fallzahlen kommen beide Untersuchungen diesbezüglich zu annähernd gleichen Relationen.

In der dargestellten Arbeit handelte es sich bei 16,3 % der Tumore um ein Rezidiv. Bei den Patientinnen entfielen 12,5 % auf ein Rezidiv. Bei den männlichen Patienten lag dieser Wert bei 27,3 %.

In der epidemiologischen Studie über Meningeome im Saarland lag die Rezidivrate bei 6,1 %. Unter Frauen lag dieser Wert bei 5,6 % und unter Männern bei 7,5 % (HOLLECZEK et al., 2019). Auch in der dargestellten Arbeit sind, wie in der Vergleichsliteratur, mehr männliche Patienten als Patientinnen von Meningeomrezidiven betroffen. Die insgesamt höhere Anzahl von Rezidiven in unserer Stichprobe erklärt sich daraus, dass hier sowohl erstdiagnostiziert operierte als auch rezidiert operierte Meningeome untersucht wurden. In der Vergleichspublikation wurden nur operativ versorgte Erst Diagnosen und die jeweiligen Patientendaten mit einer durchschnittlichen Nachbeobachtungszeit von 9 Jahren erfasst. Der Fokus lag hierbei auf einer epidemiologischen Analyse. Somit wurden Rezidive, welche nach der Nachbeobachtungszeit von 9 Jahren auftraten, nicht erfasst. Angaben zu der jeweiligen Therapie der Rezidive wurden nicht gemacht (HOLLECZEK et al., 2019). Aufgrund des retrospektiven Charakters der Studie ist nicht auszuschließen, dass nicht alle tatsächlich vorkommenden Rezidive erfasst wurden. Vor diesem Hintergrund erscheint es nachvollziehbar, dass in der dargestellten Arbeit die Zahl der Rezidive höher ist. Das Rezidivrisiko steigt mit dem vorliegenden WHO Grad an (HOLLECZEK et al., 2019). In der dargestellten Arbeit wird dieser Sachverhalt aufgrund des Studiendesigns zwar nicht untersucht, es ist aber offensichtlich, dass unter den WHO Grad I Tumoren sehr viel mehr Erst Diagnosen als Rezidive vorliegen und sich dieser Unterschied mit aufsteigendem WHO Grad angleicht. Der einzig beschriebene Tumor eines WHO Grads III ist ein Rezidiv. Somit zeigt sich, dass Rezidive histomorphologisch maligner imponieren als Erst Diagnosen.

In der saarländischen Studienkohorte nahm das Rezidivrisiko mit steigendem Alter ab (HOLLECZEK et al., 2019). In dieser Arbeit waren mit steigendem Patientenalter tendenziell häufiger Rezidivtumore detektierbar. Dieser Unterschied wird aller Wahrscheinlichkeit nach durch die bereits erwähnten Verschiedenheiten der Charakteristika der beiden Untersuchungen verursacht.

5.2 Korrelation der Expressionsniveaus der microRNAs im Tumor mit den Aberrationsmustern der jeweiligen Chromosomen

Die microRNA 21 ist auf dem Chromosom 17q, die microRNAs 34a und 200a sind auf dem Chromosomenabschnitt 1p und die microRNA 409 ist auf dem Chromosom 14q lokalisiert. In dieser Arbeit wurde mittels einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der Grad der Chromosomenteilverluste bzw. Zugewinne der Chromosomen 1, 9, 10, 14, 18 und 22 mit den Expressionsmustern der jeweiligen microRNAs verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expressionsmuster der drei microRNAs 34a, 200a und 409 im Tumor jeweils hochsignifikant mit dem Ausmaß der Chromosomenaberrationen korrelieren ($p \leq 0,001$). Für die microRNA 21 konnte dahingehend keine Korrelationsberechnung durchgeführt werden, weil die Aberrationsmuster des entsprechenden Chromosoms 17 nicht untersucht wurden.

In dem onkogenetischen Baummodell der zytogenetischen Entwicklung von Meningeomen nach Ketter et al. konnte der signifikante Einfluss von spezifischen chromosomalen Aberrationsmustern auf das Progressionsverhalten von Meningeomen erstmals beschrieben werden (KETTER et al., 2007b). Im Rahmen der dargestellten Arbeit wurde weiterführend untersucht, inwieweit sich diese Erkenntnisse auf die entsprechende microRNA Expressionen und damit auf die epigenetische Ebene übertragen lassen.

2018 wurde erstmals der Zusammenhang zwischen der Expression von microRNAs und der Aneuploidie der entsprechenden Chromosomen untersucht. Hierbei wurde an humanen trisomischen und tetrasomischen Zelllinien demonstriert, dass die Expression von microRNAs als Reaktion auf chromosomale Zugewinne verändert sein kann (DURRBAUM et al., 2018).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal bei Meningeomen der entsprechende Zusammenhang zwischen der molekularzytogenetischen und der epigenetischen Ebene analysiert. In diesem Zuge wurden die Expressionsmuster der microRNAs mit den Aberrationsmustern sämtlicher untersuchter Chromosomen verglichen, wobei sowohl hypo- als auch hyperdiploide Aberrationsmuster in die Analyse eingeschlossen wurden. Eine hochsignifikante Korrelation ergab sich für die Expressionsmuster der microRNAs mit den Aberrationsmustern der Chromosomen, auf denen diese lokalisiert sind. Ausgehend von der molekularzytogenetischen Ebene wird dieser Zusammenhang im weiteren Verlauf der Diskussion die Grundlage für die epigenetischen Veränderungen in Form der analysierten microRNAs darstellen.

Vor dem Hintergrund, dass die RNA-Interferenz sowohl in gesundem als auch in maligne entartetem Gewebe eine entscheidende Rolle bei der Expression von menschlichen Genen spielt (RAO et al., 2013; WERNER et al., 2017), war es von entscheidendem Interesse zu detektieren, dass chromosomale Aberrationen im Meningeom die Zellphysiologie bis hin zur Veränderung der jeweiligen microRNA-Expression beeinflussen. Gerade bei der Analyse des Einflusses der microRNA

200a auf eine Vielzahl molekularer Signalwege (siehe Abschnitt 5.10) (SAYDAM et al., 2009), konnte somit erstmals gezeigt werden, dass die durch Aneuploidie bedingten chromosomalen Veränderungen einen dahingehenden direkten Einfluss haben.

Hinsichtlich des Rezidivverhaltens von Meningeomen wäre weiterhin zu diskutieren, ob die auf chromosomalen Aberrationsmustern basierenden Daten des Genetischen Progressionscores nach Ketter (KETTER et al., 2008) auf die epigenetische Ebene übertragbar sind. Bei der entsprechenden Etablierung einer microRNA Expressionsanalyse von entnommenem Tumorgewebe wäre somit die Detektion von Meningeomen möglich, die mit einem signifikant erhöhten Rezidivrisiko assoziiert sind. In diesem Zusammenhang könnten neben einer radikalen Resektion auch weiterführende Maßnahmen, wie z.B. eine adjuvante Bestrahlungstherapie, diskutiert werden.

5.3 Korrelation der Expressionsniveaus der microRNAs zwischen Tumor und Blut bei Meningeompatienten

Bei der Korrelation der Expressionsmuster der untersuchten microRNAs zwischen Tumor und Blut konnte für keine microRNA ein signifikantes Ergebnis erzielt werden.

Die überwiegende Anzahl der microRNAs befindet sich im menschlichen Körper innerhalb der Zellen. Dennoch sind microRNAs in signifikanter Zahl auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten zu finden, wofür es aktuell drei führende Erklärungen gibt. Eine Theorie ist die aktive Sekretion von microRNAs mittels Mikovesikeln über die Zellwand. Darüber hinaus können microRNAs aus zerstörten Zellen passiv in die Peripherie strömen oder aber als Reaktion auf bestimmte Stimuli aktiv selektiert und sezerniert werden (ZHI et al., 2016).

Die Blut-Hirn-Schranke ist für die Regulation von Molekülen in das und aus dem Zentralen Nervensystem (ZNS) verantwortlich (SWEENEY et al., 2019). Im Gegensatz zu Astrozyten sind Meningen kein Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke. Beim Glioblastom (Astrozytom WHO Grad IV) wird die Blut-Hirn-Schranke teilweise zerstört (BHOWMIK et al., 2015) und zelluläre Bestandteile wie microRNAs können diese überwinden. Bezüglich des Glioblastoms gibt es Analysen, die erfolgreich Biomarker wie microRNAs und sogar zirkulierende Tumorzellen im Blut (CTCs) nachweisen können (FIGUEROA, CARTER, 2018; KOLOSTOVA et al., 2021). Da Meningeome in den meisten Fällen (WHO Grad I und II) ein verdrängendes und kein infiltratives Wachstum aufweisen (MÜLLER et al., 1999; ZHI et al., 2016), werden die anatomischen Grenzen in der Regel respektiert, nicht zerstört. Somit liegt der Verdacht nahe, dass im Vergleich zum physiologischen Ursprungsgewebe, den Arachnoidalzellen, die Sekretion von microRNAs ins Blut nicht signifikant gesteigert wird. Allerdings sind über diese Mechanismen noch zu wenige gesicherte Faktoren bekannt (ZHI et al., 2016).

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die microRNAs 34a und 200a in Meningeomen im Vergleich zu gesundem Arachnoidalzellgewebe signifikant herunterreguliert sind (GALANI et al., 2017; LUDWIG et al., 2015; SAYDAM et al., 2009; WERNER et al., 2017).

Die microRNA 409 ist auf dem Chromosom 14 lokalisiert. Bei einer Monosomie 14 ist das Risiko für die Entwicklung eines Meningeoms WHO Grad I zu einem Grad II Tumor deutlich erhöht (LINSLER et al., 2014). Dies führt zu der Hypothese, dass auch die microRNA 409 im Tumor bei höhergradigen Meningeomen deutlich geringer exprimiert sein müsste. Zu der microRNA 409 in Meningeomen gibt es nur eine Vorpublikation, die auf einer blutbasierten Analyse beruht (ZHI et al., 2016). Zhi et al. konnten hierbei zeigen, dass die microRNA 409 bei Meningeompatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden signifikant hochreguliert ist (ZHI et al., 2016). Jedoch wurden diese Blutproben nur einmalig bei 1200g für 10 Minuten zentrifugiert (ZHI et al., 2016) und nicht, wie in der hier dargestellten Arbeit, zwei Mal für 10 Minuten jeweils bei 1900g und bei 16000g. Somit wurden in der von Zhi et al. präsentierten Arbeit mehr microRNAs mitanalysiert, welche von Zellen des peripheren Blutes stammen. Diese Arbeiten sind deshalb nur begrenzt vergleichbar.

Weiterhin gilt es zu beachten, dass die Sekretionsmechanismen von zellgebundenen microRNAs ins Blut wissenschaftlich noch nicht ausreichend erforscht sind (ZHI et al., 2016).

Da bei Tumoren mehr microRNA sezernierende Zellen existieren, diese allerdings intrazellulär einen geringeren microRNA Spiegel als die physiologischen Ausgangszellen der Arachnoidea aufweisen, ist es aufgrund dieses und der vorher genannten Gründe extrem schwierig, eine aussagekräftige Korrelation der jeweiligen microRNA Expressionen zwischen Tumor und Blut zu finden.

Einzig die microRNA 21 zeigt sich in Vorarbeiten im soliden Meningeom hochreguliert (GALANI et al., 2017; KATAR et al., 2017).

Eine Korrelation zwischen Tumor und Blut kann jedoch auch in diesem Fall nicht detektiert werden. Ein Erklärungsansatz wäre das unklare Ausmaß, inwieweit die microRNA 21 im Vergleich zu gesundem Arachnoidalzellgewebe hochreguliert ist. Da auch hier die Sekretionsmechanismen der microRNA vom Tumor in das Blut nicht vollständig geklärt sind, ergeben sich in diesem Fall zu viele Variablen, die alle das Verhältnis zwischen tumorgebundenen und zellfreien microRNAs im Blut in unklarem Ausmaß beeinflussen.

5.4 Expressionsunterschiede der microRNAs zwischen dem Blut gesunder Probanden und Meningeompatienten

Bei dem beide Geschlechter einbeziehenden Vergleich der untersuchten microRNAs 21, 34a, 200a und 409 im Blut von gesunden Probanden und Patienten, die an einem Meningeom erkrankt sind, konnte bei der Anwendung des rangbasierten Mann-Whitney-U-Tests kein signifikanter Expressionsunterschied detektiert werden.

Ausschließlich bei einer reinen Fokussierung auf die männliche Kohorte konnte für die microRNA 200a im Patientenblut eine signifikant höhere Expression als bei gesunden Probanden detektiert werden ($p = 0,016$).

Es gibt nach dem aktuellen Kenntnisstand bisher nur eine Vorpublikation, die eine blutbasierte microRNA Analyse bei Meningeompatienten präoperativ im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden zum Thema hat. Einer der hierbei untersuchten Marker ist die microRNA 409. In dieser Publikation wurde dargestellt, dass sich die im Blut detektierte microRNA 409 bei erkrankten Patienten signifikant höher exprimiert zeigte als bei gesunden Probanden. Diese Daten basieren allerdings auf einer Analyse von Blutserum, dem Einsatz der exogenen Kontrolle cel-miR-39 und einem anderen Versuchsaufbau (ZHI et al., 2016) (siehe Abschnitt 5.3).

Ein Erklärungsansatz für die Unterschiede zwischen den Expressionsmustern der microRNA 200a in der männlichen Kohorte ist der Vergleich zwischen der epigenetischen und der molekularzytogenetischen Ebene.

Meningeome sind im Gegensatz zu gesunden Arachnoidalzellen häufig von chromosomalen Aberrationen betroffen (MEESE et al., 1987) und weisen im Fall einer Progression einen nicht zufälligen Verlust weiterer Chromosomen auf (KETTER et al., 2008; KETTER et al., 2007b). Dies wirkt sich auch auf die microRNA Expression aus. Dieser Sachverhalt basiert auf der Erkenntnis, dass die in dieser Arbeit untersuchten microRNAs 34a, 200a und 409 hochsignifikant mit dem Ausmaß der chromosomalen Aberrationen in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) korrelieren ($p \leq 0,001$). Somit enthalten diese Zellen jeweils eine geringere Anzahl an microRNAs im Vergleich zu gesunden Arachnoidalzellen, welche über keine chromosomalen Aberrationen im Sinne überwiegender Deletionen verfügen. Für die microRNA 21, die auf dem Chromosomenabschnitt 17q23.1 lokalisiert ist, konnte keine diesbezügliche Analyse durchgeführt werden.

Beim Meningeom liegt allerdings eine pathologisch gesteigerte Zellzahl im Vergleich zu der ursprünglichen Anzahl entdifferenzierter Arachnoidalzellen vor. Wie bereits in Abschnitt 5.3 beschrieben, gibt es drei verschiedene Erklärungsansätze, wie microRNAs in Körperflüssigkeiten gelangen können. Über diese Mechanismen sind bisher nur wenige gesicherte Informationen bekannt (ZHI et al., 2016). Basierend auf diesen Überlegungen ist jedoch anzunehmen, dass aufgrund der deutlich erhöhten Zahl pathologisch veränderter Arachnoidalzellen bei Meningeomen die Ausschüttung von microRNAs ins Blut im Vergleich zu der normalen Anzahl gesunder

Arachnoidalzellen erhöht sein könnte, obwohl die zelluläre Expression im Tumor geringer als in gesundem Arachnoidalzellgewebe ist. Aufgrund der relativen Benignität des Meningeoms und da Meningen kein Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke darstellen (BHOWMIK et al., 2015; MÜLLER et al., 1999), ist die Anzahl der vom Meningeom ins Blut übertretenden microRNAs möglicherweise zu gering, um für alle analysierten microRNAs einen signifikanten Unterschied zwischen dem Blut gesunder Probanden und Meningeompatienten zu detektieren.

Die microRNA 21 ist auf dem Chromosomenabschnitt 17q23.1 lokalisiert. Bei einer Aberration des Chromosoms 17, wie es beim Meningeom häufig vorkommt, ist nicht immer nur der lange Arm (17q) betroffen, sondern manchmal auch der kurze Arm (17p) (HEMMER et al., 2019). Das Tumorsuppressorgen *TP53* ist hierauf lokalisiert (Lokalisation 17p13.1). Somit bildet eine Analyse der microRNA 21 nicht alle Aberrationen des Chromosoms 17 ab. Falls der untersuchte Arm nicht von einer Chromosomenaberration betroffen ist, ähnelt die Expression der entsprechenden microRNA derjenigen gesunder Probanden. Die Aberrationen des kurzen Arms des Chromosoms 1 (1p) (siehe Abschnitt 2.2.6.1.2) und die Monosomie des Chromosoms 14 (siehe Abschnitt 2.2.6.1.3) bei der Progression von Meningeomen (KETTER et al., 2008) sind somit schärfer definiert und damit besser geeignet, um eine Verbindung von der molekularzytogenetischen zur epigenetischen Ebene zu detektieren.

Ein weiterer Erklärungsansatz könnte hormonbasiert sein. MicroRNAs regulieren mittels RNA-Interferenz die Expression von Zielgenen in einer Vielzahl von zellulären Signalwegen im menschlichen Körper und werden selbst über verschiedenste Signalkaskaden reguliert (MARTON et al., 2020; RAO et al., 2013; WERNER et al., 2017). Ein Botenstoff, der die Expression einer Vielzahl von microRNAs reguliert ist Östradiol. Östradiol fungiert als Ligand des Östrogenrezeptoren alpha ($ER \alpha$). In einer $ER \alpha$ exprimierenden Ovarialzelllinie zeigte sich die Expression der microRNA 200a höher als in Zelllinien, die diesen Rezeptor nicht exprimierten. Die besondere Rolle von Östradiol im weiblichen Organismus (MARTON et al., 2020) könnte zu einer gesteigerten Expression der microRNA 200a auch bei gesunden Frauen im Vergleich zu Männern führen. Bei einem Expressionsvergleich zwischen gesunden Probandinnen und Meningeompatientinnen wären die microRNAs tumorösen Ursprungs maskiert, was bei Männern nicht der Fall wäre. Dies könnte ein Grund für die signifikant erhöhte Expression der microRNA 200a bei männlichen Meningeompatienten im Vergleich zu gesunden männlichen Probanden sein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der gesunden Vergleichskohorte die microRNA 200a bei Frauen im Vergleich zu Männern hochreguliert war, wobei eine Signifikanz ganz knapp verpasst wurde ($p = 0,057$). Der geschlechtsspezifische Vergleich bei den anderen untersuchten microRNAs fiel nicht signifikant aus.

5.5 Expressionsunterschiede der microRNAs zwischen Gruppen aufsteigender Tumorgrößen

Bei der Analyse der microRNAs sowohl im Tumor als auch im Blut konnte ausschließlich für die im Tumor detektierte microRNA 409 eine signifikante Korrelation mit dem Tumolvolumen aufgezeigt werden ($p = 0,043$). Bei einer Differenzierung der Tumorgrößen in drei Gruppen ($\leq 15 \text{ cm}^3$, $>15 \text{ cm}^3$ bis 40 cm^3 und $>40 \text{ cm}^3$) konnte demonstriert werden, dass bezogen auf das Tumolvolumen mit aufsteigender Gruppe auch die microRNA 409 signifikant höher exprimiert vorlag ($p = 0,031$). Bezogen auf die anderen microRNAs im Tumor und im Blut konnte keine signifikante Korrelation mit dem Tumolvolumen festgestellt werden.

Da die microRNA Forschung ein recht junges Thema in der Medizin darstellt, existieren in der Literatur kaum Informationen über Korrelationen von microRNAs mit Tumorumfängen. Unabhängig von der Tumorgröße wurde in der dargestellten Arbeit jeweils immer nur ein etwa $0,05 \text{ cm}^3$ großes Tumorstück in den Versuch eingeschleust und die eluierte RNA im Anschluss auf eine Konzentration von $23 \text{ ng}/\mu\text{l}$ verdünnt. Somit bedeutet die signifikante Korrelation der Expression einer microRNA mit wachsendem Tumolvolumen einen Anstieg der jeweiligen microRNA bei gleichbleibender Gesamt-RNA-Konzentration.

Ein erklärender Ansatz ist der Vergleich zwischen der molekularzytogenetischen und der epigenetischen Ebene. Die microRNA 409 ist auf dem Chromosom 14 lokalisiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diesbezügliche Aberrationen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung hochsignifikant mit den Expressionsmustern der microRNA 409 korreliert werden ($p \leq 0,001$). Bei einem Aberrationsvergleich des Chromosoms 14 zwischen drei Gruppen von aufsteigenden Tumorgrößen ($\leq 15 \text{ cm}^3$, $> 15 \text{ cm}^3$ bis 40 cm^3 und $> 40 \text{ cm}^3$) konnte ein dementsprechender Zusammenhang detektiert werden, allerdings in nicht signifikanter Ausprägung ($p = 0,074$). Bei den anderen Chromosomen wurde eine dementsprechende Signifikanz in deutlich größerem Ausmaß verfehlt.

Die Progression von Meningeomen ist in gewissen Fällen mit einem nicht zufälligen Verlust von Chromosomen bzw. chromosomalen Abschnitten assoziiert (KETTER et al., 2007b). Neben chromosomalen Hypodiploiditäten sind in seltenen Fällen allerdings auch Hyperdiploiditäten bei Meningeomen möglich. Diese treten am ehesten in Tumoren höherer histologischer Grade auf (KETTER et al., 2007a). Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Verluste bzw. Zugewinne der untersuchten Chromosomen hinsichtlich der drei Gruppen von aufsteigenden Tumorgrößen differenziert werden. Lediglich für das Chromosom 14, auf dem das Gen der microRNA 409 lokalisiert ist, konnte diesbezüglich mittels Kruskal-Wallis-Test ein starker Zusammenhang detektiert werden. Somit sind Tumore der größten Gruppe ($> 40 \text{ cm}^3$) tendenziell eher mit Hyperdiploiditäten behaftet als Meningeome geringerer Größenausdehnung, die eher mit Hypodiploiditäten assoziiert

sind. Eine dahingehende Signifikanz wurde allerdings knapp verpasst, was vermutlich der zu geringen Fallzahl geschuldet ist. Es konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen der molekularzytogenetischen und der epigenetischen Ebene nachgewiesen werden. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass die größeren Tumore, welche tendenziell eher mit Hyperdiploiditäten assoziiert sind, einen verhältnismäßig höheren Anteil der microRNA 409 im Vergleich zu kleineren Tumoren aufweisen.

Für die Chromosomen 1 und 17 konnte keine Differenzierung der Aberrationen zwischen den aufsteigenden Größen von Tumorgruppen aufgezeigt werden. Höchstwahrscheinlich aus diesem Grund ist dies auch für die damit assoziierten microRNAs 34a und 200a sowie für die microRNA 21 nicht möglich.

Darüber hinaus konnte in der Vorarbeit von Ketter et al. gezeigt werden, dass das Chromosom 1 in keinem der untersuchten Fälle mit einer Hyperdiploidität in Verbindung gebracht werden konnte (KETTER et al., 2007a). Somit ist diese Erkenntnis mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen kompatibel.

Bei der blutbasierten Analyse konnte die microRNA 409 ebenso wenig wie die anderen untersuchten microRNAs mit dem Tumolvolumen korreliert werden. Die wahrscheinlichste Ursache dafür kann mit den in Abschnitt 5.3 dargestellten Theorien hinsichtlich der Sekretionsmechanismen von microRNAs aus dem Zellinneren in Körperflüssigkeiten erklärt werden. In diesem Kontext ist jedoch festzuhalten, dass die konkreten Mechanismen in vielerlei Hinsicht noch nicht erforscht sind (ZHI et al., 2016).

5.6 Korrelation der Expressionsniveaus der microRNAs mit dem Patientenalter

Unter allen untersuchten microRNAs im Tumor war die microRNA 409 die einzige, deren Expression eine signifikant negative Korrelation mit dem Patientenalter aufzeigte ($p = 0,012$). Auch bei einer genaueren Unterteilung der untersuchten Patientenpopulation in zwei Altersgruppen (jünger als 60 Jahre und älter/gleich 60 Jahre) konnte gezeigt werden, dass die Population der älter/gleich 60-Jährigen eine signifikant geringere Expression der microRNA 409 im Tumor aufwies, als die Patienten, die jünger als 60 Jahre waren ($p = 0,046$).

Eine Erklärung dafür könnte der häufigere Verlust des Chromosoms 14 bei Patienten sein, die 60 Jahre oder älter sind. Dieser zeigte sich nicht signifikant ($p = 0,277$) aber dennoch deutlich ausgeprägter als bei allen anderen untersuchten Chromosomen.

Eine mögliche Erklärung für die Sonderstellung des Chromosoms 14 in diesem Kontext basiert auf der von Ketter et al. beschriebenen Häufigkeit der chromosomalen Verluste bei Meningeomen (KETTER et al., 2007b).

Bei dem dargestellten biostatistischen Modell der klonalen zytogenetischen Evolution von Meningeomen (siehe Abbildungen 1 und 2) ist der Verlust des Chromosoms 14 bei Frauen ein späteres Ereignis, welches nach der Deletion des kurzen Arms des Chromosoms 1 (1p) folgt. Bei Männern finden diese Verluste in umgekehrter Reihenfolge statt (KETTER et al., 2007b). Da in der untersuchten Stichprobe das Verhältnis von Frauen zu Männern bei 3:1 liegt, überwiegt der spätere Verlust des Chromosoms 14. Die Expressionen der untersuchten microRNAs 34a, 200a und 409 korrelierten in dieser Untersuchung hochsignifikant mit dem Ausmaß der Aberrationen der jeweiligen Chromosomen in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ($p \leq 0,001$). Somit ist in der überwiegenden Zahl der Fälle das Chromosom 14 und die damit assoziierte Expression der microRNA 409 weniger von chromosomalen Aberrationen betroffen als das Chromosom 1 und damit die microRNAs 34a und 200a.

In dieser Arbeit liegt das mittlere Erkrankungsalter für Patienten, die erstmals von einem Meningeom betroffen waren, bei etwa 60 Jahren. Das Alter bei Diagnosestellung eines Rezidivs liegt mit etwa 70 Jahren über zehn Jahre später (siehe Tabelle 18).

Eine 1p Deletion gilt als bedeutendster Marker für Rezidive beim Meningeom (KETTER et al., 2008). Wie bereits diskutiert, sind rezidivierende Meningeome besonders häufig von chromosomalen Aberrationen betroffen (KETTER et al., 2007b). Da der Verlust eines Chromosoms 14 in der klonalen zytogenetischen Evolution meist ein späteres Ereignis darstellt als die bei Rezidiven typische 1p Deletion, ist im beschriebenen Patientenkollektiv das Chromosom 14 und die dort lokalisierte microRNA 409 vergleichsweise am wenigsten von chromosomalen Aberrationen betroffen. Mit steigendem Patientenalter und der damit einhergehenden erhöhten Rezidivrate ist bei Meningeompatienten das Auftreten einer Monosomie 14 im Tumor allerdings zunehmend der Fall. Aufgrund des evolutionären Charakters des zytogenetischen Progressionsscores nach Ketter zeigt sich dieser auch unabhängig von der Rezidivbildung mit steigendem Alter fortschreitend.

Dies ist ein möglicher Grund, warum die microRNA 409 im Vergleich zu den restlichen untersuchten microRNAs eine signifikant negative Korrelation mit dem Patientenalter aufzeigen kann.

In der klonalen zytogenetischen Evolution von Meningeomen ist die Rolle des Chromosoms 17, auf der die microRNA 21 lokalisiert ist, bisher noch nicht erforscht (KETTER et al., 2007b).

Personen, die über 70 Jahre alt sind, haben eine etwa 3,5-fach erhöhte Meningeominzidenz als jüngere Menschen (GALANI et al., 2017). Da ätiologisch weder das Ausmaß der jeweiligen Chromosomenaberrationen noch die Expressionen der microRNAs (außer die microRNA 409) mit dem Patientenalter korrelieren, liegt der Verdacht nahe, dass weitere Faktoren außer den hier untersuchten Chromosomenaberrationen mit steigendem Alter zur Meningeomentstehung beitragen können. Eine signifikante Anzahl von Meningeomen exprimiert Progesteronrezeptoren, wohingegen die Angaben zu Östrogen- bzw. Androgenrezeptoren heterogen sind (GALANI et al., 2017). Somit wäre ein denkbarer Zusammenhang für die Meningeomentstehung bei Frauen in der postmenopausalen Alterskohorte die mögliche Substitution von Progesteron und Östrogen. Diese Art

der Hormonersatztherapie wurde in den 1960er Jahren eingeführt und erlebte in den 1990er Jahren einen Höhepunkt. In der heutigen Zeit zeigen sich die Verschreibungszahlen regredient, nachdem Nebenwirkungen wie ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Endometriumkarzinome nach reiner Östrogensubstitution bekannt wurden (CAGNACCI, VENIER, 2019).

Auch bei den untersuchten microRNAs im Blut konnten keine signifikanten Korrelationen mit dem Patientenalter detektiert werden. In einer genomweiten Untersuchung von über 800 microRNAs aus mononukleären Zellen des Blutes konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der RNAs im Alter geringer exprimiert waren als bei jungen Patienten (NOREN HOOTEN et al., 2010). Auch können diverse Pathologien wie z.B. Morbus Alzheimer (NAGARAJ et al., 2017), akuter ischämischer Schlaganfall (SORENSEN et al., 2017), Diabetes mellitus Typ 2 (YANG et al., 2017), kardiovaskuläre Erkrankungen (ZHOU et al., 2018) und die Rheumatoide Arthritis (OUBOUSSAD et al., 2017), welche tendenziell eher im höheren Lebensalter auftreten, die Expressionsmuster von microRNAs im Blut bzw. im Liquor verändern. Dahingehend sind allerdings noch viele Fragen ungeklärt. Die Gesamtheit der genannten Faktoren macht deutlich, dass die blutbasierte microRNA Expression mit dem Alter in nicht vorhersehbarer Weise verändert sein kann. Zusammen mit den in Punkt 5.3 genannten Faktoren ist nach dem aktuellen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse davon auszugehen, dass eine Korrelation der Expressionen der microRNAs im Blut mit dem Lebensalter nicht möglich ist.

5.7 Expressionsunterschiede der microRNAs zwischen den WHO Graden

In Rahmen dieser Arbeit wurde das Expressionsniveau der jeweiligen microRNAs differenziert nach den WHO Graden I und II untersucht. Für diesen Vergleich von zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test zur Unterscheidung quantitativer Merkmale benutzt.

Es konnte im Bezug auf die untersuchten microRNAs im Tumor bzw. im Blut kein Expressionsunterschied zwischen den WHO Graden I und II detektiert werden.

Die microRNAs 34a und 200a im Tumor zeigten sich bei WHO Grad II Tumoren geringer exprimiert als bei WHO Grad I Tumoren, ohne dass hierfür eine Signifikanz erreicht werden konnte (microRNA 34a: $p = 0,099$; microRNA 200a: $p = 0,257$). Dahingehend konnten die Vorergebnisse tendenziell bestätigt werden, dass höhergradige Meningeome signifikant geringere Expressionen der microRNA 34a aufweisen als Meningeome des WHO Grads I (LUDWIG et al., 2015; WERNER et al., 2017).

Die microRNAs 34a und 200a sind auf dem Chromosomenabschnitt 1p lokalisiert. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Aberrationsmuster des Chromosomenabschnittes 1p signifikant mit den Expressionen der microRNAs 34a und 200a korrelieren ($p \leq 0,001$). Der kurze Arm des Chromosoms 1 (1p) zeigte bei WHO Grad II Tumoren hochsignifikant mehr Verluste als bei WHO Grad I Tumoren ($p = 0,001$).

Somit konnte im Rahmen dieser Unterscheidung zwischen den WHO Graden I und II ein starker Zusammenhang zwischen dem Chromosomenverlust 1p als molekularzytogenetischem Marker und der microRNA 34a als epigenetischem Marker hergestellt werden, wobei bei letzterer das Signifikanzniveau von $p = 0,05$ ($p = 0,099$) knapp verpasst wurde. Allerdings ist zu vermuten, dass bei einer höheren Fallzahl auch diesbezüglich eine Signifikanz zu erzielen wäre.

In Vorarbeiten zeigte sich die microRNA 21 bei höhergradigen Meningeomen signifikant höher exprimiert als bei Meningeomen des WHO Grads I (GALANI et al., 2017; KATAR et al., 2017). Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die microRNA 21 ist auf dem Chromosomenabschnitt 17q lokalisiert. Für dieses Chromosom wurde allerdings keine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durchgeführt, sodass diesbezüglich der Unterschied zwischen WHO Grad I und II Tumoren unklar ist. Auch die microRNA 409, die auf dem Chromosom 14 lokalisiert ist, zeigte keinen Expressionsunterschied zwischen WHO Grad I und II Tumoren. Diesbezüglich existieren keine Vorarbeiten, allerdings konnte im Rahmen der Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei WHO Grad II Meningeomen deutlich mehr Verluste des Chromosoms 14 vorliegen als bei WHO Grad I Tumoren. Der Signifikanzwert von $p = 0,05$ wurde allerdings knapp verfehlt ($p = 0,058$). Jedoch konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen der microRNA 409 und der Ausprägung des Chromosoms 14 gezeigt werden ($p \leq 0,001$). Dies lässt den Schluss zu, dass die Expressionen der microRNAs von weiteren Faktoren als chromosomalen Verlusten oder Zugewinnen determiniert werden, was Grundlage weiterer Forschungsprojekte bilden könnte.

5.8 Expressionsunterschiede der microRNAs zwischen Frauen und Männern

Im Rahmen der durchgeführten Arbeit konnte für keine der untersuchten microRNAs ein Expressionsunterschied zwischen Frauen und Männern festgestellt werden. Auch die Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung für die jeweiligen Chromosomen, auf denen die microRNAs lokalisiert sind (microRNA 34a: Chromosom 1p, microRNA 200a: Chromosom 1p, microRNA 409: Chromosom 14), ergaben keinen geschlechtsspezifischen Unterschied. Da die genannten Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte hochsignifikant mit den Ergebnissen der microRNA Expressionen korrelieren ($p \leq 0,001$), wird die Expressionsanalyse der microRNAs bestätigt. Lediglich für die microRNA 21, welche auf dem Chromosom 17 lokalisiert ist, konnte keine dahingehende Analyse durchgeführt werden.

Über alle Altersgruppen und WHO Grade hinweg sind Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer von einem Meningeom betroffen (LOUIS et al., 2016a). Das weibliche Geschlecht weist einen höheren Anteil an WHO Grad I Meningeomen auf, wohingegen sich das Verhältnis bei höhergradigen

Meningeomen in Richtung der Männer wendet (HOLLECZEK et al., 2019). Zusätzlich verfügen Meningeome oftmals über Progesteronrezeptoren, was einen Zusammenhang mit weiblichen Sexualhormonen wahrscheinlich macht (LOUIS et al., 2016a). Allerdings wurden in dieser Arbeit keine microRNAs untersucht, welche auf dem weiblichen X-Chromosom oder auf dem Chromosom 11 lokalisiert sind, auf dem das Gen für den Progesteronrezeptor lokalisiert ist. Allerdings wurde der IRS-Score (Immunreaktiver Score zur Quantifizierung von Progesteron- und Östrogenrezeptoren) in Bezug auf das Geschlecht verglichen, wobei jedoch kein Signifikanzniveau erreicht werden konnte ($p = 0,421$).

Im Rahmen dieser Arbeit wiesen Frauen eine höhere Erkrankungsrate als Männer sowohl bei WHO Grad I als auch bei WHO Grad II Meningeomen auf. Ein männlicher Patient war von einem WHO Grad III Meningeom betroffen. Somit konnten hier die Vorergebnisse des höheren männlichen Anteils bei höhergradigen Meningeomen überwiegend nicht bestätigt werden (HOLLECZEK et al., 2019). Dieses Verhältnis zwischen Frauen und Männern ist mit 6:1 bei WHO Grad II Meningeomen sogar noch deutlicher als bei WHO Grad I Meningeomen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei WHO Grad II Meningeomen deutlich mehr Chromosom 1p Verluste auftreten als bei WHO Grad I Meningeomen. Bei einer Bestätigung der Vorergebnisse (HOLLECZEK et al., 2019), dass also Männer eine höhere Erkrankungsrate bei höhergradigen Meningeomen aufweisen, wäre zu vermuten gewesen, dass hier deutlich mehr 1p Verluste und infolgedessen auch mehr Verluste der microRNAs 34a und 200a auftreten müssten als bei Frauen. Da aufgrund der wahrscheinlich zu geringen Fallzahl die Vorergebnisse zwischen Geschlecht und WHO Grad nicht bestätigt werden können, ist es nachvollziehbar, dass zwischen den Geschlechtern keine signifikanten Expressionsunterschiede der untersuchten microRNAs gefunden wurden. Da sich eine mögliche Korrelation der Expressionsmuster der microRNAs im Blut vom Tumor ableitet und dort keine Signifikanz zu erreichen ist, ist es nachvollziehbar, dass es auch im Blut zu keinem signifikanten Ergebnis kommt.

5.9 Expressionsunterschiede der microRNAs zwischen den Lokalisationen Konvexität und Schädelbasis

Die lokalisationsbasierte Differenzierung der Meningeome erfolgte nach Ketter et al. (KETTER et al., 2008) mit der zusätzlichen Untergruppe „petroclival“ bei Schädelbasistumoren.

Bei den untersuchten microRNAs sowohl im Tumor als auch im Blut konnte kein Expressionsunterschied zwischen den Lokalisationen Konvexität und Schädelbasis detektiert werden.

Bei einer neu gewichteten Differenzierung (siehe Abschnitt 4.4.2) wurden die Lokalisationen Konvexität, parasagittal und Falx cerebri unter dem Sammelbegriff „Konvexität“ subsummiert und den restlichen Lokalisationen (Tentorium, hintere Schädelgrube, Keilbeinflügel, Olfaktoriusrinne, Tuberculum sellae, petroclival) unter der Kategorie „Schädelbasis“ gegenübergestellt. Auch hier konnte kein signifikantes Ergebnis für einen möglichen Expressionsunterschied der untersuchten microRNAs erzielt werden. Diese neuere Einteilung wird als Grundlage der weiteren Diskussion verwendet.

Ein Ansatz ist der Vergleich zwischen der molekularzytogenetischen und der epigenetischen Ebene. Ketter et al. konnten zeigen, dass an der Konvexität signifikant mehr Verluste des Chromosomenabschnittes 1p und des Chromosoms 14 auftreten als an der Schädelbasis (KETTER et al., 2008).

Für das Chromosom 1p konnten die diesbezüglichen Vorergebnisse von Ketter et al. als signifikant bestätigt werden ($p = 0,043$). Bezogen auf das Chromosom 14 wurde eine dahingehende Signifikanz jedoch verpasst ($p = 0,726$). Auch das Chromosom 22 zeigte sich an der Konvexität signifikant häufiger von Verlusten betroffen als an der Schädelbasis ($p = 0,011$). In dieser Arbeit wurde allerdings keine microRNA untersucht, welche auf dem Chromosom 22 lokalisiert ist.

Die microRNAs 34a und 200a sind auf dem Chromosomenabschnitt 1p und die microRNA 409 ist auf dem Chromosom 14 lokalisiert. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Tumoren konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Expressionen der microRNAs und dem Ausmaß der jeweiligen Chromosomenaberrationen detektiert werden ($p \leq 0,001$).

Die beiden auf dem Chromosomenabschnitt 1p lokalisierten microRNAs 34a und 200a zeigten sich bei Tumoren der Konvexität tendenziell geringer exprimiert, allerdings in nicht signifikanter Ausprägung (microRNA 34a: $p = 0,166$, microRNA 200a: $p = 0,244$).

Dies trifft auch auf die microRNA 21 im Tumor zu, die auf dem Chromosom 17 lokalisiert ist ($p = 0,114$). Die teilweise knapp verfehlten Signifikanzen sind höchstwahrscheinlich mit der im Vergleich zu den Vorarbeiten erniedrigten Fallzahl zu erklären. Für die microRNA 409 im Tumor wurde eine dahingehende Signifikanz ($p = 0,576$) ebenso wie für das Chromosom 14 deutlich verfehlt ($p = 0,726$).

Somit ist es nachvollziehbar, dass sich auch die untersuchten microRNAs im Blut hinsichtlich ihrer Expressionsmuster jeweils nicht zwischen den Kategorien Konvexität und Schädelbasis unterscheiden.

5.10 Expressionsunterschiede der microRNAs zwischen erstdiagnostizierten Tumoren und Rezidiven

Die im Tumor detektierte microRNA 200a zeigte als einzige untersuchte microRNA eine signifikant geringere Expression bei Rezidiven als bei erstdiagnostizierten Meningeomen ($p = 0,009$).

Saydam et al. konnten experimentell zeigen, dass die microRNA 200a einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von Meningeomzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hat. So kann eine künstlich hochregulierte microRNA 200a das Wachstum von Meningeomzellen *in vitro* und in einem Xenograft-Tumormodell *in vivo* hemmen, wohingegen eine Herunterregulation das Tumorzellwachstum beschleunigt. In WHO Grad I Meningeomen zeigte sich im Vergleich zu gesundem Arachnoidalzellgewebe eine Herunterregulation der microRNA 200a um das 25-fache. Eine Herunterregulation der microRNA 200a führt zu einer erhöhten Expression der Regulatorproteine β -Catenin und Cyclin D1, die einen Einfluss auf die Zellproliferation haben (SAYDAM et al., 2009).

Bei vielen Tumorerkrankungen spielt der Wnt/ β -Catenin Signalweg eine entscheidende Rolle (SAYDAM et al., 2009). Die Abläufe dieses Signalweges wurden bereits bei unterschiedlichen Tumorentitäten untersucht, z.B. in Bezug auf das Metastasierungsverhalten des kolorektalen Karzinoms (HUANG, DU, 2008).

MicroRNAs hemmen posttranskriptionell die Genexpression (BARTEL, 2004; FIRE et al., 1998). Die microRNA 200a hemmt direkt die Translation der β -Catenin-mRNA und somit den Wnt/ β -Catenin Signalweg. Somit konnte im soliden Meningeom eine direkte Korrelation zwischen der Herunterregulation der microRNA 200a und der Hochregulation von β -Catenin gezeigt werden (SAYDAM et al., 2009).

Auch der E-Cadherin-Signalweg spielt in diesem Zusammenhang eine maßgebliche Rolle. Eine Herunterregulation der microRNA 200a führt über eine Hochregulation der Transkriptionsfaktoren ZEB 1 und SIP1 zu einer verringerten Expression von E-Cadherin. Dieses Adhäsionsprotein ist am Prozess der Zelldifferenzierung beteiligt. Es zeigt sich in Meningeomen vermindert exprimiert und steigert die Verfügbarkeit von β -Catenin im Zytoplasma bzw. Nukleus. Somit wird die Zell zu Zell Adhäsion geschwächt, was aller Wahrscheinlichkeit nach eine Rolle in der Onkogenese spielt (SAYDAM et al., 2009).

Bereits in der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von Mitgliedern der microRNA 200 Familie die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beeinflusst, was als einer der primären Schritte der Onkogenese gilt. Somit trägt eine Herunterregulation der microRNA 200a über zwei konvergierende Wege zur Tumorentstehung bei (SAYDAM et al., 2009).

Da Rezidive häufig mit einem aggressiveren Wachstumsmuster assoziiert werden können (KETTER et al., 2008; LINSLER et al., 2014; LOUIS et al., 2016a; MÜLLER et al., 1999), liegt die

Schlussfolgerung nahe, dass die verminderte Expression der microRNA 200a mit Meningeomrezidiven in Verbindung gebracht werden kann.

In dieser Arbeit konnte in den Ergebnissen der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ein signifikant häufigerer Verlust des Chromosomenabschnittes 1p bei den Rezidivtumoren im Vergleich zu erstdiagnostizierten Meningeomen detektiert werden. Da der Verlust des Chromosomenabschnittes 1p als bedeutendster Marker für Rezidive beim Meningeom gilt, können die entsprechenden Vorergebnisse von Ketter et al. bestätigt werden (KETTER et al., 2001; KETTER et al., 2008). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit eine hochsignifikante Korrelation der Expressionen der microRNA 200a mit den Aberrationen des Chromosomenabschnittes 1p gezeigt werden ($p \leq 0,001$). Bezogen auf die gleichen Tumore konnte, wie bereits erwähnt, bei Rezidiven eine signifikant geringere Expression der microRNA 200a im Vergleich zu den Erstdiagnosen aufgezeigt werden. Diese Feststellung erfolgte WHO Grad unabhängig, da im Tumor kein signifikanter Expressionsunterschied der microRNA 200a zwischen den WHO Graden I und II detektiert werden konnte (siehe Abschnitt 5.7).

Dieses Ergebnis ist auch aus einer translationalen Perspektive von Interesse. Basierend auf der Erkenntnis, dass eine künstlich hochregulierte microRNA 200a einen inhibitorischen Einfluss auf das Tumorzellwachstum hat, wäre dies ein Ansatz für eine zukünftige Gentherapie (SAYDAM et al., 2009). Die in unserer Arbeit gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass ein therapeutischer Effekt bei Tumorrezidiven noch deutlicher als bei Erstdiagnosen ausfallen müsste. Dementsprechend könnte dann auch Patienten, die an einem lokalisationsbedingt schwer resezierbaren Tumor leiden, eine Behandlung angeboten werden. Gerade für Patienten mit inoperablen Tumoren wäre vor dem Hintergrund der hier derzeit limitierten Behandlungsmöglichkeiten die Entwicklung eines genbasierten Therapieansatzes wünschenswert. Dieses Vorgehen wäre ein weiterer Schritt in Richtung einer personalisierten Medizin, in der individuell passende Therapieoptionen zielgerichtet auf der Grundlage molekularer Prinzipien zur Anwendung kommen.

Allerdings ist zu diskutieren, warum die microRNA 34a, deren Gen auch auf dem Chromosomenabschnitt 1p lokalisiert ist, sich nicht auch bei Rezidivtumoren signifikant herunterreguliert zeigt. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Genomsequenz auf dem Chromosomenabschnitt 1p, welche für die microRNA 200a kodiert, bei Rezidiven der untersuchten Stichprobe häufiger deletiert ist als der Bereich der microRNA 34a. Dennoch zeigt sich die microRNA 34a im Vergleich zu den anderen untersuchten microRNAs bei Rezidivtumoren tendenziell geringer exprimiert ($p = 0,187$).

Für die anderen untersuchten Chromosomen 14 und 17 konnten keine signifikanten Aberrationsunterschiede zwischen erstdiagnostizierten Tumoren und Rezidiven detektiert werden.

Aufgrund der hochsignifikanten Korrelation zwischen molekularzytogenetischer und epigenetischer Ebene ($p \leq 0,001$) ist dies der wahrscheinlichste Erklärungsansatz, warum eine Signifikanz auch für die entsprechenden microRNAs 409 und 21 verpasst wurde.

Im Gegensatz zum untersuchten Tumormaterial konnten im Blut keinerlei Unterschiede zwischen Primärtumoren und Rezidiven bezüglich der microRNA 200a bzw. der anderen microRNAs gefunden werden. Hinsichtlich der Sekretionsmechanismen von zellgebundenen microRNAs in das Blut gibt es, wie in Abschnitt 5.3 beschrieben, mehrere Theorien (ZHI et al., 2016). Allerdings sind diesbezüglich noch viele Fragen ungeklärt (ZHI et al., 2016). Zusätzlich wird das microRNA Spektrum durch verschiedene Pathologien wie Diabetes mellitus Typ 2 (YANG et al., 2017) oder kardiovaskuläre Erkrankungen (ZHOU et al., 2018), welche eher in höherem Lebensalter auftreten, in unklarem Ausmaß beeinflusst (siehe Abschnitt 5.6). Auch treten Rezidive durchschnittlich in einem höheren Lebensalter als Erstdiagnosen auf. Somit ist es nachvollziehbar, dass sich gerade bei Rezidivtumoren eine blutbasierte microRNA Analyse als besonders schwierig erweist.

In einer Publikation von Zhi et al. konnte eine hohe Expression der microRNA 409 im Blutserum mit einer erhöhten Rezidivrate korreliert werden (ZHI et al., 2016). Diese Blutproben wurden jedoch nur einmalig bei 1200g für 10 Minuten zentrifugiert (ZHI et al., 2016) und nicht wie in der hier präsentierten Arbeit zwei Mal für 10 Minuten je bei 1900g und bei 16000g (siehe Abschnitt 5.3). Somit ist zu erwarten, dass mehr zelluläre microRNAs gemessen wurden. Außerdem basierte das Projekt von Zhi et al. auf der Analyse von Blutserum. Die Expressionsniveaus der untersuchten microRNAs wurden mithilfe der synthetischen cel-miR-39 als externe Kontrolle normalisiert und nicht wie in der dargestellten Arbeit mit einer endogenen Kontrolle (RNU6B). Auch wurden in dem Projekt von Zhi et al. nur erstdiagnostizierte Meningeome untersucht und dann über den Verlauf mehrerer Jahre nachbeobachtet. Somit sind die Arbeiten nur eingeschränkt vergleichbar.

Zusammenfassend lässt sich als wichtigstes Ergebnis dieser Promotionsarbeit feststellen, dass ausgehend von der molekularzytogenetischen Ebene mit der microRNA 200a im Tumor erstmals ein auf dem Chromosomenabschnitt 1p basierender, WHO Grad unabhängiger, Rezidivmarker für Meningeome auf der epigenetischen Ebene detektiert werden konnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson AD, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, eds. (2012). *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, 4 edn (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).
2. Andrae S, Avelini P, Berg M, Blank I, Burk A, Dierolf A, Dockter G, Dold C, Evers M, Fath R, Fixl H, Flüeck S, Gehrke B, Gießen-Scheidel M, Graf N, Häfner R, Hecker RM, Henn W, Jassoy C, Kampe C, Kerbl R, Meißner T, Neuhäuser G, Ramsthaler S, Ross R, Schneider H, Schwarzkopf A, Schwencke S, Sebeková K, Skibbe X, Sökeland J, Steinhage K, Toth R, von Hayek D, Wehmeier PM, Witte F, Zabransky S, Zinßer D, eds. (2006). *Lexikon der Krankheiten und Untersuchungen* (Georg Thieme Verlag KG. Stuttgart).
3. Applied Biosystems (2005). *TaqMan® MicroRNA Assays Protocol* (Applied Biosystems)
4. Bachman J (2013) Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol* 530:67-74
5. Balik V, Srovnal J, Sulla I, Kalita O, Foltanova T, Vaverka M, Hrabalek L, Hajduch M (2013) MEG3: a novel long noncoding potentially tumour-suppressing RNA in meningiomas. *J Neurooncol* 112:1-8
6. Baltimore D (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209-1211
7. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297
8. Bello MJ, Aminosio C, Lopez-Marin I, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, Alonso ME, Lomas J, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Isla A, Gutierrez M, Sarasa JL, Rey JA (2004) DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in meningiomas: relationship with the allelic status at 1p and 22q. *Acta Neuropathol* 108:413-421
9. Bhowmik A, Khan R, Ghosh MK (2015) Blood brain barrier: a challenge for effectual therapy of brain tumors. *Biomed Res Int* 2015:320941
10. Bouvier C, Liprandi A, Colin C, Giorgi R, Quilichini B, Metellus P, Figarella-Branger D (2005) Lack of alkaline phosphatase activity predicts meningioma recurrence. *Am J Clin Pathol* 124:252-258
11. Buerki RA, Horbinski CM, Kruser T, Horowitz PM, James CD, Lukas RV (2018) An overview of meningiomas. *Future Oncol* 14:2161-2177
12. Cagnacci A, Venier M (2019) The Controversial History of Hormone Replacement Therapy. *Medicina (Kaunas)* 55
13. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15524-15529
14. Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM (1993) Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 53:1312-1316
15. Cerritelli SM, Crouch RJ (2009) Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS J* 276:1494-1505
16. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33:e179
17. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18:997-1006
18. Choy W, Kim W, Nagasawa D, Stramotas S, Yew A, Gopen Q, Parsa AT, Yang I (2011) The molecular genetics and tumor pathogenesis of meningiomas and the future directions of meningioma treatments. *Neurosurg Focus* 30:E6
19. Christiaans I, Kenter SB, Brink HC, van Os TA, Baas F, van den Munckhof P, Kidd AM, Hulsebos TJ (2011) Germline SMARCB1 mutation and somatic NF2 mutations in familial multiple meningiomas. *J Med Genet* 48:93-97
20. Cojocari D (2010). *Lentiviral delivery of shRNA expression construct for stable integration and expression of shRNA. ShRNA processing and inhibitory mechanisms.* (University of Toronto)

21. Dalmay T (2008) MicroRNAs and cancer. *J Intern Med* 263:366-375
22. Dang M, Modi J, Roberts M, Chan C, Mitchell JR (2013) Validation study of a fast, accurate, and precise brain tumor volume measurement. *Comput Methods Programs Biomed* 111:480-487
23. Dawson MA, Kouzarides T (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 150:12-27
24. Dissemmond J, Grabbe S (2006) [Non-surgical therapy of basal cell carcinoma of the head-neck region]. *Laryngorhinootologie* 85:133-141; quiz 142-133
25. Duan ZY, Cai GY, Li JJ, Bu R, Wang N, Yin P, Chen XM (2018) U6 can be used as a housekeeping gene for urinary sediment miRNA studies of IgA nephropathy. *Sci Rep* 8:10875
26. Durrbaum M, Kruse C, Nieken KJ, Habermann B, Storchova Z (2018) The deregulated microRNAome contributes to the cellular response to aneuploidy. *BMC Genomics* 19:197
27. El-Gewely MR, Andreassen M, Walquist M, Ursvik A, Knutsen E, Nystad M, Coucheron DH, Myrnel KS, Hennig R, Johansen SD (2016) Differentially Expressed MicroRNAs in Meningiomas Grades I and II Suggest Shared Biomarkers with Malignant Tumors. *Cancers (Basel)* 8
28. Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259-269
29. Figueroa JM, Carter BS (2018) Detection of glioblastoma in biofluids. *J Neurosurg* 129:334-340
30. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811
31. Galani V, Lampri E, Varouksi A, Alexiou G, Mitselou A, Kyritsis AP (2017) Genetic and epigenetic alterations in meningiomas. *Clin Neurol Neurosurg* 158:119-125
32. Goutagny S, Kalamarides M (2010) Meningiomas and neurofibromatosis. *J Neurooncol* 99:341-347
33. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34:D140-144
34. Gutmann DH, Donahoe J, Perry A, Lemke N, Gorse K, Kittiniyom K, Rempel SA, Gutierrez JA, Newsham IF (2000) Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum Mol Genet* 9:1495-1500
35. Harland TA, Freeman JL, Davern M, McCracken DJ, Celano EC, Lillehei K, Olson JJ, Ormond DR (2018) Progesterone-only contraception is associated with a shorter progression-free survival in premenopausal women with WHO Grade I meningioma. *J Neurooncol* 136:327-333
36. Hemmer S, Urbschat S, Oertel J, Ketter R (2019) Deletions in the 17q chromosomal region and their influence on the clonal cytogenetic evolution of recurrent meningiomas. *Mol Cytogenet* 12:22
37. Henn W, Urbschat S (1998) Genetische Grundlagen der Entstehung von Hirntumoren. *Der Radiologe* 38:898-903
38. Hirschberger S, Hubner M, Strauss G, Effinger D, Bauer M, Weis S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kreth S (2019) Identification of suitable controls for miRNA quantification in T-cells and whole blood cells in sepsis. *Sci Rep* 9:15735
39. Holleccek B, Zampella D, Urbschat S, Sahn F, von Deimling A, Oertel J, Ketter R (2019) Incidence, mortality and outcome of meningiomas: A population-based study from Germany. *Cancer Epidemiol* 62:101562
40. Holzapfel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real - Time - PCR (qRT - PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit* 37:120-126
41. Hopman AH, Ramaekers FC, Raap AK, Beck JL, Devilee P, van der Ploeg M, Vooijs GP (1988) In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochemistry* 89:307-316
42. Hsu DW, Efird JT, Hedley-Whyte ET (1997) Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *J Neurosurg* 86:113-120
43. Huang D, Du X (2008) Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. *World J Gastroenterol* 14:1823-1827
44. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65:7065-7070

45. Jaaskelainen J, Haltia M, Servo A (1986) Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. *Surg Neurol* 25:233-242
46. Jacobsen KS, Nielsen KO, Winther TN, Glebe D, Pociot F, Høgh B (2016) Identification of valid reference genes for microRNA expression studies in a hepatitis B virus replicating liver cell line. *BMC Res Notes* 9:38
47. Jozefczuk J, Adjaye J (2011) Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. *Methods Enzymol* 500:99-109
48. Katar S, Baran O, Evran S, Cevik S, Akkaya E, Baran G, Antar V, Hanimoglu H, Kaynar MY (2017) Expression of miRNA-21, miRNA-107, miRNA-137 and miRNA-29b in meningioma. *Clin Neurol Neurosurg* 156:66-70
49. Ketter R, Henn W, Niedermayer I, Steilen-Gimbel H, König J, Zang KD, Steudel WI (2001) Predictive value of progression-associated chromosomal aberrations for the prognosis of meningiomas: a retrospective study of 198 cases. *J Neurosurg* 95:601-607
50. Ketter R, Kim YJ, Storck S, Rahnenführer J, Romeike BF, Steudel WI, Zang KD, Henn W (2007a) Hyperdiploidy defines a distinct cytogenetic entity of meningiomas. *J Neurooncol* 83:213-221
51. Ketter R, Urbschat S, Henn W, Feiden W, Beerenwinkel N, Lengauer T, Steudel WI, Zang KD, Rahnenführer J (2007b) Application of oncogenetic trees mixtures as a biostatistical model of the clonal cytogenetic evolution of meningiomas. *Int J Cancer* 121:1473-1480
52. Ketter R, Rahnenführer J, Henn W, Kim YJ, Feiden W, Steudel WI, Zang KD, Urbschat S (2008) Correspondence of tumor localization with tumor recurrence and cytogenetic progression in meningiomas. *Neurosurgery* 62:61-69; discussion 69-70
53. Kirsch M, Zhu JJ, Black PM (1997) Analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 20:53-59
54. Kolostova K, Pospisilova E, Pavlickova V, Bartos R, Sames M, Pawlak I, Bobek V (2021) Next generation sequencing of glioblastoma circulating tumor cells: non-invasive solution for disease monitoring. *Am J Transl Res* 13:4489-4499
55. Kopkova A, Sana J, Machackova T, Vecera M, Radova L, Trachtova K, Vybihal V, Smrcka M, Kazda T, Slaby O, Fadrus P (2019) Cerebrospinal Fluid MicroRNA Signatures as Diagnostic Biomarkers in Brain Tumors. *Cancers (Basel)* 11
56. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27:95-125
57. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853-858
58. Lamszus K (2004) Meningioma pathology, genetics, and biology. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:275-286
59. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858-862
60. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854
61. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-419
62. Linsler S, Kraemer D, Driess C, Oertel J, Kammers K, Rahnenführer J, Ketter R, Urbschat S (2014) Molecular biological determinations of meningioma progression and recurrence. *PLoS One* 9:e94987
63. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25:402-408
64. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, eds. (2016a). WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, 4 edn (International Agency for Research on Cancer (IARC)).
65. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016b) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131:803-820
66. Ludwig N, Kim YJ, Mueller SC, Backes C, Werner TV, Galata V, Sartorius E, Bohle RM, Keller A, Meese E (2015) Posttranscriptional deregulation of signaling pathways in meningioma subtypes by differential expression of miRNAs. *Neuro Oncol* 17:1250-1260

67. Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ (2005) Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 434:666-670
68. Marton E, Varga A, Szeles L, Goczi L, Penyige A, Nagy B, Szilagyi M (2020) The Cell-Free Expression of MiR200 Family Members Correlates with Estrogen Sensitivity in Human Epithelial Ovarian Cells. *Int J Mol Sci* 21
69. Mawrin C (2019) [Molecular biology, diagnosis, and therapy of meningiomas]. *Pathologe* 40:514-518
70. Meese E, Blin N, Zang KD (1987) Loss of heterozygosity and the origin of meningioma. *Hum Genet* 77:349-351
71. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15:185-197
72. Melotte V, Qu X, Ongenaert M, van Criekinge W, de Bruine AP, Baldwin HS, van Engeland M (2010) The N-myc downstream regulated gene (NDRG) family: diverse functions, multiple applications. *FASEB J* 24:4153-4166
73. Mihaila D, Gutierrez JA, Rosenblum ML, Newsham IF, Bogler O, Rempel SA, Consortium NC (2003) Meningiomas: analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in tumor progression and the delineation of four regions of chromosomal deletion in common with other cancers. *Clin Cancer Res* 9:4435-4442
74. Montani F, Bianchi F (2016) Circulating Cancer Biomarkers: The Macro-revolution of the Micro-RNA. *EBioMedicine* 5:4-6
75. Mulisch M, Welsch U, eds. (2010). *Romeis - Mikroskopische Technik*, 18 edn (Spektrum Akademischer Verlag).
76. Müller P, Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Feiden W, Steudel WI, Zang KD, Steilen-Gimbel H (1999) Deletion of chromosome 1p and loss of expression of alkaline phosphatase indicate progression of meningiomas. *Clin Cancer Res* 5:3569-3577
77. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
78. Nagaraj S, Laskowska-Kaszub K, Debski KJ, Wojsiat J, Dabrowski M, Gabryelewicz T, Kuznicki J, Wojda U (2017) Profile of 6 microRNA in blood plasma distinguish early stage Alzheimer's disease patients from non-demented subjects. *Oncotarget* 8:16122-16143
79. Niedermayer I, Feiden W, Henn W, Steilen-Gimbel H, Steudel WI, Zang KD (1997) Loss of alkaline phosphatase activity in meningiomas: a rapid histochemical technique indicating progression-associated deletion of a putative tumor suppressor gene on the distal part of the short arm of chromosome 1. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:879-886
80. Noren Hooten N, Abdelmohsen K, Gorospe M, Ejiogu N, Zonderman AB, Evans MK (2010) microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS One* 5:e10724
81. Nunes F, Shen Y, Niida Y, Beauchamp R, Stemmer-Rachamimov AO, Ramesh V, Gusella J, MacCollin M (2005) Inactivation patterns of NF2 and DAL-1/4.1B (EPB41L3) in sporadic meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 162:135-139
82. Olena AF, Patton JG (2010) Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 222:540-545
83. Ouboussad L, Hunt L, Hensor EMA, Nam JL, Barnes NA, Emery P, McDermott MF, Buch MH (2017) Profiling microRNAs in individuals at risk of progression to rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 19:288
84. Ozata DM, Gainetdinov I, Zoch A, O'Carroll D, Zamore PD (2019) PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat Rev Genet* 20:89-108
85. Ozkan E, Lacerda MP (2021). *Genetics, Cytogenetic Testing And Conventional Karyotype*. In *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
86. Papan C, Weber LT, eds. (2019). *Repetitorium Kinder- und Jugendmedizin* (Springer-Verlag GmbH).
87. Park JE, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, Patel DJ, Kim VN (2011) Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* 475:201-205
88. Petrilli AM, Fernandez-Valle C (2016) Role of Merlin/NF2 inactivation in tumor biology. *Oncogene* 35:537-548

89. Pham MH, Zada G, Mosich GM, Chen TC, Giannotta SL, Wang K, Mack WJ (2011) Molecular genetics of meningiomas: a systematic review of the current literature and potential basis for future treatment paradigms. *Neurosurg Focus* 30:E7
90. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W (2007) Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 17:118-126
91. Popov A, Szabo A, Mandys V (2015) Small nucleolar RNA U91 is a new internal control for accurate microRNAs quantification in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 15:774
92. Pulst SM, Rouleau GA, Marineau C, Fain P, Sieb JP (1993) Familial meningioma is not allelic to neurofibromatosis 2. *Neurology* 43:2096-2098
93. QIAGEN (2020). *miRNeasy Serum/Plasma Handbook* (QIAGEN)
94. Rao DD, Wang Z, Senzer N, Nemunaitis J (2013) RNA interference and personalized cancer therapy. *Discov Med* 15:101-110
95. Roelvink NC, Kamphorst W, van Alphen HA, Rao BR (1987) Pregnancy-related primary brain and spinal tumors. *Arch Neurol* 44:209-215
96. Rouleau GA, Wertelecki W, Haines JL, Hobbs WJ, Trofatter JA, Seizinger BR, Martuza RL, Superneau DW, Conneally PM, Gusella JF (1987) Genetic linkage of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature* 329:246-248
97. Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B, et al. (1993) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 363:515-521
98. Sahm F, Schrimpf D, Olar A, Koelsche C, Reuss D, Bissel J, Kratz A, Capper D, Schefzyk S, Hielscher T, Wang Q, Sulman EP, Adeberg S, Koch A, Okuducu AF, Brehmer S, Schittenhelm J, Becker A, Brokinkel B, Schmidt M, Ull T, Gousias K, Kessler AF, Lamszus K, Debus J, Mawrin C, Kim YJ, Simon M, Ketter R, Paulus W, Aldape KD, Herold-Mende C, von Deimling A (2016) TERT Promoter Mutations and Risk of Recurrence in Meningioma. *J Natl Cancer Inst* 108
99. Sahm F, Schrimpf D, Stichel D, Jones DTW, Hielscher T, Schefzyk S, Okonechnikov K, Koelsche C, Reuss DE, Capper D, Sturm D, Wirsching HG, Berghoff AS, Baumgarten P, Kratz A, Huang K, Wefers AK, Hovestadt V, Sill M, Ellis HP, Kurian KM, Okuducu AF, Jungk C, Drueschler K, Schick M, Bewerunge-Hudler M, Mawrin C, Seiz-Rosenhagen M, Ketter R, Simon M, Westphal M, Lamszus K, Becker A, Koch A, Schittenhelm J, Rushing EJ, Collins VP, Brehmer S, Chavez L, Platten M, Hanggi D, Unterberg A, Paulus W, Wick W, Pfister SM, Mittelbronn M, Preusser M, Herold-Mende C, Weller M, von Deimling A (2017) DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol* 18:682-694
100. Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N (2003) Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics* 82:323-330
101. Saydam O, Shen Y, Wurdinger T, Senol O, Boke E, James MF, Tannous BA, Stemmer-Rachamimov AO, Yi M, Stephens RM, Fraefel C, Gusella JF, Krichevsky AM, Breakefield XO (2009) Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol Cell Biol* 29:5923-5940
102. Schild TA (ohne Jahresangabe). *Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie* (Applied Biosystems GmbH)
103. Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K (2015) Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem* 61:1333-1342
104. Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnick RE, Tew JM, Jr., Menon AG (1995) Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res* 55:4696-4701
105. Simpson D (1957) The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:22-39
106. Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* 5:659-669
107. Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2003) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10:1026-1032

108. Sorensen SS, Nygaard AB, Carlsen AL, Heegaard NHH, Bak M, Christensen T (2017) Elevation of brain-enriched miRNAs in cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic stroke. *Biomark Res* 5:24
109. Spiegelman S, Watson KF, Kacian DL (1971) Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:2843-2845
110. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV (2019) Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev* 99:21-78
111. Temin HM, Mizutani S (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-1213
112. Thermo_Fisher_Scientific (2016a). Real-time PCR: understanding Ct (Thermo Fisher Scientific Inc.)
113. Thermo_Fisher_Scientific (2016b). StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Installation, Networking, and Maintenance (Thermo Fisher Scientific Inc.)
114. Thermo_Fisher_Scientific (2019). TaqMan™ Gene Expression Assays—single-tube assays (Thermo Fisher Scientific Inc.)
115. Thermo_Fisher_Scientific (ohne Jahresangabe). TaqMan Gene Expression Assay solutions (Thermo Fisher Scientific Inc.)
116. Thomas L, ed. (2005). *Labor und Diagnose*, 6 edn (Th-Books).
117. Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulaski K, et al. (1993) A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 72:791-800
118. Urbschat S, Rahnenfuhrer J, Henn W, Feiden W, Wemmert S, Linsler S, Zang KD, Oertel J, Ketter R (2011) Clonal cytogenetic progression within intratumorally heterogeneous meningiomas predicts tumor recurrence. *Int J Oncol* 39:1601-1608
119. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034
120. Vogel H, ed. (2009). *Nervous System: Cambridge Illustrated Surgical Pathology* (CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS).
121. Werner TV, Hart M, Nickels R, Kim YJ, Menger MD, Bohle RM, Keller A, Ludwig N, Meese E (2017) MiR-34a-3p alters proliferation and apoptosis of meningioma cells in vitro and is directly targeting SMAD4, FRAT1 and BCL2. *Aging (Albany NY)* 9:932-954
122. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11:228-234
123. Yang ZM, Chen LH, Hong M, Chen YY, Yang XR, Tang SM, Yuan QF, Chen WW (2017) Serum microRNA profiling and bioinformatics analysis of patients with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Mol Med Rep* 15:2143-2153
124. Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ (2013) The long and short of microRNA. *Cell* 153:516-519
125. Yoo-Jin K, Kim Y, Bochem N, Ketter R, Henn W, Feiden W (2008) [Meningiomas: multiparametric approach for risk stratification and grading]. *Pathologe* 29:428-433
126. Yuzawa S, Nishihara H, Tanaka S (2016) Genetic landscape of meningioma. *Brain Tumor Pathol* 33:237-247
127. Zang KD, Singer H (1967) Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 216:84-85
128. Zang KD (1982) Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 6:249-274
129. Zang KD (2001) Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet* 93:207-220
130. Zankl H, Zang KD (1972) Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. 4. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. *Humangenetik* 14:167-169
131. Zhi F, Shao N, Li B, Xue L, Deng D, Xu Y, Lan Q, Peng Y, Yang Y (2016) A serum 6-miRNA panel as a novel non-invasive biomarker for meningioma. *Sci Rep* 6:32067
132. Zhou SS, Jin JP, Wang JQ, Zhang ZG, Freedman JH, Zheng Y, Cai L (2018) miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 39:1073-1084

7. Publikationen

Vorträge

30. Wissenschaftliche Jahrestagung der Saarländischen Chirurgenvereinigung e. V. am 13. Juli 2022
Auswahl durch die Saarländische Chirurgenvereinigung e. V.

Landau B, Urbschat S, Wagenpfeil G, Schulz-Schaeffer W, Oertel J, Ketter R:
MicroRNA 200a als histologisch unabhängiger Marker für Meningeomrezidive: Expressionsanalyse eines microRNA-Panels bei Meningeomen

mit Erhalt des Nachwuchs-Preises 2022 der Saarländischen Chirurgenvereinigung e. V.

73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) vom 29. Mai – 01. Juni 2022
Auswahl nach Sichtung und Bewertung durch die Programmkommission der DGNC

Landau B, Urbschat S, Oertel J, Ketter R:
MicroRNA 200a as a histologically independent marker for meningioma recurrence: Expression analysis of a microRNA panel in meningiomas

Paper

Urbschat S, Landau B, Bewersdorf NC, Schuster C, Wagenpfeil G, Schulz-Schaeffer W, Oertel J, Ketter R:
MicroRNA 200a as histologically independent marker for meningioma recurrence: Results of a four microRNA panel analysis in meningiomas
Submitted

Buchkapitel

Fachbuch der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes über Meningeome
geplant

8. Danksagung

Meinen Dank möchte ich an dieser Stelle an verschiedene Personen richten, die mit ihrer Unterstützung entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein erster Dank geht an den Direktor der Klinik für Neurochirurgie, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Oertel, für die freundliche Aufnahme in die Abteilung und die Überlassung des Promotionsthemas.

Vielen Dank auch für die zahlreichen motivierenden Gespräche und die vielen wohlwollenden und konstruktiven Vorschläge.

Mein besonderer Dank geht an meine Betreuerin Frau Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat und meinen Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ketter.

Herzlichen Dank dafür, dass sie, trotz all ihrer beruflichen Verpflichtungen, immer Zeit für mich hatten. Danke für die Beratung bei der Auswahl des Promotionsthemas und der Abfassung des Ethikantrages, für die vielen Anregungen und Ratschläge, für das immer konstruktive Feedback und die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse.

Danke auch für die vielen persönlichen Gespräche und den Blick über den Horizont hinaus.

Das außergewöhnlich herzliche und unkomplizierte Verhältnis half mir insbesondere über die vielen Hürden hinweg, die sich dem Arbeiten in einem wissenschaftlichen Labor während der COVID-19-Pandemie in den Weg stellten.

Mein großer Dank geht auch an die medizinisch-technische Assistentin des Forschungslabors für experimentelle Neurochirurgie, Frau Sigrid Welsch, für die zuverlässige Unterstützung bei der Auswahl und Beschaffung der zu benutzenden Labormaterialien sowie bei der Arbeit mit der Tumorbank und für die alltägliche Hilfe im Labor.

In besonderem Maße geht mein Dank an meinen langjährigen Co-Doktoranden, Herrn Alexander Quiring, ohne dessen Ratschläge und Anleitungen bei der aufwendigen Einarbeitung in das Thema vieles nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt auch Frau Nina-Christin Bewersdorf, B.Sc. und Frau Celine Schuster, B.Sc. für die Bearbeitung und Auswertung der gesammelten Tumorproben mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Danke auch an Frau Bewersdorf für die Unterstützung bei der Probenaufnahme bei einem Teil der gesunden Probanden.

Außerdem danke ich Herrn Dr. med. Christoph Sippl für die hilfreichen Ratschläge in der Anfangsphase dieser Arbeit.

Vielen Dank für die allzeit gute und familiäre Atmosphäre im Labor der Neurochirurgie, die das Arbeiten erheblich erleichterte.

Auch bedanken möchte ich mich bei allen Ärztinnen und Ärzten der Klinik für Neurochirurgie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Oertel) sowie der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Volk) und beim gesamten OP-Personal für die Bergung der Tumorproben und die Hilfe bei der Blutentnahme. Ein großer Dank geht auch an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Klinik für Neurochirurgie und die weiteren Personen, die sich bereit erklärt haben, als gesunde Probandinnen und Probanden zur Verfügung zu stehen.

Danke auch an Frau Susanne Mathieu und Frau Wilhelmine Daub, die als Studienassistentin bzw. Archivarin der Klinik für Neurochirurgie eine große Hilfe bei bürokratischen Hürden waren.

Für die Unterstützung im Bereich Informationstechnik möchte ich mich bei Herrn Jörg Siefert bedanken.

Für die Benutzung des Laborarbeitsplatzes der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Schick) und der Klinik für Urologie und Kinderurologie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Stöckle) möchte ich mich beim gesamten Laborteam bedanken. Hierbei geht mein besonderer Dank an die medizinisch-technische Assistentin, Frau Ulrike Bechtel, an Herrn Dr. rer. nat. Florian Bochen und an Frau Dr. rer. nat. Silke Wemmert.

Für die sehr freundliche und geduldige Beratung bei der Auswertung der Ergebnisse mit der SPSS-Software möchte ich mich bei Frau Dipl.-Stat. Gudrun Wagenpfeil aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik (Direktor: Univ.-Prof. Dr. oec. publ. Stefan Wagenpfeil) bedanken.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer, dem Direktor des Instituts für Neuropathologie, möchte ich mich für die freundlichen Ratschläge bei der Erstellung der wissenschaftlichen Publikation bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner ärztlichen Kollegin Frau Samira Jonas bedanken. Neben ihren Ideen für das Layout und die Covergestaltung dieser Arbeit hat auch ihre sehr wertvolle mentale Unterstützung maßgeblich zum Gelingen des Gesamtprojektes beigetragen.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für das Korrekturlesen der Arbeit sowie für die große Unterstützung im Verlauf des gesamten Projektes bedanken.

9. Lebenslauf

Aus datenschutztechnischen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht

