

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Volker Tronnier

*In vitro* Effekt ionisierender Strahlung  
auf die Proliferation und Vitalität  
von Stammzell-ähnlichen Gliomzellen  
in Abhängigkeit von der adjuvanten  
Behandlung mit Temozolomid

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der  
Universität zu Lübeck

-Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von  
Anna Maria Dorenberg  
aus  
Oelde

Lüneburg 2015

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. et med. habil. Christina Zechel
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Jan Peter Goltz

Tag der mündlichen Prüfung: 5.4.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 5.4.2017

Promotionskommission der Sektion Medizin

*Meinen Eltern*

# I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis.....	5
II Abkürzungsverzeichnis.....	7
III Abbildungsverzeichnis.....	9
IV Tabellenverzeichnis.....	11
1. Zusammenfassung.....	12
2. Einleitung.....	13
2.1. Neuroepitheliale Tumore.....	13
2.2. Das Glioblastom (GBM).....	14
2.3. Diagnose und Therapieregime.....	16
2.4. Reparaturmechanismen.....	18
2.5. Deregulation von Signalwegen.....	20
2.6. Bedeutung der Bluthirnschranke.....	22
2.7. Tumorstammzellen und Stammzelltheorie.....	23
2.8. Fragestellung.....	28
3. Material und Methoden.....	30
3.1. Zellkultur.....	30
3.1.1. Kulturbedingungen.....	31
3.1.2. Beschichtung von Kulturgefäßen mit Fibronectin.....	31
3.1.3. Plattieren von Zellen.....	31
3.2. Untersuchungen zur Auswirkung von Bestrahlung und Temozolomid- Behandlung.....	32
3.2.1. Behandlung mit Temozolomid.....	34
3.2.2. Bestrahlung der Zellen.....	36
3.2.3. BrdU-ELISA.....	36
3.2.4. MTT-Assay.....	37
3.2.5. Zytotoxizitätstest.....	38
3.2.6. Durchflusszytometrie.....	39
3.2.7. Western Blot-Analyse.....	40
3.3. Statistik.....	43

4. Ergebnisse .....	44
4.1. Bestrahlung und kombinierte Therapie mit Temozolomid (TMZ) .....	44
4.1.1. Dosiswirkungskurven der Bestrahlung .....	44
4.1.2. Effekte der Kombinationsbehandlung .....	50
4.2. Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Gabe .....	62
4.2.1. Effekt auf die Proliferation .....	62
4.2.2. Effekt auf die Vitalität .....	67
4.2.3. Induktion der proteolytischen Spaltung von PARP-1 .....	74
4.2.4. Effekt auf die Expressionslevel von Zellzyklusinhibitoren .....	76
4.2.5. Effekte auf den Zellzyklus .....	78
5. Diskussion .....	82
5.1. Dosiswirkungskurven ionisierender Strahlung .....	84
5.1.1. Strahlensensitivität der SLGC-Linien in Bezug zu deren Eigenschaften .....	88
5.2. Effekt von ionisierender Strahlung in Anwesenheit von TMZ .....	92
5.3. Effekt der Behandlungsregime .....	101
5.4. Konklusion und Ausblick .....	106
6. Literaturverzeichnis .....	109
7. Anhang .....	120
8. Erklärung .....	129
9. Danksagung .....	130
10. Lebenslauf .....	131

## II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolim-6-sulfonsäure)
adNSC	adulte neurale Stammzelle
adNPC	adulte neurale Progenitorzelle
bFGF	basic fibroblast growth factor
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BTSC	brain tumor stem cells
CD	cluster of differentiation - Gruppe immunologischer Oberflächenmarker
CDK	cyclin-dependent kinase - Zyklin-abhängige Kinase
CT	Computertomographie
d	Tag
dest.	Destilliert
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid - Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	Effektivkonzentration 50
ED <sub>50</sub>	Effektivdosis 50
EDTA	ethylenediaminetetraacidic acid - Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	endothelial growth factor receptor
engl.	englisch
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum - fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FSC	forwards scatter - Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
GBM	Glioblastom multiforme
GAM-PO	goat anti-mouse IgG (H+L) peroxidase
GAR-PO	goat anti-rabbit IgG (H+L) peroxidase
GFAP	glial fibrillary acidic protein - saures Gliafaserprotein
GOF	engl.: gain of function
GRB2	engl.: growth factor receptor-bound protein 2
Gsarc	Gliosarkom
GSC	glioma stem cells
Gy	Gray
h	Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
kDA	Kilo-Dalton
KOF	Körperoberfläche
LDH	Lactatdehydrogenase
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
min	Minute

MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MRT	Magnetresonanztomographie
mRNA	messenger RNA - Boten-RNA
MTT	
mut.	mutiert
Ne	Nestin
NPC	neurale Progenitorzelle
NSC	neurale Stammzelle
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS	phosphate buffered saline - phospatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PDGF-R	Platelet-derived growth factor receptor
PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog
RAS	engl.: rat sarcoma
RNA	ribonucleic acid - Ribonukleinsäure
RT	Radiotherapie
s	Sekunde
SCID	engl.: severe combined immunodeficiency
SDS	sodium dodecyl sulfat - Natriumdodecylsulfat
SLGC	stem-like glioma cells
Sox2	sex determining region Y (SRY)-box2 - geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2
SSC	sidewards scatter – Seitwärtsstreulicht
SSEA-1	engl.: stage-specific embryonic antigen 1
T	Tumor
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
TMZ	Temozolomid
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TUNEL	engl.: TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World health organization
wt.	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

### III Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Schema der GBM-Therapie (in Anlehnung an Stupp et al. 2007).....	17
<b>Abb. 2:</b> Schematische Darstellung des Behandlungskonzeptes mit Angabe der Zeitpunkte und der durchgeführten Analysen.....	34
<b>Abb. 3:</b> Behandlungsschema der 96-Loch-Mikrotiterplatten .....	35
<b>Abb. 4:</b> Behandlungsschema der Zellen in 25cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen.....	35
<b>Abb. 5:</b> Durchflusszytometrische Analyse Propidiumiodid-markierter mit DMSO behandelter Zellen der Linie T1495. ....	39
<b>Abb. 6:</b> Effekt ansteigender Strahlendosen auf den Einbau von BrdU in die DNA proliferierender SLGC-Linien. ....	45
<b>Abb. 7:</b> Effekt ansteigender Strahlendosen auf die Vitalität von SLGC-Linien.....	48
<b>Abb. 8:</b> Effekt steigender Strahlendosen in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). Analyse der Proliferation von SLGC-Linien.....	52
<b>Abb. 9:</b> Effekt steigender Strahlendosen in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). Analyse der Vitalität von SLGC-Linien.. ....	58
<b>Abb. 10:</b> Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Proliferation von SLGC-Linien.....	63
<b>Abb. 11:</b> Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Vitalität von Gliomzellen .....	69
<b>Abb. 12:</b> Auswirkungen der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH).....	73
<b>Abb. 13:</b> Proteolyse von PARP-1 in SLGC-Kulturen am Tag d3 nach Behandlung.....	75
<b>Abb. 14:</b> Relative Expression der Zellzyklusinhibitoren p21 <sup>Cip1/WAF1</sup> und p27 <sup>Kip1</sup> in behandelten und unbehandelten Gliomzellen .....	77
<b>Abb. 15:</b> Anteil lebender Zellen nach Bestrahlung und TMZ-Behandlung.....	79
<b>Abb. 16:</b> Einfluss der Bestrahlung und TMZ-Behandlung auf die Verteilung von SLGC-Zellen in den Zellzyklusphasen .....	80
<b>Abb. 17:</b> Effekt der Bestrahlung mit gesteigerten Dosen in An- und Abwesenheit von Temozolomid (TMZ) auf den Einbau von BrdU in die DNA .....	120
<b>Abb. 18:</b> Effekt ansteigender Strahlendosen auf den Einbau von BrdU in die DNA proliferierender SLGC-Linien .....	121

<b>Abb. 19:</b> Effekt steigender Strahlendosen in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). Analyse der Proliferation von SLGC-Linien.....	122
<b>Abb. 20:</b> Effekt der Bestrahlung mit gesteigerten Dosen in An- und Abwesenheit von Temozolomid (TMZ) auf die Vitalität von Gliomzellen.....	123
<b>Abb. 21:</b> Effekt ansteigender Strahlendosen auf die Vitalität von SLGC-Linien.....	124
<b>Abb. 22:</b> Effekt steigender Strahlendosen in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). Analyse der Vitalität von SLGC-Linien .....	125
<b>Abb. 23:</b> Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Proliferation von SLGC-Linien (I) .....	126
<b>Abb. 24:</b> Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Proliferation von SLGC-Linien (II). .....	126
<b>Abb. 25:</b> Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Vitalität von Gliomzellen (I) .....	127
<b>Abb. 26:</b> Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Vitalität von Gliomzellen (II) .....	127
<b>Abb. 27:</b> Auswirkungen der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH).....	128
<b>Abb. 28:</b> Expression des Zellzyklusinhibitors p21 <sup>Cip1/WAF1</sup> in der behandelten und unbehandelten SLGC-Linie T1522.....	128

## IV Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Patienteninformationen, Wachstumsverhalten, Morphologie und Stammzellcharakter der verwendeten SLGC-Linien .....	30
<b>Tab. 2:</b> Temozolomid-Konzentrationen, MGMT- und p53- Status der untersuchten SLGC-Linien .	33
<b>Tab. 3:</b> Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel .....	42
<b>Tab. 4:</b> Primärantikörper für die Western Blot-Analyse .....	42
<b>Tab. 5:</b> Sekundärantikörper für die Western Blot-Analyse.....	42
<b>Tab. 6:</b> Effektivdosis 50 (ED <sub>50</sub> ) der Bestrahlung bei SLGC-Linien in BrdU-ELISA und MTT-Assay .....	50
<b>Tab. 7:</b> Effekte der Doppelbehandlung mit TMZ und ionisierender Strahlung auf die Proliferation von Gliomzellen.....	56
<b>Tab. 8:</b> Effekt der Doppelbehandlung mit TMZ und ionisierender Strahlung auf die Vitalität von Gliomzellen .....	62
<b>Tab. 9:</b> Eigenschaften der untersuchten SLGC-Linien und Effektivität von alleiniger Bestrahlung und TMZ-Behandlung.....	88
<b>Tab. 10:</b> ED <sub>50</sub> -Proliferation und ED <sub>50</sub> -Vitalität in Abhängigkeit von der Anwesenheit von TMZ .....	95

# 1. Zusammenfassung

Das Glioblastom (GBM) und das Gliosarkom (GSarc) sind maligne Hirntumore mit einer sehr schlechten Prognose. Trotz einer aggressiven, multimodalen Therapie, die aus chirurgischer Resektion, fraktionierter Bestrahlung und adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) besteht, liegt die mittlere Überlebenszeit bei 14,6 (GBM) bzw. 8 bis 10 Monaten (GSarc). Ursachen dafür werden im infiltrativen Wachstum dieser Gliome und in der Aktivität der O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) gesehen, deren Expression epigenetisch reguliert wird. In Tumoren mit hypomethyliertem Promotor wird MGMT exprimiert, die die durch TMZ übertragenen Methyladdukte von der DNA entfernt. Eine weitere Ursache für die Radio- und Chemoresistenz ist die Existenz von Stammzell-ähnlichen Gliomzellen (SLGCs) im Tumor. SLGCs besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sind für den Tumorprogress und die Rezidivbildung von Bedeutung.

In dieser Arbeit wurden *in vitro* Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, welche Auswirkungen die Bestrahlung in An- und Abwesenheit von TMZ auf die Proliferation, die Vitalität, den Zellzyklus und die Apoptose von SLGCs hat. Hierzu wurden die Zellen in einem Ansatz einmalig mit Dosen von 2 bis 20 Gray (Gy) bestrahlt und in einem parallelen Ansatz zusätzlich mit TMZ behandelt. Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die unterschiedliche zeitliche Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Behandlung auf Proliferation und Vitalität auswirken. Dabei erfolgte die TMZ-Gabe entweder zeitgleich mit der einmaligen Bestrahlung oder 24h später.

Die Auswirkungen der alleinigen Bestrahlung waren dosisabhängig. Dosen unter 10 Gy zeigten nur bei zwei von acht SLGC-Linien einen hemmenden Effekt auf die Proliferation und induzierten bei keiner SLGC-Linie effizient den Zelltod. Grundsätzlich war die Hemmung der Proliferation ausgeprägter als die Reduktion der Vitalität. So lag die Effektivdosis 50 (ED<sub>50</sub>) hinsichtlich der Proliferation bei zwei der untersuchten SLGC-Linien bei 2 bzw. 5 Gy, bei drei Linien wurde sie mit 10 Gy, bei zwei Linien mit 20 Gy erreicht. Bei einer Linie wurde die ED<sub>50</sub> auch mit 20 Gy nicht erreicht. Hinsichtlich der Vitalität wurde die ED<sub>50</sub> bei keiner der SLGC-Linien mit den verwendeten Strahlendosen erreicht. In Kombination mit der Bestrahlung wies TMZ nur bei niedrigen Strahlendosen einen zusätzlichen Proliferations- und Vitalitäts-reduzierenden Effekt auf, der bei den untersuchten SLGC-Linien unterschiedlich stark ausgeprägt war. Umgekehrt verstärkte die Bestrahlung die Wirkung von TMZ in der Mehrheit der SLGC-Linien nur bei hohen Strahlendosen. Die zeitgleiche TMZ-Gabe und Bestrahlung erbrachte im Vergleich zur um 24h verzögerten TMZ-Applikation keine signifikanten Unterschiede. Insgesamt sind die Ergebnisse dahingehend zu interpretieren, dass TMZ bei suboptimaler Bestrahlung die Gliomtherapie verbessert und in diesem Fall der MGMT-Status als kritischer Parameter fungiert.

## 2. Einleitung

Die Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) lassen sich in hirneigene Tumore und intrazerebrale Metastasen einteilen. Zur Gruppe der hirneigenen Tumore zählen neuroepitheliale Tumore, Tumore der Meningen, Keimzelltumore, das ZNS betreffende Lymphome und hämatopoietische Neoplasien sowie Tumore der Sella. Gliome gehören zu den neuroepithelialen Tumoren und leiten sich histogenetisch von der Neuroglia ab. Man unterscheidet Astrozytome, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome, Ependymome und Glioblastome (Louis et al., 2007).

### 2.1. Neuroepitheliale Tumore

Gliome sind mit 70% die häufigsten intrakraniellen Tumore (Ohgaki und Kleihues, 2009). Nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahre 2007 (Louis et al., 2007) werden Gliome in WHO-Grad I bis IV unterteilt. Die Klassifizierung orientiert sich am Grad der Kernatypien, der Proliferationsrate, der Vaskularisierung, der Ausbildung von Nekrosen sowie dem Differenzierungsgrad (Huse und Holland, 2010). Je höher der Grad, desto maligner sind die Tumore. Der WHO-Grad des Glioms ist neben dem Alter des Patienten und seinem klinischen Zustand, sowie der Lokalisation und der chirurgischen Resektabilität des Tumors ein entscheidendes Kriterium für die Prognose und die jeweilige Therapie (Louis et al., 2007). WHO-Grad I Tumore, wie beispielsweise das pilozytische Astrozytom, sind Läsionen, die lediglich eine geringe Proliferationsaktivität aufweisen und nach deren chirurgischer Resektion in der Regel eine Heilung möglich ist. Sie treten insbesondere im Kindes- und Jugendalter auf. Diffuse Astrozytome werden als WHO-Grad II Tumore klassifiziert. Sie zeigen ein infiltrierendes Wachstum mit einer geringen Proliferationsrate und es besteht eine Chance auf Heilung. Diese Astrozytome können einen höheren Malignitätsgrad annehmen, z.B. den eines anaplastischen Astrozytoms, das als WHO-Grad III Tumor eingeordnet wird. Tumore dieses Grades weisen durch besondere histologische Merkmale wie z.B. nukleäre Atypien und durch eine rege mitotische Aktivität auf ihre Malignität hin. Hochmaligne Tumore wie Glioblastome oder Gliosarkome (WHO-Grad IV) sind durch eine ausgeprägte mitotische Aktivität sowie zahlreiche Nekrosen gekennzeichnet (Norden und Wen, 2006).

Patienten mit intrakraniellen Tumoren klagen in über 50% der Fälle über Kopfschmerzen, die oftmals durch das den Tumor umgebende Ödem und den dadurch entstandenen Hirndruck ausgelöst werden. Weitere häufige klinische Symptome des durch den Tumor verursachten intrakraniellen Druckanstieges sind Übelkeit, Nüchternbrechen und Sehstörungen. In seltenen Fällen kann der

Druckanstieg zu einer Stauungspapille führen. Die Lokalisation des Tumors spielt in Bezug auf fokal-neurologische Defizite eine wichtige Rolle. Als häufigste Defizite sind hier epileptische Anfälle, Gesichtsfeldausfälle durch eine Kompression des Chiasma opticums, ein Sprachdefizit und eine Hemiparese zu nennen. Ferner können intrakranielle Tumore durch Persönlichkeitsveränderungen und Gedächtnisverlust symptomatisch werden (Chang et al., 2005; Sizoo et al., 2010; Walbert und Khan, 2014).

Die Ursprungszelle, die für die Entstehung von Gliomen verantwortlich ist, ist bisher nicht eindeutig identifiziert (Huse und Holland, 2010). Es gibt Evidenzen dafür, dass neurale Stamm- oder Progenitorzellen im adulten Gehirn in Tumorzellen mutieren. Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass reife Astrozyten und Oligodendrozyten durch Mutationen eine Dedifferenzierung durchlaufen können und damit zu Tumor-induzierenden Zellen (engl.: *tumor-initiating cells*, TICs) werden (Huse und Holland, 2010; Sutter et al., 2007).

## 2.2. Das Glioblastom (GBM)

Die häufigsten WHO-Grad IV Tumore sind die Glioblastome, die entweder *de novo* entstehen (primäre GBMs) oder aus niedergradigen astrozytären Neoplasien hervorgehen (sekundäre GBMs) (Huse und Holland, 2010). Über 90 % der GBMs sind primäre, weniger als 10% sekundäre GBMs (Ohgaki und Kleihues, 2005). Die sekundären GBMs treten eher bei jüngeren Patienten auf und entwickeln sich wesentlich langsamer (Ohgaki und Kleihues, 2009). GBMs machen 55% der hirneigenen Tumore aus (Cho et al., 2013).

Das Gliosarkom (GSarc) wird häufig als eine Variante des GBMs angesehen. Die WHO beschreibt das GSarc als eine gut umschriebene Läsion mit identifizierbaren gliomatösen und metaplastisch mesenchymalen Anteilen (Han et al., 2010; Louis et al., 2007). Ein Teil erfüllt histologisch die Kriterien eines GBMs, ein anderer Teil enthält eine große Variabilität unterschiedlichsten Gewebes. Letzteres kann seinen Ursprung in Fibroblasten, Knorpel-, Muskel- oder ossären Zellen haben (Han et al., 2010).

Die Inzidenz der GSarcs macht 1,8 bis 2,8% der Inzidenz der GBMs aus (Louis et al., 2007; Lutterbach et al., 2001). Sie treten vor allem zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr auf. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Han et al., 2010). Epidemiologische Studien zeigten, dass die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit einem GSarc (8 bis 10 Monate) noch schlechter als die der GBM-Patienten (14,6 Monate) ist (Kozak et al., 2009). In diesen Studien wurde aber auch gezeigt, dass die Radiotherapie einen zusätzlichen Effekt auf die GSarc-Therapie hat (Biswas et al.,

2011; Han et al., 2010; Kozak et al., 2009; Romero-Rojas et al., 2013). GSarc-Patienten werden aufgrund der Seltenheit dieses Tumors und daher aufgrund einer nur geringen Anzahl vorhandener Studien ähnlich wie GBM-Patienten behandelt (Han et al., 2010). Lediglich eine Arbeitsgruppe vermutete eine eigene Tumor-Entität der GSarcs, da diese (1) eine andere Prädilektionsstelle (Temporallappen) als GBMs (Großhirnhemisphären, Balken) aufweisen, (2) makroskopisch Meningeomen ähneln, (3) im Gegensatz zu GBMs ein hohes Metastasierungspotential und (4) seltener eine EGFR (engl.: *endothelial growth factor receptor*)-Mutation aufweisen (Han et al., 2010).

Die Analysen einer Vielzahl von primären GBMs hinsichtlich genetischer Veränderungen und bestimmter Expressionsmuster führten zu einer Einteilung in vier GBM-Subtypen, die möglicherweise in der Zukunft eine Grundlage für unterschiedliche Therapieansätze darstellen könnten (Network, 2008). Es wird zwischen dem klassischen, dem mesenchymalen, dem proneuralen sowie dem neuronalen GBM-Subtyp unterschieden (Huse und Holland, 2010; Van Meir et al., 2010). Der klassische Subtyp zeichnet sich durch eine ausgeprägte Zellproliferation aus. Er ist durch die Amplifikation des EGFR-Gens sowie einen Verlust der PTEN- (Phosphatase und Tensin-Homolog) und CDKN2A-Genorte charakterisiert. Ferner weist dieser Subtyp eine verstärkte Expression des neuronalen Vorläufer- und Stammzellmarkers Nestin (Veselska et al., 2006) sowie eine Aktivierung der Notch- und Sonic hedgehog-Signalwege auf. GBMs vom klassischen Typ sprechen sehr gut auf die gängige Radiochemotherapie an, da der p53-Signalweg intakt ist (Verhaak et al., 2010). Der mesenchymale GBM-Subtyp weist ein Expressionsmuster auf, das mit dem Mesenchym und der Angiogenese assoziiert ist. Bei diesem Subtyp treten gehäuft Inaktivierungen der Gene NF1 (Neurofibromin), p53 und PTEN auf. Tumore dieses Subtyps sprechen auf aggressive Formen der Radiochemotherapie an. Der dritte GBM-Subtyp wird als proneural bezeichnet. Sein Expressionsmuster weist Ähnlichkeiten zu dem bei der neuronalen Entwicklung vorherrschenden Muster auf. So wurde ein hohes Expressionslevel oligodendrozytischer (z.B. OLIG2; Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor) und proneuraler (z.B. DCX; engl.: *doublecortin*) Entwicklungsgene beobachtet. GBMs dieses Subtyps exprimieren darüber hinaus den Transkriptionsfaktor Sox2 [engl.: *sex determining region Y (SRY)-Box 2*], der für die Aufrechterhaltung des Stammzellstatus in embryonalen (Chambers und Tomlinson, 2009) und neuronalen (Episkopou, 2005) Stammzellen von Bedeutung ist. Ferner sind bei den oftmals eher jungen Patienten Mutationen im Bereich der Gene des PDGFR $\alpha$  (engl.: *platelet-derived growth factor receptor 1*) sowie der Isozitratdehydrogenasen 1 und 2 (IDH1/2) festzustellen. In über 50% der Fälle ist der Tumorsuppressor p53 defekt. IDH1/2-Mutationen werden auch bei niedergradigen Gliomen nachgewiesen. Daher wird vermutet, dass die aus den niedergradigen Gliomen entstehenden sekundären GBMs zum proneuralen Subtyp zählen (Parsons et al., 2008; Verhaak et al., 2010). Der neurale Subtyp ist am wenigsten gut charakterisiert. Er weist hinsichtlich des Genexpressionsmusters große Ähnlichkeiten zum normalen

Hirngewebe auf. Insbesondere lässt sich eine Aktivierung von Genen erkennen, die für Neurofilamente [NEFL (Neurofilament-leichte-Kette Polypeptid), GABRA1 (Gamma-Amino-Buttersäure A Rezeptor, alpha 1), SYT1 (Synaptotagmin 1) und SLC12A5 [Lösliche Transporterfamilie 12 (Kalium/Chlorid-Transporter), Mitglied 5] kodieren. Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit Ausnahme des klassischen Subtyps (p53-Signalweg intakt) alle GBM-Subtypen eine Inaktivierung der p53- und Retinoblastom (Rb)-Signalwege sowie eine Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasewege aufweisen (Network, 2008; Preusser et al., 2006; Van Meir et al., 2010).

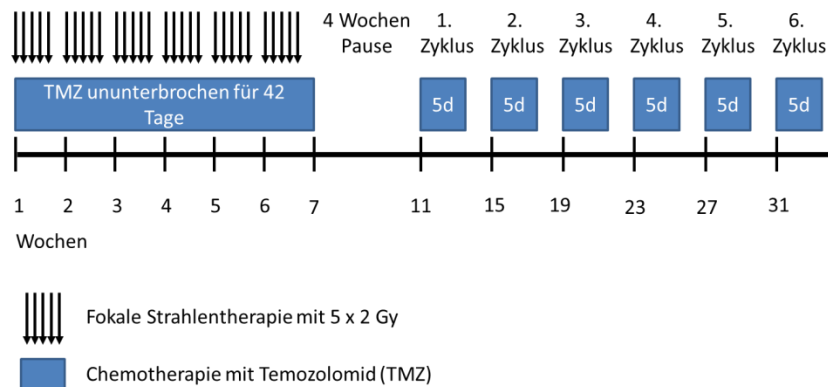
### **2.3. Diagnose und Therapieregime**

In der Diagnostik von GBMs spielen sowohl die radiologische Bildgebung als auch die Histologie eine Rolle. Sowohl computertomographisch als auch kernspintomographisch sind GBMs durch deutliche Inhomogenitäten gekennzeichnet, die durch das Auftreten von Nekrosen, Blutungen und perifokalen Ödemen entstehen. Typisch ist insbesondere in der Kernspintomographie die ringförmige Kontrastmittelaufnahme mit einem durch Nekrosen verursachten hypodensen Zentrum (Persano et al., 2011; Van Meir et al., 2010). Die endgültige Diagnose GBM kann jedoch nur mithilfe der Histologie gestellt werden. Mikroskopisch zeigen sich neben den auch makroskopisch nachweisbaren Nekrosen und Zysten nukleäre Atypien, eine ausgeprägte mitotische Aktivität sowie eine Vielzahl an mikrovaskulären Proliferaten (Brat und Van Meir, 2004; Van Meir et al., 2010). Derzeit sind Glioblastome trotz aller Fortschritte der aktuellen Forschung nicht heilbar. Das Auftreten von Therapieresistenzen ist nahezu die Regel und die Rezidivbildung unausweichlich.

Der „Goldstandard“ der Glioblastomtherapie umfasst derzeit die maximal mögliche chirurgische Resektion des Tumors und eine adjuvante Radiochemotherapie (Stupp et al., 2007; Stupp et al., 2005). Dabei erfolgt die Radiotherapie fraktioniert. Durch die Kombinationstherapie mit dem alkylierenden Agens Temozolomid (TMZ) konnte die mittlere Überlebensdauer von 12,1 Monaten auf 14,6 Monate gesteigert werden, die mittlere 2-Jahres-Überlebensrate wurde durch die zusätzliche Gabe von TMZ zur Radiotherapie von 10,4% auf 26,5% erhöht (Stupp et al., 2007; Stupp et al., 2005).

Nach chirurgischer Resektion zur Reduktion der Tumormasse wird der Patient über sechs Wochen an 5 Tagen pro Woche fraktioniert mit Einzeldosen von 2 Gy und somit mit einer Gesamtdosis von 60 Gy bestrahlt (Stupp et al., 2005). Adjuvant dazu erhält der Patient täglich das oral verabreichte Chemotherapeutikum TMZ über einen Zeitraum von 42 Tagen, wobei die Dosis typischerweise 75mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche (KOF) beträgt. Dieser sechswöchigen durchgängigen Radiochemotherapie folgt eine Therapiepause von vier Wochen. Im Anschluss daran wird der Patient in sechs

bis zwölf Zyklen mit einer alleinigen TMZ-Therapie behandelt (Stupp et al., 2007; Stupp et al., 2005). Die Anzahl der Zyklen ist dabei abhängig von Nebenwirkungen wie z.B. nicht beherrschbare Übelkeit, hämatotoxische Auswirkungen oder opportunistische Infektionen sowie vom Ansprechen auf die Therapie. Während eines 28-Tageszyklus werden dem Patienten über 5 Tage 150-200 mg/m<sup>2</sup> KOF/d TMZ mit einer darauffolgenden Pause von 23 Tagen verabreicht (Abb. 1) (Friedman et al., 2000; Norden und Wen, 2006).



**Abb. 1: Schema der GBM-Therapie (in Anlehnung an Stupp et al. 2007).** - 6-wöchige fraktionierte Bestrahlung an 5 Tagen in der Woche mit Fraktionen von 2 Gy/Tag. Adjuvante Temozolomid-Therapie (75mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche (KOF) über 42 Tage. Nach einer 4-wöchigen Therapiepause folgt die alleinige Chemotherapie mit TMZ (150 – 200 mg/m<sup>2</sup> KOF) in 28-Tageszyklen an den ersten 5 Tagen eines jeden Zyklus. Gy: Gray, d: Tag, TMZ: Temozolomid.

Die Ganzhirnbestrahlung für maligne Gliome fand erstmalig in den 70er Jahren statt und konnte die mittlere Überlebenszeit im Gegensatz zu konventionellen Maßnahmen postoperativ von 17 auf 37,5 Wochen steigern (Norden und Wen, 2006). Mittlerweile stellt die Standardradiotherapie eine für den Patienten schonendere partielle, nur das Tumorbett betreffende, fraktionierte Bestrahlung mit einer Maximaldosis von 60 Gy dar (Stupp und Hegi, 2007; Stupp et al., 2005). Studien mit einer höheren Strahlendosis oder anderen Fraktionierungsschemata im Gegensatz zum oben Beschriebenen erbrachten zunächst keinen Vorteil (Norden und Wen, 2006). In mehreren rezenten Studien wurde eine Hypofraktionierung mit z.T. Gesamtdosen bis 80 Gy getestet. Diese brachte im Vergleich zur Standardtherapie zwar keine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit, jedoch wurde bislang auch keine vermehrte Dosis-abhängige Toxizität beobachtet (Ammirati et al., 2014; Jastaniyah et al., 2013; Monjazeb et al., 2012).

Temozolomid (TMZ) ist das derzeit am häufigsten verwendete Medikament zur Behandlung von GBMs (Beier et al., 2008). Es wurde schon in den 80er Jahren an der Aston Universität als ein 3-Methylderivat von Mitozolomid, einem stark hämatotoxischen Chemotherapeutikum, syntheti-

siert (Friedman et al., 2000). Aufgrund seiner Eigenschaft, die Bluthirnschranke zu passieren, ist es besonders gut für die Therapie von Hirntumoren geeignet. Die Gabe erfolgt oral, im Gegensatz zu einem Großteil der übrigen Chemotherapeutika, die intravenös appliziert werden. TMZ verfügt über eine 100%ige Bioverfügbarkeit und akkumuliert nicht. Dadurch ist das Nebenwirkungspotential vergleichsweise gering, sodass TMZ in den meisten Fällen gut verträglich ist (Friedman et al., 2000). Es handelt sich bei TMZ um ein Prodrug, welches bei einem physiologischen pH-Wert spontan zum aktiven alkylierenden Metaboliten MTIC [5-(3-Methyltriazin-1-yl)imidazol-4-carboximid] konvertiert, so dass für seine Aktivierung keine hepatische Metabolisierung notwendig ist (Clark et al., 1995; Friedman et al., 2000). MTIC bewirkt eine Methylierung der DNA und wird durch diesen Vorgang in sein Abbauprodukt AIC (5-Aminoimidazol-4-carboxamid) umgewandelt, welches über die Nieren ausgeschieden wird (Friedmann et al. 2000).

Bislang konnte aufgrund von Resistenzen die durch die Standardtherapie erzielte mittlere Überlebensdauer von 14,6 Monaten nicht gesteigert werden. Eine Arbeitsgruppe fasste die Resistenzmechanismen in vier Gruppen zusammen. Hierzu gehören (I) Reparaturmechanismen wie die Wirkung der O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), (II) die Deregulation von Signalwegen, (III) die Bluthirnschranke und (IV) das Vorkommen von SLCs (Ohka et al., 2012). Die für diese Arbeit wichtigen Zusammenhänge werden in den folgenden Abschnitten genauer erläutert.

## 2.4. Reparaturmechanismen

Einen Bestandteil der Standardtherapie stellt das Chemotherapeutikum TMZ dar (Abb. 1; Kapitel 2.3). TMZ gehört zur Gruppe der alkylierenden Agenzien, die DNA-Schäden durch das Anhängen von Alkylgruppen an die DNA bewirken. Die Induktion dieser Schäden führt zur Aktivierung von Reparaturvorgängen, die ihrerseits Apoptose induzieren können (Hegi et al., 2008; Trivedi et al., 2005). In 90% der Fälle erfolgt die durch TMZ induzierte Alkylierung an den Purinen und es entstehen N<sup>7</sup>-Methylguanin und N<sup>3</sup>-Methyladenin (Trivedi et al., 2005). Diese Modifizierungen sind jedoch nur wenig zytotoxisch, da sie durch die Basenexzisionsreparatur korrigiert werden (Hegi et al., 2008). Effektiver ist die in 5-10% der Fälle auftretende Methylierung an der O<sup>6</sup>-Position des Guanins, die während der Replikation zu einer Fehlpaarung mit Thymin führt. Diese Veränderungen der DNA aktivieren die Basenfehlpaarungsreparatur. In Abhängigkeit vom Expressionsmuster der jeweiligen Zellen führt die Basenfehlpaarungsreparatur zu unterschiedlichen Ergebnissen. In etwa 70% der GBMs wird die MGMT exprimiert, ein DNA-Reparaturenzym, das die Methylgruppe an der O<sup>6</sup>-Position des Guanins entfernt und somit den Effekt von TMZ neutralisiert (Hegi et al., 2008). Folglich wirkt TMZ vor allem auf Tumore, die eine Methylierung

des *mgmt*-Promotors aufweisen, da die Methylierung ein Abschalten des MGMT-Gens bewirkt (Friedman et al., 2000; Hegi et al., 2008). Ein Defekt der Basenfehlpaarungsreparatur kann verhindern, dass die Methylierung an der O<sup>6</sup>-Position des Guanins als Fehler erkannt wird und somit weder Apoptose noch Zellzyklusarrest ausgelöst werden (Friedman et al., 2000).

Bei MGMT-negativen Tumorzellen, die eine funktionierende Basenfehlpaarungsreparatur aufweisen, kommt es durch Guanin-Thymin-Fehlpaarungen zur Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Die DNA-Doppelstrangbrüche führen dann zur Induktion von Apoptose (Ochs und Kaina, 2000). Ist die Basenfehlpaarungsreparatur bei MGMT-negativen Zellen nicht aktiv, wirkt TMZ nicht toxisch. Demnach hängt die Wirksamkeit von TMZ unter anderem von einer funktionierenden Basenfehlpaarungsreparatur ab (Friedman et al., 2000; Gerson, 2002; Hirose et al., 2001b). Gliome haben sich bislang als relativ resistent gegen eine durch DNA-Schäden ausgelöste Apoptose erwiesen (Hirose et al., 2001b). Daher wurde die Wirksamkeit von TMZ in MGMT-negativen Zellen, die eine funktionierende Basenfehlpaarungsreparatur und entweder den p53-Wildtyp oder eine p53-Mutation aufwiesen, untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Basenfehlpaarungsreparatur nicht zur Apoptose, jedoch zu einem mit p53- und p21<sup>Cip1/WAF1</sup>-assoziierten Zellzyklusarrest und zur Seneszenz führt (Hirose et al., 2001b). Ferner wurde nachgewiesen, dass p53 an sich für einen G2/M-Arrest nicht notwendig ist, es jedoch für die Dauer des Arrests und das Überleben TMZ-behandelter Zellen eine Rolle spielt (Hirose et al., 2001b). Genauere Untersuchungen zeigten als Auslöser des durch TMZ-induzierten G2/M-Arrestes eine Induktion der Checkpointkinase 1 (Hirose et al., 2001a).

Das durch TMZ gebildete O<sup>6</sup>-Methylguanin kann jedoch auch bei MGMT-negativen GBMs durch eine Aktivierung der Basenfehlpaarungsreparatur mit nachfolgenden Doppelstrangbrüchen einen Auslöser für Apoptose darstellen. Es wurde gezeigt, dass Apoptose in MGMT-negativen Gliomzelllinien eine späte Antwort auf eine Behandlung mit TMZ darstellen kann (Roos et al., 2007). In weiteren Analysen wurde beobachtet, dass der p53-Status hinsichtlich der Induktion von Apoptose ebenfalls eine Rolle spielt (Roos et al., 2007). p53-Wildtyp exprimierende Gliomzellen erwiesen sich als chemosensitiver als Gliomzellen, die eine Mutation im p53-Gen aufwiesen. In beiden Fällen wurde eine Apoptose ausgelöst, jedoch führte die p53-Mutation zu einer Aktivierung des intrinsischen Signalwegs, der als weniger effizient als der extrinsische Weg gilt (Roos et al., 2007).

Verschiedene Studien versuchten durch gezieltes Modifizieren des Stupp-Schemas (Abb. 1) die mittlere Überlebenszeit zu verlängern. Dies erfolgte durch eine Intensivierung der TMZ-Therapie (sog. RTOG 0525/EORTC-Studie, RESCUE-Studie, NOA-08-Studie) oder durch die zusätzliche Gabe von Carmustin, dem MGMT-Inhibitor O<sup>6</sup>-Benzylguanin oder Cilenglitid, einem selektiven Integrin-Inhibitor (Ohka et al., 2012). Aufgrund der ausgeprägten hämatotoxischen Nebenwirkungen konn-

ten diese Ansätze jedoch nicht weiter verfolgt werden. Als erfolgsversprechend erwies sich eine Kombinationstherapie aus Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), TMZ und Bestrahlung, die von den Patienten sehr gut vertragen wurde. Es wird angenommen, dass IFN- $\beta$  die Chemosensitivität über eine p53-Induktion und einer daraus resultierenden Reduktion der MGMT-Transkription bewirkt (Ohka et al., 2012).

## 2.5. Deregulation von Signalwegen

GBMs zeichnen sich durch ein Missverhältnis zwischen Zellproliferation und Zelltod aus (Abukhdeir und Park, 2008). Ursache für das ungehinderte Zellwachstum und die Proliferation sowie die Resistenz gegen die Standardtherapie sind zum einen deregulierte Signalwege (Ohka et al., 2012), zum anderen therapieinduzierte Veränderungen im Zellzyklus (Hirose et al., 2001b; Lefranc et al., 2007). Gliome haben die Eigenschaft durch Veränderungen auf genomischer, transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene von Proteinen, darunter Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren, Überlebensstrategien zu entwickeln, die zur Apoptoseresistenz führen können (Lefranc et al., 2007). So kann z.B. der EGFR/PI3K/AKT/mTOR-Signalweg durch mehrere Mutationen gestört sein. Dazu gehört eine Überexpression von EGFR (>40% d. Fälle), die zu erhöhter Proliferation und Migration führt. Des Weiteren führt diese Überexpression aber auch über die Beeinflussung von Signalwegen und von Zelltodinduktion zu Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika (Lefranc et al., 2007; Ohka et al., 2012). Studien mit EGFR-Inhibitoren wie z.B. Gefitinib zeigten jedoch sowohl allein als auch in Kombination mit TMZ keinen Effekt auf das Patienten-Überleben (Ohka et al., 2012). Mutationen des PTEN-Gens (Phosphatase und Tensin-Homolog), die in 15-40% der Fälle in primären GBMs vorliegen, führen zu einer verstärkten Invasion und Proliferation (Bleau et al., 2009; Gregorian et al., 2009; Ohka et al., 2012). Als Folge dieser Mutationen konnte eine vermehrte Radio- und Chemoresistenz nachgewiesen werden (Bleau et al., 2009; Hu et al., 2005; Zheng et al., 2008). Weitere Signalwege, die genetisch verändert sein können, sind der Notch-, der Sonic hedgehog- und der Wnt-Signalweg (Ohka et al., 2012).

Die Resistenz gegenüber der Apoptoseinduktion durch Deregulation des EGFR/PI3K/AKT/mTOR-Signalweges wird als ein Charakteristikum vieler Tumorentitäten erachtet (Lefranc et al., 2007). Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes und durch eine Reduktion des Zellvolumens, durch Chromatinkondensation, nukleosomale Fragmentierung sowie einen Verlust der Zell-Zell-Interaktion charakterisiert (Ouyang et al., 2012). Des Weiteren zeichnet sie eine Fragmentierung des Chromatins und intrazelluläre Proteolyse aus (Nishida et al., 2008; Ouyang et al., 2012). Man unterscheidet zwischen dem intrinsischen (Mitochondrien-vermittelt) und dem extrinsischen

(Todesrezeptor-vermittelt) Signalweg, die beide Apoptose induzieren. Beide Signalwege führen zu einer Aktivierung von intrazellulären Proteasen, den Caspasen (Ricci und Zong, 2006; Sun und Peng, 2009). Die gemeinsame Endstrecke zur Apoptose wird über die Caspase-3 vermittelt, die daher als Effektorcaspase bezeichnet wird (Ouyang et al., 2012; Sun und Peng, 2009). Die Effektorcaspase-3 spielt eine zentrale Rolle, da sie in die Spaltung von kernständigen Proteinen wie z.B. PARP-1 [Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1], aber auch in die Chromatinkondensation und die DNA-Fragmentierung involviert ist (Galia et al., 2012; Porter und Janicke, 1999; Sun und Peng, 2009). DNA-Schäden führen zu einer vermehrten Expression von PARP-1, das wiederum an der Nukleotidexzisions-Reparatur beteiligt ist (Galia et al., 2012). In GBMs ist PARP-1 immunhistochemisch nachweisbar, nicht aber in normalem Hirngewebe (Galia et al., 2012). Eine Hemmung von PARP-1 bewirkt eine Erhöhung der Zytotoxizität von methylierenden Agenzien (Friedman et al., 2000; Tentori et al., 2002). Die zusätzliche Gabe von PARP-Inhibitoren zur TMZ-Behandlung führte zu einem reduzierten G2/M-Zellzyklusarrest und zu einer Induktion der G2-Checkpointkinase Chk1 (Tentori et al., 2002).

Als Schlüsselproteine des Zellzyklus regulieren Zykline, zyklin-abhängige Kinasen (CDKs) und CDK-Inhibitoren (p21<sup>Cip1/WAF1</sup> und p27<sup>Kip1</sup>) das Verhältnis zwischen Zellwachstum und Zelltod (Abukhdeir und Park, 2008). Zellen durchlaufen die verschiedenen Phasen des Zellzyklus, der durch Interaktionen verschiedener Zykline mit den zugehörigen CDK-Untereinheiten reguliert wird (Abukhdeir und Park, 2008). Die wichtigsten CDKs, die den Zellzyklus regulieren, sind CDK2, CDK4 und CDK6. CDK4 und CDK6 bilden einen Komplex, der mit Zyklin D assoziiert ist, wohingegen CDK2 mit Zyklin E assoziiert ist (Abukhdeir und Park, 2008). Modulationen des Zellzyklus erfolgen u.a. durch den CDK-Inhibitor p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, der den Zyklin-E-CDK2-Komplex und den Zyklin-D-CDK4/CDK6-Komplex hemmt. Der CDK-Inhibitor p27<sup>Kip1</sup> hemmt dagegen ausschließlich den Zyklin-E-CDK2-Komplex (Abukhdeir und Park, 2008). Die Zyklin-CDK-Komplexe fungieren als Checkpoints des Zellzyklus und beugen der Replikation geschädigter DNA vor, indem ein Zellzyklusarrest induziert wird. Somit ermöglichen sie eine DNA-Reparatur oder induzieren Zelltod, falls eine Reparatur nicht möglich ist (Abukhdeir und Park, 2008).

Ionisierende Strahlung induziert ein breites Spektrum an DNA-Schäden, wie Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche sowie Basenmodifikationen (Hirota et al., 2014; Pajonk et al., 2010). Den schädlichsten Einfluss haben die Doppelstrangbrüche, da sie zu einem Verlust von DNA-Fragmenten führen können (Hirota et al., 2014). Doppelstrangbrüche aktivieren die Serin/Threonin-Kinase ATM (engl.: *ataxia teleangiectasia mutated*), die ihrerseits die Aktivierung der Checkpointkinasen Chk1 und Chk2, sowie die der Zyklin-abhängigen Kinase Cdc25c und p53 mittels Phosphorylierung bewirkt (Bao et al., 2006a; Choudhury et al., 2006). Die Aktivierung von

Chk1 und Chk2 führt zu einem Zellzyklus-Arrest in der S-Phase, die von Cdc25c resultiert in einem G2-Arrest (Hoffmann et al., 1993). Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors und Tumorsuppressors p53 führt zu einer Induktion von p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, wodurch ein G1-Arrest induziert wird (Abbas und Dutta, 2009). p21<sup>Cip1/WAF1</sup> wird direkt durch den Tumorsuppressor p53 reguliert und gilt damit als eines der wichtigsten Effektormoleküle von p53. Folglich ist in Tumoren mit einer p53-Mutation das p21<sup>Cip1/WAF1</sup>-Level reduziert.

Die Radiosensitivität der Zellen ist grundsätzlich jedoch abhängig von der Zellzyklusphase. Zellen, die sich in der späten S-Phase befinden, sind besonders strahlenresistent, wohingegen Zellen in der G2/M-Phase am sensitivsten auf ionisierende Strahlen reagieren (Pajonk et al., 2010). Das Prinzip der fraktionierten Bestrahlung (Abb. 1) dient auf der einen Seite einer auf die einzelnen Bestrahlungsvorgänge bezogenen Dosisreduktion. Auf der anderen Seite ermöglicht dieses Prinzip eine Schädigung von Zellen, die den Zellzyklus langsam durchlaufen, und erlaubt somit ein Übertreten radioresistenter, sich in der S-Phase befindender Tumorzellen in die bestrahlungsensitivere G2-Phase (Pajonk et al., 2010).

## 2.6. Bedeutung der Bluthirnschranke

Die Bluthirnschranke trägt zur Therapieresistenz bei, da sie den Durchtritt von Molekülen verhindert, die größer als 500 Dalton (Da) sind. Somit können viele Medikamente nicht zu ihrem Wirkungsort durchdringen oder sie erreichen diesen in einer wesentlich geringeren Konzentration als beabsichtigt (Beier et al., 2011). Durch seine Fähigkeit die Bluthirnschranke zu passieren, kann TMZ in den Hirnzellen durch die Alkylierung eine Schädigung der DNA bewirken, die zu einer Aktivierung von Reparaturmechanismen führt. Etwa 20% der systemisch gemessenen TMZ-Konzentration sind im Liquor nachweisbar (Ostermann et al., 2004). Es wird jedoch angenommen, dass Tumorzellen, die sich im Kontrastmittel-anreichernden Bereich befinden, einer wesentlich höheren TMZ-Konzentration ausgesetzt sind. Die Kontrastmittelanreicherung spricht für eine beeinträchtigte Bluthirnschranke, die ihrerseits wiederum dazu führt, dass die TMZ-Konzentration im Tumorbett nahezu der systemischen entspricht (Ostermann et al., 2004; Portnow et al., 2009). Um den Resistenz-Mechanismus einer intakten Bluthirnschranke umgehen zu können, erfolgten Studien mit der Implantation von Carmustin-Mikroplättchen (sogenannte *Wafer*) zusätzlich zur Standardradiochemotherapie (Bock et al., 2010; Valtonen et al., 1997; Westphal et al., 2006). Diese Therapieform bleibt aufgrund von aus dem operativen Eingriff resultierenden Komplikationen umstritten (Bock et al., 2010). Ein weiterhin untersuchtes Prinzip zur Umgehung der Bluthirnschranke stellte in einigen Studien der Aufbau eines Druckgradienten dar. Die Anwendung eines

positiven Druckes bewirkte einen lokalen Druckgradienten, der es ermöglichte, Substanzen im Extrazellularraum zu verteilen (Bankiewicz et al., 2000; Hadaczek et al., 2006; Krauze et al., 2008). Durch eine gezielte Verteilung von Interleukin 13 oder TGF- $\beta$ -Inhibitoren wurde im Vergleich zur Standardtherapie eine Steigerung der Überlebenszeit erreicht (Mut et al., 2008; Vallieres, 2009).

Trotz verschiedenster Ansätze zur Optimierung der GBM-Therapie konnte die mittlere Überlebenszeit von 14,6 Monaten bislang nicht erhöht werden. Eine Vielzahl an Studien postuliert, dass GBMs eine kleine Gruppe an Zellen, die sogenannten Stammzell-ähnlichen Gliomzellen [engl.: *stem-like glioma-cells* (SLGCs)] aufweisen, die für die Resistenz gegen einen Großteil der Therapien und das Auftreten von Rezidiven verantwortlich sind (Huse und Holland, 2010; Ohka et al., 2012; Schonberg et al., 2013; Van Meir et al., 2010).

Der nachfolgende Abschnitt gibt daher einen Überblick über die SLGCs und deren Bedeutung für die Therapie.

## 2.7. Tumorstammzellen und Stammzelltheorie

SLGCs sind Tumorzellen mit Ähnlichkeiten zu Stammzellen, die mittlerweile in allen soliden Tumoren und in hämatopoietischen Tumoren nachgewiesen wurden (Reya et al., 2001; Schonberg et al., 2013). Im Kontext des Glioms werden diese Zellen als SLGCs (Choschzick et al., 2014), GSCs (engl.: *glioma stem-like cells*) (Ohka et al., 2012) oder BTSCs (engl.: *brain tumor stem cells*) (Dirks, 2010) bezeichnet.

Mittlerweile existieren zahlreiche experimentelle Befunde, die die Bedeutung von SLGCs für die Entwicklung der ausgeprägten Radio- und Chemoresistenz des GBMs belegen (Bao et al., 2006a; Liu et al., 2006; Reya et al., 2001).

Für den Ursprung von SLGCs gibt mehrere Theorien. Die erste Theorie geht davon aus, dass sich die SLGCs durch neoplastische Transformationen aus adulten neuronalen Stammzellen (NSCs) oder neuronalen Progenitoren (NPCs) entwickeln (Ignatova et al., 2002; Jiang und Uhrbom, 2012). Dabei verleihen Mutationen den NSCs und NPCs, die bereits oder noch Stammzeleigenschaften besitzen, tumorigene Eigenschaften (Jiang und Uhrbom, 2012; Sutter et al., 2007). Eine weitere Theorie geht davon aus, dass neurale Vorläuferzellen mit einem eingeschränkten Stammzellpotential Mutationen anhäufen. Dabei kommt es zum Erwerb tumorigener Eigenschaften und zur Manifestation von Stammzeleigenschaften (Sutter et al., 2007). Die dritte Theorie beruht darauf, dass reife gliale Zelltypen wie Astrozyten und Oligodendrozyten dedifferenzieren und zusätzlich Mutationen anhäufen. Da die differenzierten glialen Zellerivate keine Stammzeleigenschaften besit-

zen, muss die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, zur unbegrenzten Teilung und zur Differenzierung in den Zellen des Tumors jeweils erworben werden. Genetische aber insbesondere epigenetische Veränderungen führen zur Aktivierung Stammzell-assoziiierter Transkriptionsfaktoren und zum Erwerb von Stammzeleigenschaften (Huse und Holland, 2010; Jiang und Uhrbom, 2012; Singh et al., 2003; Sutter et al., 2007; Zaidi et al., 2009).

Würde die Vermutung zutreffen, dass Stammzell-ähnliche Gliomzellen aus adulten NSCs oder davon abgeleiteten Progenitoren hervorgehen, sollten sich SLGCs nur in den Bereichen des Gehirns befinden, in denen NSCs (und NPCs) vorkommen (neurogene Regionen). Hierzu gehören die Areale um das Ventrikelsystem (die subventrikuläre und die subependymale Zone, die Auskleidung der lateralen Ventrikel und der Bereich um den 4. Ventrikel), der Gyrus dentatus, der Hippocampus und die subkortikale weiße Substanz (Hadjipanayis und Van Meir, 2009; Persano et al., 2011; Van Meir et al., 2010). Würden sich SLGCs jedoch von reifen glialen Zellerivaten ableiten, sollten sie in nahezu allen Gehirnbereichen vorkommen. Eine präferentielle Entstehung von Gliomen in den bekannten neurogenen Regionen wurde bisher nicht beschrieben.

Im Laufe der letzten Jahre wurden SLGCs *in vitro* in verschiedensten Analysen sehr gut charakterisiert (zum Überblick siehe Schonberg et al., 2013). SLGCs wurden entweder über eine Selektion in Serum-freiem Medium, das EGF (engl.: *epidermal growth factor*) und bFGF (engl.: *basic fibroblastic growth factor*) enthielt, gewonnen oder mittels FACS-Analysen (engl.: *fluorescence-activated cell sorting*) aus Gliombiopsien selektiert, wobei der Fokus der Zellselektion auf dem Oberflächen-Glykoprotein CD133/Prominin-1 lag (Dirks, 2010). Im Jahr 2002 konnten erstmalig in Serum-freiem Medium Neurosphären-bildende, bipotente Vorläuferzellen aus GBMs expandiert werden (Ignatova et al., 2002). Wenig später wurde gezeigt, dass diese Vorläuferzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung haben (Singh et al., 2003). 2004 gelang es aus humanen GBMs Neurosphären-bildende Zellen zu isolieren, die nicht nur die Fähigkeit zur Differenzierung in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten hatten, sondern nach Inokulation in immunsupprimierte Mäuse Hirntumore mit den typischen histologischen und zytologischen Eigenschaften des Ursprungs-GBMs bilden konnten (Galli et al., 2004; Zaidi et al., 2009). Die meisten frühen Arbeiten mit SLGCs nutzten die Anreicherung von Tumorzellen mittels FACS, wobei CD133/Prominin-1 in der Regel als Marker für die Selektion diente (Beier et al., 2007; Singh et al., 2004). Die Bedeutung von CD133/Prominin-1 als universeller SLGC-Marker ist jedoch mittlerweile umstritten (siehe unten).

SLGCs weisen eine Vielzahl an Ähnlichkeiten zu NSCs auf (Lee et al., 2006). Die gemeinsamen Eigenschaften beider Zellgruppen umfassen zum einen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, zum anderen das Differenzierungspotential, das jedoch bei SLGCs im Vergleich zu NSCs deutlich eingeschränkt ist (Lathia et al., 2011; Reya et al., 2001).

Wie die NSCs exprimieren SLGCs das Zelloberflächenprotein CD133/Prominin-1 (nachfolgend CD133 genannt), dessen Expressionsstärke mit dem Grad der Malignität des Tumors sowie der Prognose des Patienten assoziiert zu sein scheint (Zaidi et al., 2009). Eine starke Expression von CD133 scheint klinisch mit einer schlechteren Prognose für die Patienten zu korrelieren (Zeppernick et al., 2008). CD133 galt lange Zeit als *bona-fide* Marker für SLGCs (Singh et al., 2004; Singh et al., 2003). Spätere Studien wiesen jedoch daraufhin, dass auch CD133-negative SLGCs tumorigen sind und die Fähigkeit haben, in orthotopen Tumoren CD133-positive und CD133-negative Zellen zu generieren (Beier et al., 2007; Chen et al., 2010; Wang et al., 2008). CD133-negative SLGCs weisen einen niedrigeren Proliferationsindex als CD133-positive Zellen auf (Beier et al., 2007). Weiterhin waren schon weniger als 1000 CD133-positive Zellen ausreichend, um in immunsupprimierten Mäusen orthotop Tumore zu induzieren, während ein Vielfaches an CD133-negativen Zellen dazu erforderlich war (Beier et al., 2007). Eine neuere Arbeit weist darauf hin, dass die CD133-Expression mit einem bestimmten Differenzierungsstadium von SLGCs assoziiert ist (Chen et al., 2010). So scheint die SLGC mit dem höchsten Stammzellcharakter, die sogenannte Typ I-Zelle CD133-/Sox2+/Nestin+ zu sein. Die Typ I-Zelle kann sich selbst erneuern oder aber in eine CD133-positive Typ II-Zelle differenzieren, die sich wiederum selbst erneuern kann oder in eine CD133-negative Typ III-Zelle differenziert. Während der Differenzierung von Typ I- in Typ II- und Typ III-Zellen werden Sox2 und Nestin sukzessive herunter reguliert (Chen et al., 2010). Sowohl Typ I-, als auch Typ II- und Typ III-Zellen können orthotope Tumore in SCID (engl.: *severe combined immunodeficiency*)-Mäusen generieren, jedoch mit verschiedenen Ergebnissen hinsichtlich der Zellzusammensetzung und Invasivität (Chen et al., 2010). Während Tumore mit Typ I-Zellen ein aggressives und invasives rasches Wachstum aufweisen, sind Tumore mit Typ III-Zellen durch ein langsames Wachstum sowie eine klare Abgrenzung vom umliegenden Gewebe gekennzeichnet. Tumore mit Typ II-Zellen ähneln in ihrem Wachstumsverhalten eher denen, die Typ I-Zellen enthalten (Chen et al., 2010).

Die Expression von Nestin ist eine Eigenschaft von NSCs und SLGCs (Bexell et al., 2009; Wiese et al., 2004; Zhang et al., 2008). Nestin ist ein Intermediärfilament, das vor allem in adulten neuronalen Stamm- (adNSCs) und Progenitorzellen (adNPCs) exprimiert wird (Dahlstrand et al., 1992; Veselska et al., 2006; Wiese et al., 2004) und bei der Organisation des Zytoskeletts, der Signalübertragung sowie für den Zellmetabolismus von Bedeutung ist (Ehrmann et al., 2005). Die Nestin-Expression nimmt mit fortschreitender Differenzierung der adNSCs ab und wird durch andere Intermediärfilamente wie das saure Gliafaserprotein (GFAP) oder Neurofilamente ersetzt (Dahlstrand et al., 1992; Wiese et al., 2004).

Das Intermediärfilament GFAP wird in einigen Fällen zur Charakterisierung von Gliomstammzellen herangezogen. GFAP wird sowohl von reifen Astrozyten (Eng et al., 1971) als auch von neuronalen Stammzellen (Morshead und van der Kooy, 2004) exprimiert. Obwohl maligne Gliome astrozytären Ursprungs typischerweise GFAP positiv sind, besteht über die Bedeutung der Expression von GFAP in SLGCs Unklarheit. Meist wird GFAP als glialer Marker betrachtet, der die Differenzierung von SLGCs im *in vitro*-Assay anzeigt (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004; Yuan et al., 2004).

Wie oben beschrieben spielt der Transkriptionsfaktor Sox2 [engl.: *sex determining region Y (SRY)-box 2*] eine wichtige Rolle für den Stammzellstatus der SLGCs, während die Bedeutung von Oct3/4 und Nanog in der Regulation nicht abschließend geklärt ist. Sox2 ist für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters und für das Überleben der SLGCs sowie deren Selbsterneuerung und Proliferation notwendig (Alonso et al., 2011; Guo et al., 2011; Matsuoka et al., 2012). Es scheint zudem eine Korrelation zwischen der Expressionsstärke von Sox2 und dem Grad der Malignität der Gliome zu bestehen (Guo et al., 2011). In weiteren Arbeiten wurde eine Co-Expression der drei Transkriptionsfaktoren Sox2, Oct3/4 und Nanog in Gliomzellen beschrieben (Guo et al., 2011; Hagerstrand et al., 2011). Die Arbeiten unseres Labors weisen auf eine Hypermethylierung des Oct3/4-Promotors in SLGCs hin, wobei geringe Level an mRNA nachweisbar sind (Choschzick et al., 2014). Die Expression von Sox2 ist ebenfalls in NSCs nachweisbar und wird im Verlauf der neuronalen Differenzierung herunter reguliert (Episkopou, 2005; Guo et al., 2011; Hagerstrand et al., 2011). Als Marker für den differenzierten Zustand gelten die Expression von GFAP, Oligodendrozytenmarker (glial) sowie Tau, MAP2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2) oder Neurofilament (neuronal) (Dahlstrand et al., 1992; Gunther et al., 2008; Yuan et al., 2004). Auch eine Transdifferenzierung in endotheliale Derivate wurde für SLGCs, nicht aber für NSCs beschrieben (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010).

SLGCs haben ähnlich wie auch NSCs die Fähigkeit zur Migration im Hirnparenchym durch perivaskuläre Räume und entlang von myelinisierten Faserzügen, so dass sich die SLGCs über die Grenzen des Tumorbettes hinaus und Hemisphären-übergreifend ausbreiten können (Salazar und Rubin, 1976). Da SLGCs als tumorinduzierende Zellen wirken können und die Fähigkeit zu klonalem Wachstum haben, können sie nach Migration an einer anderen Stelle des Gehirns einen neuen Tumor generieren (Zaidi et al., 2009). Der chirurgische Eingriff kann den Tumor aus verschiedenen Gründen nur unvollständig eliminieren. Zum einen kann aus anatomischen Gründen oftmals keine vollständige Resektion erfolgen, da die Gefahr besteht, gesundes Gehirngewebe zu schädigen. Zum anderen können einzelne verbleibende Zellen sowohl an der Stelle des Ursprungstumors als auch nach Migration an anderen Stellen des Gehirns Rezidive hervorrufen (Salazar und Rubin, 1976; Xie und Chin, 2008). Zusätzlich ist die Eliminierung der verbleibenden Tumorzellen nicht

möglich, da die SLGCs, denen hierbei häufig die Schlüsselrolle zugeschrieben wird, Resistenzmechanismen entwickeln. Nach einer Bestrahlung mit 5 Gy hatten Bao et al. (2006) Hinweise darauf, dass in SLGCs über die Phosphorylierung der Serin-Proteinkinase ATM (engl.: *ataxia-teleangiectasia-mutated*) und der Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 DNA-Reparaturmechanismen aktiviert werden, die eine Ursache für die Radioresistenz darstellen könnten. Zudem wurde beobachtet, dass CD133-positive SLGCs effektiver DNA-Reparaturmechanismen aktivierten, als CD133-negative SLGCs (Bao et al., 2006a).

Mehrere rezente Studien haben ergeben, dass die Tumor-Mikroumgebung eine Bedeutung für die Erhaltung der SLGCs spielt. Es wird angenommen, dass sich die SLGCs in Tumorzellnischen befinden, die für deren Überleben und die Entwicklung von Therapieresistenzen von Bedeutung sind (Lathia et al., 2011; Rosen und Jordan, 2009). Derzeit wird davon ausgegangen, dass sich die SLGCs in einer hypoxischen, perivaskulären Nische befinden (Lathia et al., 2011). Solche SLGCs besitzen die Fähigkeit zur Sezernierung von VEGF (engl.: *vascular endothelial growth factor*) und im geringen Maße auch von anderen angiogenetischen Faktoren wie z.B. Angiogenin, bFGF (engl.: *basic fibroblast growth factor*), Interleukin 8, Interleukin 6 (Bao et al., 2006b). SLGCs fördern somit die Angiogenese im Tumorbett. Darüber hinaus können SLGCs die Fähigkeit zur Differenzierung in Endothelzellen besitzen, wodurch ebenfalls die Angiogenese gefördert wird (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010).

Vor dem Hintergrund der Nischenhypothese wurde 2011 ein konzentrisches Drei-Schichten-Modell für das GBM entwickelt (Persano et al., 2011). Der Kern ist dabei ein nekrotisches, hypoxisches Areal. Es wird davon ausgegangen, dass sich in diesem Bereich die SLGCs mit dem höchsten Stammzellcharakter befinden. Um den Kern wurden zwei weitere Schichten definiert. Es wird angenommen, dass der Differenzierungsgrad der Zellen mit der Entfernung vom Kern von Schicht zu Schicht zunimmt. Während die kernständigen Zellen stark CD133 und Nestin exprimierten, wurde bei den in der äußeren Schicht liegenden Zellen eine vermehrte GFAP- und  $\beta$ -III-Tubulin-Expression nachgewiesen. Die in der mittleren Schicht vorherrschenden Zellen wiederum waren von einem gemischten Phänotyp. In dieser Schicht wurde noch eine leichte Hypoxie nachgewiesen (Persano et al., 2011).

Intratumorale Hypoxie führt zu einer erhöhten Expression des Hypoxie-induzierenden Faktors HIF1 $\alpha$ , dessen Expressionsstärke mit der Aggressivität und dem Progress des Tumors korreliert (Lathia et al., 2011; Persano et al., 2011). Hinsichtlich der Radioresistenz der GBMs spielen die hypoxischen Areale ebenfalls eine Rolle, da in Abwesenheit von Sauerstoff die für den gleichen biologischen Effekt benötigte Strahlendosis dreimal so hoch ist, wie unter normalen Sauerstoff-

bedingungen (Rich, 2007). Des Weiteren wird vermutet, dass Hypoxie die Gliomzellmigration und somit eine Infiltration in normales Hirngewebe fördert (Persano et al., 2011).

## 2.8. Fragestellung

GBMs weisen eine ausgeprägte Radio- und Chemoresistenz auf, so dass die derzeitige Therapie rein palliativ ist (Stupp et al., 2007; Stupp et al., 2005). In zahlreichen Studien wurde in den letzten Jahren versucht, die Resistenzbildung durch Modifizierungen der Standardtherapie zu umgehen. Erhöhungen der Strahlendosis und eine intensiviertere TMZ-Therapie innerhalb eines Therapiezyklus erbrachten keinen Vorteil. Kombinationen der Standardtherapie mit MGMT-, PARP-1- oder Tyrosinkinaseinhibitoren sowie Interferon- $\beta$  konnten die mittlere Überlebenszeit ebenfalls nicht signifikant verlängern (Ohka et al., 2012). Von den verschiedenen potentiellen Ursachen für die Entstehung von Therapieresistenzen erscheinen insbesondere die SLGCs ausschlaggebend (Huse und Holland, 2010). So ist bekannt, dass in SLGCs unter einer Bestrahlung mit 5 Gy effizient Reparatursysteme aktiviert werden (Bao et al., 2006a). Unklar ist jedoch, inwieweit die SLGCs aus verschiedenen Patienten unterschiedlich reagieren und wie sich eine Kombinationstherapie mit TMZ auswirkt. Weiterhin gibt es bislang keine eindeutigen Erkenntnisse, ob die zeitliche Abfolge der Radio- und Chemotherapie einen Einfluss auf das Überleben von SLGCs hat.

In dieser Arbeit wurden außer SLGC-Linien aus GBMs auch solche untersucht, die sich von einem GSarc- und einem GSarc-Rezidiv ableiten. Die Motivation hierfür lag darin begründet, dass GSarc-Patienten aufgrund der limitierten Studienlage wie GBM-Patienten behandelt werden, obwohl einige Autoren (Han et al., 2010) vermuten, dass GSarcs möglicherweise eine eigene Tumorentität darstellen könnten.

Zunächst wurde untersucht, welche Strahlendosis benötigt wird, um die Proliferation von SLGCs um die Hälfte zu reduzieren ( $ED_{50}$ ). Danach wurde analysiert, ob Bestrahlung und TMZ in der Kombinationstherapie synergistische Effekte zeigen. Dabei wurde ermittelt, ob TMZ die Wirkung der Bestrahlung steigert und ob bzw. ab welchen Strahlendosen eine Synergie auftritt. Weiterhin wurde untersucht, ob eine unterschiedliche zeitliche Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Zugabe unterschiedliche Auswirkungen auf die Proliferation und Vitalität von SLGCs hat. Für diese Analysen wurden BrdU-ELISAs (Proliferation) und MTT-Assays (Vitalität) durchgeführt. Zusätzlich wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen die Interkalierung von Propidiumiodid untersucht, um Aufschluss über einen Einfluss auf die Zellzyklusprogression bzw. einen möglichen Zellzyklusarrest zu bekommen. Unterstützend dazu wurde die Expression der Zellzyklusinhibitoren p21<sup>Cip1/WAF1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> mittels Western Blot-Analyse ermittelt. Die potentiellen Auswirkungen der verschiedenen

Behandlungsstrategien auf den Zelltod wurden mit Hilfe eines Zytotoxizitätsassays über die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) untersucht. Zusätzlich wurde mit der Western Blot-Methode die Expression des DNA-Reparaturenzyms PARP-1 ermittelt, das ein Zielprotein der Effektorcaspase-3 ist und dessen Spaltung Hinweise auf die Induktion von Apoptose geben kann.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Zellkultur

Die nachfolgend beschriebenen Experimente mit Tumormaterial wurden gemäß der Helsinki-Leitlinie mit Zustimmung der nationalen Regelung für die experimentelle Verwendung menschlichen Materials (Votum 08-070 der Ethikkommission der Universität zu Lübeck) durchgeführt. Die Glioblastom- und Gliosarkomproben stammten von Patienten, die im Rahmen der Tumorthherapie operiert wurden und zuvor ihr Einverständnis zur Verwendung des Gewebes zu Forschungszwecken gaben. Die Klassifizierung der Tumorart und des Grades erfolgte gemäß den WHO-Richtlinien durch einen Neuropathologen. Die Proben wurden anonymisiert und die daraus kultivierten Zelllinien mit einem T und mit einer nachfolgenden Nummer kodiert.

**Tab. 1: Patienteninformationen, Wachstumsverhalten, Morphologie und Stammzellcharakter der verwendeten SLGC-Linien**

<b>SCLG-Linie</b>	<b>Tumor-entität</b>	<b>Geschlecht/Alter des Patienten</b>	<b>Wachstumsverhalten</b>	<b>Nestin/GFAP</b>	<b>CD133</b>
<b>T1338</b>	GBM	M/65	Semi-adhärent	Ne++/G++	< 5%
<b>T1371</b>	Gsarc	W/83	Adhärent	Ne++/G(+)	21%
<b>T1389</b>	GBM	M/67	Semi-adhärent	Ne+/G-, 10-15% Ne+/G+	11%
<b>T1440</b>	GBM	M/64	Adhärent	Ne++/G+++	11%
<b>T1442</b>	GBM	M/71	Semi-adhärent	Ne+++/G+	37%
<b>T1447</b>	Gsarc	W/74	Semi-adhärent	Ne++/G+	13%
<b>T1452</b>	GBM	M/63	Sphären	Ne+/G+	45%
<b>T1454</b>	GBM	M/56	Semi-adhärent	Ne+++/G+	< 5%
<b>T1495</b>	GBM	W/74	Adhärent	Ne+/G-, 10% Ne+/G+	15%
<b>T1522</b>	GBM	M/67	Adhärent	Ne+/G(+)	35%

CD133 (engl.): cluster of differentiation 133; G: GFAP (saures Gliafaserprotein); GBM: Glioblastom multiforme; Gsarc: Gliosarkom; Ne: Nestin; T: Tumor; M: männlich; W: weiblich, (+), +, ++, +++: Stärke der Expression.

In dieser Arbeit wurden Gliomzelllinien verwendet, die mindestens 4 von 5 der für SLGCs typischen Kriterien erfüllen. Zu diesen Kriterien gehören die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, die Fähigkeit zur klonalen Expansion, die Expression von SLGC-Markern, die Expression von Sox2 sowie die Tumorigenität in SCID-Mäusen. Die in der Arbeit analysierten SLGC-Linien (Tab. 1) wurden von den Mitarbeitern des Labors angelegt und in Serum-freiem Kulturmedium (siehe unten) expandiert.

### 3.1.1. Kulturbedingungen

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre im Brutschrank (Heraeus Hera Cell Inkubat 80; Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt. Die SLGCs wurden in Serum-freiem Medium [N-Medium: 80% DMEM/Ham's F12 (Biochrom, Berlin) mit 2% L-Glutamin (200mM) (PromoCell, Heidelberg), 1% Pencillin/Streptomycin (PromoCell) und 1% Amphotericin B (PromoCell) sowie 20% BIT-9500 (PELOBiotech GmbH, Planegg/Martinsried), hu r-EGF (20 ng/ml) (PromoCell) und hu r-bFGF (20 ng/ml) (PromoCell)] kultiviert.

### 3.1.2. Beschichtung von Kulturgefäßen mit Fibronectin

Die SLGCs wurden für die nachfolgend beschriebenen Experimente in Fibronectin beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatten bzw. 25cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (T25; Greiner bio-one, Frickenhofen) ausplattiert, da das Fibronectin die Adhärenz von SLGC-Kulturen fördert. Hierzu wurde die Fibronectin-Stammlösung (4 µg/ml, PromoCell, Heidelberg) 1:1000 in 1xPBS (8g NaCl; 0,2g KCl; 0,92g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 l dest. H<sub>2</sub>O; pH 7,4) verdünnt. Für die Beschichtung einer 96-Loch-Platte wurden in jede Vertiefung 60 µl der Fibronectin-Verdünnung pipettiert. Für eine T25-Kulturflasche wurden 2 ml benötigt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 4 h im Brutschrank bei 37°C wurde die Lösung abgesaugt und die Platten bzw. T25-Kulturflaschen drei Mal mit 1xPBS gewaschen. Optional verblieb das PBS des letzten Waschschruttes auf den Platten bzw. in den T25-Kulturflaschen, so dass diese bis zur Verwendung im Brutschrank gelagert werden konnten.

### 3.1.3. Plattieren von Zellen

Um die Auswirkung von Bestrahlung und/oder Temozolomid (TMZ)-Behandlung auf die Proliferation, die Vitalität und den Zelltod der SLGC-Linien zu untersuchen, wurden die Zellen in Fibronectin-beschichtete 96-Loch-Platten abhängig von der Proliferationsrate in einer Zelldichte von 5x10<sup>3</sup> bzw. 1x10<sup>4</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> plattiert. Dabei wurde die Proliferation mit Hilfe des BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin)-ELISAs ermittelt. Aussagen zur Vitalität und zum Zelltod wurden mittels MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)- und Lactatdehydrogenase-Assay gewonnen. Zusätzlich wurden in der identischen Zelldichte Zellen in Fibronectin-beschichtete T25-Kulturflaschen ausgesät, um die Auswirkungen der Behandlung auf den Zellzyklus der SLGC-Linien (Durchflusszytometrie) sowie der p21<sup>Cip1/WAF1</sup>-, p27<sup>Kip1</sup>- bzw. PARP-1-Proteinexpression (Western Blot) zu bestimmen.

Zunächst wurden alle Zellkulturen im Mikroskop (Labovert FS; Leitz) auf den Phänotyp und das Wachstumsverhalten untersucht. Dann wurde bei adhärenent wachsenden Linien das Medium ab-

gesaugt und die anhaftenden Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen. Danach wurde pro T25-Kulturflasche 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin/1xEDTA; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) zugegeben und so lange bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich die Zellen vom Zellkulturgefäß zu lösen begannen. Dies wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Aktivität des Trypsins wurde mithilfe eines Stopp-Mediums [90% DMEM/Ham's F12 mit 2% L-Glutamin (200mM), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Amphotericin B und 10% stammzellgetestetem FCS] inaktiviert. Mithilfe einer Pasteurpipette wurden die Zellen vollständig vom Flaschenboden gelöst und Aggregate mechanisch dissoziiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 250xg und Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge: Rotina 380R; Hettich AG, Bäch, Schweiz), der Überstand verworfen und das Pellet nachfolgend in 1 ml 1xPBS suspendiert.

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde ein Aliquot (10 µl) der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblaulösung (Roth, Karlsruhe) gemischt und anschließend die Anzahl der vitalen (=farblosen) Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim vor der Rhön) ermittelt.

Die für die Experimente benötigte Menge an Zellsuspension wurde mit Medium gemischt, so dass jeweils 100 µl verdünnte Zellsuspension die Zellzahl von  $1 \times 10^4$  bzw.  $5 \times 10^3$  pro  $\text{cm}^2$  enthielten. 100 µl Zellsuspension wurden mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette in die Vertiefungen der 96-Loch-Platten pipettiert. Analog wurde mit den T25-Kulturflaschen verfahren, wobei hier die benötigte Zellzahl in 4 ml Medium suspendiert wurde.

Sphärisch wachsende Zellen wurden zunächst für 5 min bei 250xg und Raumtemperatur pelletiert und anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Die Dissoziation der Zellaggregate (Sphären) erfolgte zunächst enzymatisch mit 1 ml Trypsin/1xEDTA für 5 min bei Raumtemperatur, der eine mechanische Dissoziation mittels Pasteurpipette folgte. Das Auszählen und Plattieren entsprach dem der adhärent wachsenden Zellen.

### **3.2. Untersuchungen zur Auswirkung von Bestrahlung und Temozolomid-Behandlung**

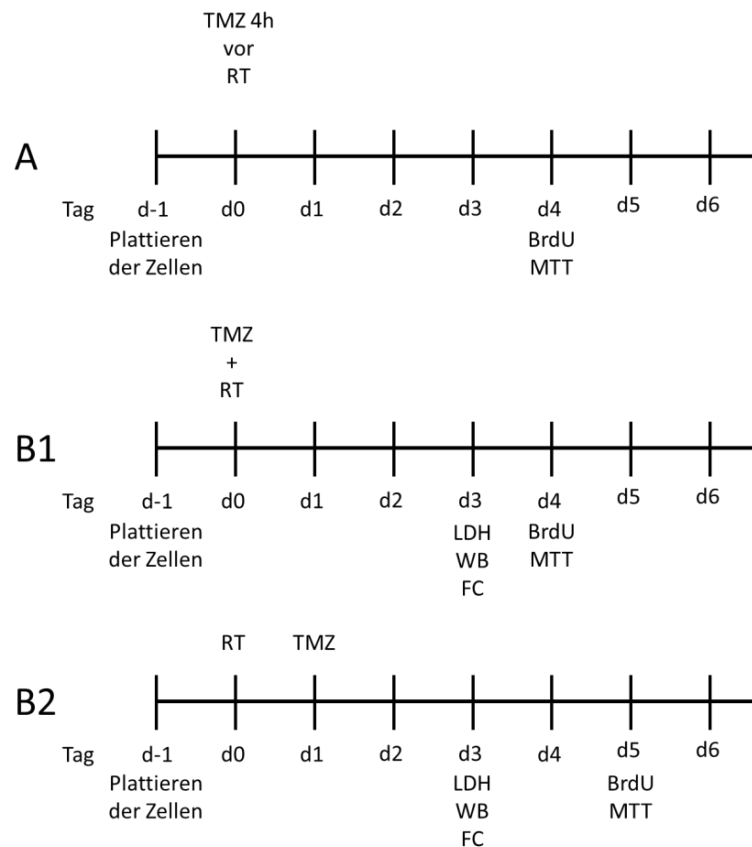
Die Behandlung der SLGC-Linien erfolgte in Anlehnung an das klinische Vorgehen [fraktionierte Radiotherapie mit adjuvanter Chemotherapie (Stupp et al., 2007; Stupp et al., 2005)]. Dabei wurde die Dosis der Bestrahlung so gewählt, dass die experimentelle Dosis der Einzeit-Bestrahlung der in der Klinik verwendeten fraktionierten Dosis mit einer Einzeldosis von 2 Gray (Gy) in 30 Fraktionen entspricht. Die Chemotherapie erfolgte in Abhängigkeit vom MGMT-Status mit niedrigen

(50µM) oder höheren (100µM, 200µM) TMZ-Konzentrationen (Tab. 2). Hierbei wurden die im Labor vorhandenen TMZ-Dosiswirkungskurven zu Grunde gelegt (C. Zechel, persönliche Mitteilung). In einem weiterführenden Experiment wurde der Zeitpunkt der TMZ-Zugabe relativ zur Bestrahlung variiert (Abb. 2). Der Tag des Plattierens der Zellen wurde als Tag d-1, der Tag der Behandlung als Tag d0 definiert. Für die Dosiswirkungskurven mit Bestrahlung [Schema A, (Abb. 2)] erfolgte die Zugabe des TMZ 4h vor der Bestrahlung an Tag d0. Die Messungen mittels BrdU-ELISA und MTT-Assay wurden an Tag d4 durchgeführt. Um den Zeitfaktor der TMZ-Zugabe zu untersuchen, wurden zwei weitere Schemata entwickelt (Abb. 2). Bei Schema B1 erfolgte die TMZ-Zugabe zeitgleich zur Bestrahlung an Tag d0. Die Messungen mittels LDH-Assay, Western Blot und Durchflusszytometrie wurden an Tag d3 durchgeführt, der BrdU-ELISA sowie der MTT-Assay an Tag d4. Bei Schema B2 wurde das TMZ 24h nach der Bestrahlung an Tag d1 zugegeben. LDH-Assay, Western Blot und Durchflusszytometrie erfolgten an Tag d3, der BrdU-ELISA und der MTT-Assay wurden an Tag d5 durchgeführt. Damit erfolgten LDH-Assay, Western Blot und Durchflusszytometrie stets im identischen zeitlichen Abstand nach der Bestrahlung. BrdU-ELISA und MTT-Assay erfolgten stets im identischen zeitlichen Abstand nach der TMZ-Zugabe.

**Tab. 2: Temozolomid-Konzentrationen, MGMT- und p53- Status der untersuchten SLGC-Linien**

SLGC-Linie	Verwendete TMZ-Konzentration (in µM)	MGMT-Status	p53-Status
T1338	50	m	mut.
T1371	200	u	mut.
T1389	200	u	mut.
T1440	50	m	wt
T1442	100	m/u	wt
T1447	100	m/u	mut.
T1452	100	m/u	mut <sup>RNA</sup>
T1454	200	m/u	wt
T1495	50/100	m/u	R273H
T1522	100	m/u	wt

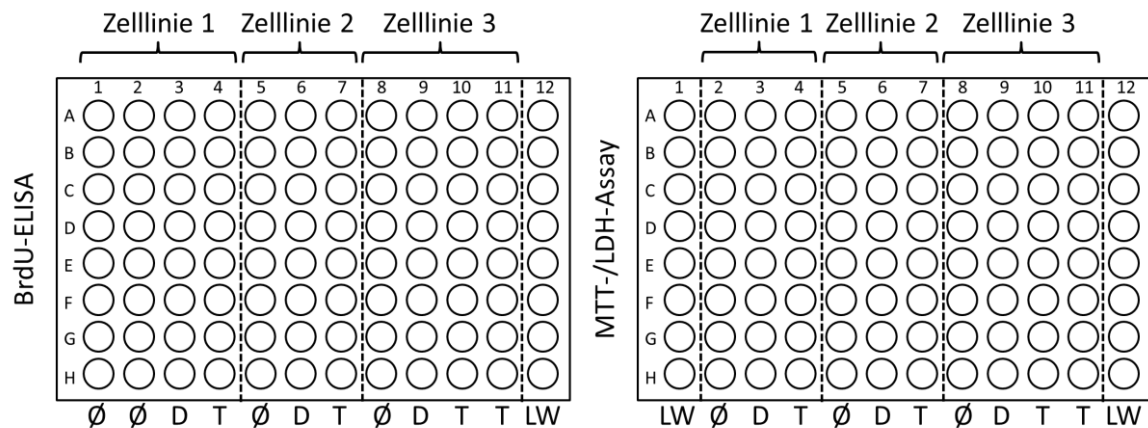
m: methyliert; u: unmethyliert; MGMT: O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; T: Tumor; mut.: mehrere Einzel-Nukleotid-austausche in Bereich von Exon 5 bis Exon 7; mut<sup>RNA</sup>: atypische p53 mRNA; R273H: Aminosäurerest Arginin 273 durch Histamin ersetzt; wt: Wild-Typ.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des Behandlungskonzeptes mit Angabe der Zeitpunkte und der durchgeführten Analysen.** – A: Schema zur Vorgehensweise bei Dosiswirkungskurven der Bestrahlung (RT). Die Bestrahlung erfolgte an Tag d0, die TMZ-Zugabe 4h vor Bestrahlung. B1 und B2: Schemata zur Vorgehensweise mit zeitlich variiertem TMZ-Zugabe relativ zur Bestrahlung. B1: Zeitgleiche Applikation von TMZ zur Bestrahlung an Tag d0. B2: Um 24h zeitversetzte Applikation von TMZ relativ zur Bestrahlung an Tag d1. Die Zellen wurden an Tag d-1 in 96-Lochplatten und 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausplattiert, die Bestrahlung erfolgte stets an Tag d0. BrdU-ELISA und MTT-Test erfolgten bei Schema A und B1 an Tag d4, bei Schema B2 an Tag d5, LDH-Assay, Western Blot und Durchflusszytometrie stets an Tag d3. RT: Bestrahlung, TMZ: Temozolomid, BrdU: BrdU-ELISA, MTT: MTT-Assay, LDH: Lactatdehydrogenase-Assay, WB: Western Blot, FC: Durchflusszytometrie.

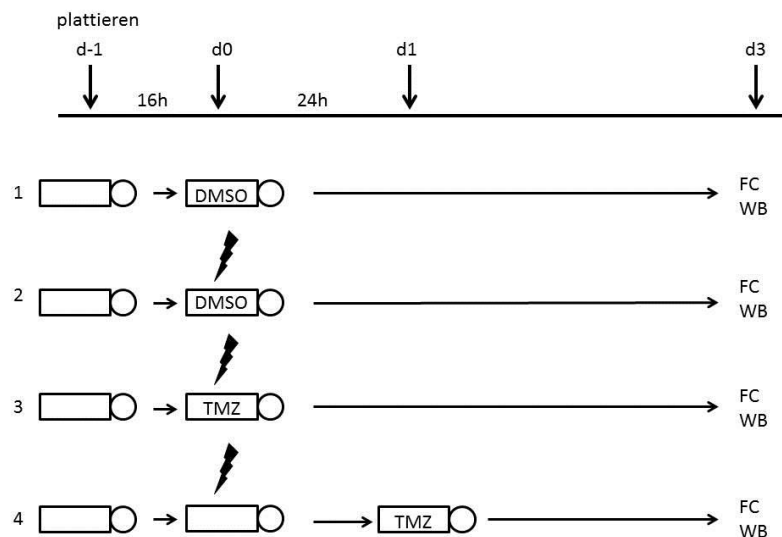
### 3.2.1. Behandlung mit Temozolomid

In dieser Arbeit wurde als Chemotherapeutikum in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöstes Temozolomid (Temodal®, TMZ) verwendet. In Abhängigkeit von der SLGC-Linie wurden Endkonzentrationen von 50 µM, 100 µM und 200 µM eingesetzt (Tab. 2). Da TMZ hydrophob ist, diente DMSO als Lösungsmittel. Die DMSO-Konzentration im Ansatz lag stets bei < 1%. Zur Kontrolle wurde in den Experimenten jeweils eine identische Probe parallel mit DMSO behandelt und untersucht. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine unbehandelte Probenreihe (8 Vertiefungen/Platte) oder T25-Kulturflasche mitgeführt. Pro 96-Lochplatte wurden 3 SLGC-Linien untersucht, um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen SLGC-Linien zu ermöglichen (Abb. 3).



**Abb. 3: Behandlungsschema der 96-Loch-Mikrotiterplatten.** - Es wurden stets drei SLGC-Linien gleichzeitig behandelt. Die vertikalen Reihen wurden identisch behandelt. Die Temozolomid-Konzentrationen waren zelllinienspezifisch (Tab. 2). Ø: unbehandelt; DMSO: Dimethylsulfoxid; TMZ: Temozolomid; LW: Leerwert.

Für die Untersuchungen mit Hilfe der Western Blot-Methode und der durchflusszytometrischen Analysen wurden jeweils 4 Zellkulturflaschen pro Zelllinie unterschiedlich behandelt (Abb. 4).



**Abb. 4: Behandlungsschema der Zellen in 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen.** – Die Zelllinien wurden 16h (d-1) vor der ersten Behandlung plattiert. Die Bestrahlung (symbolisch als Blitz dargestellt) erfolgte am Tag d0 (Ansatz 2 bis 4) mit 10 Gy. Weiterhin wurden die Kulturen am gleichen Tag direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit DMSO oder TMZ behandelt (Ansatz 1 bis 3). Im Ansatz 4 erfolgte die TMZ-Zugabe 24h nach der Bestrahlung. Die Analyse der Kulturen erfolgte stets an Tag d3. DMSO: Dimethylsulfoxid; TMZ: Temozolomid; Gy: Gray; FC: Durchflusszytometrie; WB: Western Blot.

### 3.2.2. Bestrahlung der Zellen

Die Bestrahlung der Kulturen erfolgte analog zur Klinik mit einem Linearbeschleuniger, der in der Strahlentherapie zur perkutanen Bestrahlung verwendet wird. Dieses Gerät erzeugt Elektronen und beschleunigt diese dann mittels eines hochfrequenten Magnetfeldes. Nachfolgend werden die beschleunigten Elektronen durch den Aufprall auf eine Kupferoberfläche wieder abgebremst. Dabei kommt es zu Energieumwandlungsprozessen und es entsteht unter anderem eine Bremsstrahlung in Form von hochenergetischen  $\gamma$ -Quanten – die sog. Photonenstrahlung. Diese Photonen erzeugen beim Auftreffen auf Gewebe Sekundärelektronen, die ihre Energie im Körper abgeben. Die Tiefe des Eindringens der  $\gamma$ -Quanten und somit die effektive Behandlungstiefe ist von der Energie der Strahlung abhängig. Photonenstrahlung wird insbesondere zur Bestrahlung von tiefsitzenden Tumoren verwendet (Vyas et al., 2013).

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte stets 24 h (Tag d0) nach dem Ausplattieren (Abb. 2). Bestrahlt wurden die Zellen mit dem Linearbeschleuniger (Mevatron 74, Siemens, Deutschland) in Einzeldosen von 2 bis 20 Gray (Gy). Die Mikrotiterplatten und T25-Kulturflaschen wurden unter dem Strahlenaustrittsfenster positioniert und mit 1,5-2 cm dicken Plastikplatten überdeckt, um das Optimum der Strahlenintensität auf der Oberfläche des Zellrasens zu zentrieren.

BrdU-ELISA und MTT-Assay erfolgten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe des TMZ an Tag d4 bzw. Tag d5. Der Lactatdehydrogenase-Assay wurde stets an Tag d3 in identischem Abstand zur Bestrahlung durchgeführt. Darüber hinaus wurden der Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie und die Expressionslevel der Zellzyklusinhibitoren p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> und des Proteins PARP-1 mittels der Western Blot-Methode untersucht. Diese Experimente erfolgten ebenfalls an Tag d3 nach der Bestrahlung (Abb. 2).

### 3.2.3. BrdU-ELISA

Mithilfe des BrdU-ELISA können Rückschlüsse auf die Proliferation adhärenter Zellen gewonnen werden. Dies geschieht über den Einbau des Nukleotidanalogs 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen während der Replikation in der S-Phase des Zellzyklus. Das eingebaute BrdU wird mithilfe eines Antikörpers bestimmt und lässt indirekt Rückschlüsse auf die DNA-Replikation und damit die Proliferation der Zellen zu. Die wichtigen Schritte sind die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen und die anschließende Bindung eines monoklonalen Peroxidase-gekoppelten Antikörpers an das eingebaute BrdU. Die Peroxidase wiederum oxidiert in der nachfolgenden Nachweisreaktion das nahezu farblose Substrat ABTS [2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazol-6-sulfonsäure)] zu einem grünen Farbstoff. Für die Analyse wurde

das 5'-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III (Roche, Basel, Schweiz) verwendet. Es wurden  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und wie in Abb. 2 behandelt. Die BrdU-Zugabe erfolgte immer an Tag d0 2h nach der Bestrahlung. Dabei wurden in jede Vertiefung der 96-Loch-Platten (Abb. 3) 10 µl einer mit 1xPBS verdünnten BrdU-Lösung (1:90) gegeben. Die Platten wurden danach bis zum Tag der Messung (je nach experimentellem Schema an Tag d4 oder d5, Abb. 2), wie im Kapitel 3.1.1. beschrieben, inkubiert.

Am Tag der Messung wurde zunächst das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden zwei Mal mit je 220 µl Waschmedium (DMEM/2% FCS, auf 37°C temperiert) pro Vertiefung gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl BrdU-Fixierlösung [70% Ethanol; 23,3% dest. H<sub>2</sub>O (v:v) und 6,7% HCl, auf -20°C temperiert] in jede Vertiefung wurde die Platte für 30 min bei -20°C inkubiert. Es folgten das Absaugen der Fixierlösung sowie jeweils drei Waschschrte mit 220 µl Waschmedium. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 37°C im Brutschrank mit je 100 µl Nuklease-Verdünnung (1:100 mit dem Inkubationspuffer aus dem Kit) pro Vertiefung inkubiert. Hierdurch wurde die DNA verdaut und das Bromdesoxyuridin für die spätere Antikörperbindung zugänglich gemacht. Im Anschluss daran wurden die Zellen erneut jeweils drei Mal mit 220 µl Medium gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem BrdU-Antikörper mit 100 µl pro Vertiefung („Anti-BrdU-POD, Fab fragments“, 1:100 mit 1xWaschpuffer aus dem Kit verdünnt). Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte für 30 min bei 37°C im Brutschrank. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen wurde anschließend jeweils drei Mal mit 220 µl 1xPBS gewaschen. Im letzten Schritt wurden in jede Vertiefung 100 µl des Substrates ABTS (Komponente des Kits, Roche) zugegeben und anschließend wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 405$  nm (Referenzwellenlänge  $\lambda = 490$  nm) im ELISA-Reader (UVM 340, Asys HiTech GmbH/LKB Biochrom, Berlin) unter der Verwendung der Software MicroWin2000 (Microtek Laborsysteme GmbH, Overath) gemessen. Es folgten weitere Bestimmungen der optischen Dichte in zehnminütigen Abständen. Zur Auswertung wurden die Messungen des Zeitpunktes verwendet, bei dem die geringste auf der Platte gemessene optische Dichte (OD) über 0,1 und die höchste OD unter 1,5 lag. Als Leerwert diente eine zellfreie, mit ABTS-Lösung befüllte Reihe. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet (s. Kap. 3.3).

#### **3.2.4. MTT-Assay**

Über Änderungen der Vitalität kann der MTT-Assay Aufschluss geben. Dazu wurden SLGC-Kulturen an Tag d4 bzw. d5 des Experimentes in einer 96-Loch-Platte mit MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid], einem gelben Tetrazoliumsalz, inkubiert (Abb. 2, Abb. 3). In lebenden, stoffwechselaktiven Zellen wird der Farbstoff in Folge der Aktivität

von Redoxenzymen in ein wasserunlösliches, blauviolettes Formazan umgewandelt. Dessen Absorption wurde nach Solubilisierung mit einem organischen Lösungsmittel (hier Dimethylformamid) gemessen (Twentyman und Luscombe, 1987).

Die Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$  plattiert und wie in Abb. 2 behandelt. Der MTT-Assay fand 5 Tage nach TMZ/DMSO-Zugabe statt. Hierzu wurden unter Abdunkelung 10  $\mu\text{l}$  MTT-Lösung [5mg MTT (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) in 1 ml 1xPBS] in jede Vertiefung pipettiert. Nach einer vierstündigen Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C wurde die Reaktion mittels MTT-Stopplösung [100  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung; 10% SDS (w:v), 50% N, N-Dimethylformamid (v:v) in dest. H<sub>2</sub>O] gestoppt. Zum vollständigen Lösen des Formazansalzes wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit sowie nach weiteren 20 min und nach 24 h erfolgten Messungen im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 570 \text{ nm}$  (Referenzwellenlänge  $\lambda = 655 \text{ nm}$ ) mit dem Programm MicroWin2000. Zur Auswertung wurden die Ergebnisse der Messung nach 40 min Inkubationszeit verwendet. Als Referenzwert diente eine zellfreie Reihe der Platte, in die pro Vertiefung 10  $\mu\text{l}$  MTT-Lösung, 100  $\mu\text{l}$  Stopplösung und 100  $\mu\text{l}$  Medium pipettiert wurden. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet (s. Kap. 3.3).

### **3.2.5. Zytotoxizitätstest**

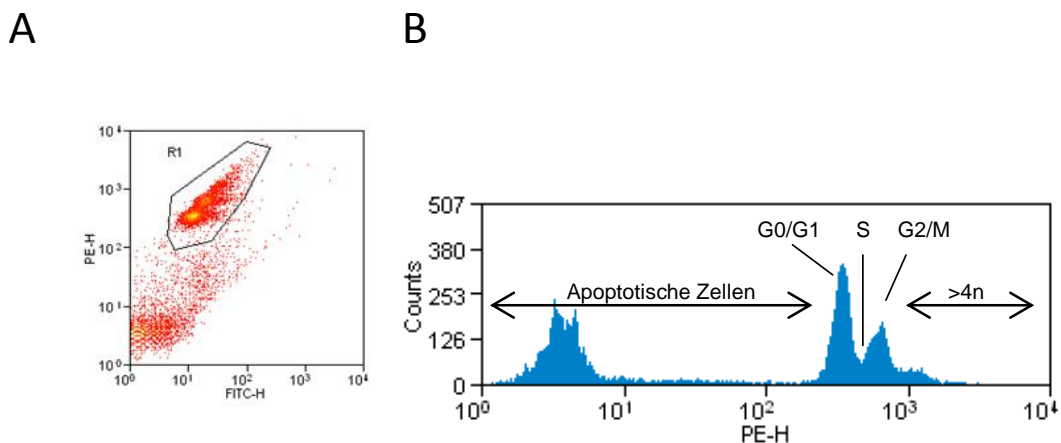
Der zytotoxische Effekt der Behandlung wurde mithilfe der Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Die LDH wird im Falle von Apoptose, Nekrose oder anderen die Vitalität reduzierenden Prozessen bzw. einer permeabilisierten Zellmembran aus den Zellen freigesetzt (Burd und Usategui-Gomez, 1973). Sie ist ein lösliches, zytosolisches Enzym, welches die Oxidation von Lactat zu Pyruvat katalysiert, wobei  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert wird (Burd und Usategui-Gomez, 1973; Chan et al., 2013). Das NADH wiederum ermöglicht die Reduktion des schwach gelben Tetrazoliumsalses INT (2-p-Iodophenyl-3-p-Nitrophenyl-5-phenyltetrazoliumchlorid) zu einem rötlichen Formazan, wobei die Umsetzung des Substrats mit der Aktivität der LDH positiv korreliert.

Für den Assay wurde das CytoTox-Kit (CytoTox 96® Non-Radioaktive Cytotoxicity Assay, Promega, Madison, Wisconsin, USA) nach Instruktionen des Herstellers verwendet. Gemessen wurde stets an Tag d3 (Abb. 2). Zunächst wurde die 96-Loch-Platte bei 250xg und 4°C für 4 min zentrifugiert (Zentrifuge: 5810 R, Eppendorf). Anschließend wurden 50  $\mu\text{l}$  des Überstandes aus jeder Vertiefung auf eine neue 96-Loch-Platte überführt. In jede Vertiefung der neuen Platte, die 50  $\mu\text{l}$  Zellkultur-Überstand enthielt, wurden 50  $\mu\text{l}$  Substrat-Mix (Komponente des Kits) pipettiert. Das Gemisch wurde 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 50  $\mu\text{l}$  einer auf 4°C temperierten Stopplösung (Komponente des Kits) pro Vertiefung. Direkt im Anschluss wurde die optische Dichte im ELISA-Reader mit der Software MicroWin2000 bei einer

Wellenlänge von  $\lambda = 490\text{nm}$  (eine Referenzwellenlänge wurde in den Hersteller-Instruktionen des Kits nicht beschrieben) gemessen. Als Leerwert diente eine vertikale Reihe mit 8 Vertiefungen, die jeweils  $50\ \mu\text{l}$  Medium,  $50\ \mu\text{l}$  Substratmix und Stopplösung, aber keine Zellen enthielten.

### 3.2.6. Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie können neben zytomorphologischen Daten unter Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper und Farbstoffe definierte zelluläre Eigenschaften erfasst werden. Das Prinzip beruht auf der Emission optischer Signale seitens der Zelle, während diese einen Laserstrahl passiert (Givan, 2011). Die Zellen werden in Einzelzellsuspension durch die Kapillare eines Durchflusszytometers gesaugt und Laserstrahlen unterschiedlicher Energie ausgesetzt. Emissioniertes Streulicht und Fluoreszenzimpulse der Zellen werden anschließend von einem Detektor ausgewertet. Das Vorwärtsstreulicht (engl.: *forwards scatter*, FSC) korreliert mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (engl.: *sideways scatter*, SSC) ist ein Maß für die Brechung des Lichtes im rechten Winkel und gibt somit Auskunft über die Granularität der Zelle sowie deren Membranstruktur (Picot et al., 2012).



**Abb. 5: Durchflusszytometrische Analyse Propidiumiodid-markierter mit DMSO behandelter Zellen der Linie T1495.** – A: Punktwolkendiagramm der durchflusszytometrischen Analyse der Linie T1495. Dabei ist die Höhe der Intensitäten der FITC-Fluoreszenz (FITC-H) gegen die der PE-Fluoreszenz (PE-H) aufgetragen. Die Linie im Punktwolkendiagramm umschließt die Population von Zellen, die für die Auswertung herangezogen wurden (R1). B: Histogramm der Zellen von R1 auf die einzelnen Zellzyklusphasen bzw. den Bereich apoptotischer Zellen. Dabei ist die Höhe der Intensität der PE-Fluoreszenz (PE-H) gegen die Anzahl an Zellen (counts) aufgetragen. Der  $G_0/G_1$ -Peak repräsentiert Zellen mit einem diploiden Chromosomensatz, der  $G_2/M$ -Peak Zellen mit einem doppelt diploiden Chromosomensatz. Im Bereich  $>4n$  befinden sich polyploide beziehungsweise aneuploide Zellen. S: Synthesephase; M: Mitose; FITC: Fluoresceinisothiocyanat; PE: Phycoerythrin.

Propidiumiodid (PI) ist ein DNA-interkalierendes Agens, welches zur Bestimmung des DNA-Gehaltes herangezogen wird. Daraus können Rückschlüsse auf die Phasen des Zellzyklus gezogen werden. In der  $G_0$ - und der  $G_1$ -Phase liegt ein diploider Chromosomensatz vor. Während der S-

Phase wird die DNA verdoppelt, so dass in der G2-Phase schließlich ein tetraploider Chromosomensatz vorliegt. Die Höhe der Fluoreszenzintensität korreliert dabei direkt mit dem DNA-Gehalt (Abb. 5) (Riccardi und Nicoletti, 2006). Abb. 5 zeigt das Beispiel einer eigenen Analyse der mit DMSO-behandelten Zelllinie T1495.

Die SLGC-Kulturen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^4$  (T1495) bzw.  $5 \times 10^3$  (T1389) plattiert und, wie in Abb. 2 dargestellt, behandelt. Dann wurden die Zellen entsprechend ihrer Adhärenz unter Verwendung von Trypsin/ETDA (0,05%, Invitrogen™-Gibco®, Karlsruhe) geerntet und vorhandene Aggregate dissoziiert. Anschließend wurde bei 250xg und 25°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1 ml 1xPBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Diese Suspension wurde 1 min bei 1400xg pelletiert (Eppendorf Centrifuge 5415C, Hamburg) und der Überstand abgesaugt. Die weiteren Schritte erfolgten auf Eis. In jedes Reaktionsgefäß wurden auf -20°C temperierte 500 µl Ethanol-Eisessig-Fixierlösung (95:5; v:v) pipettiert. Nach gründlichem Resuspendieren wurden die Zellen 10-15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden sie für 1 min bei 1000xg pelletiert, das Pellet mit 500 µl eiskaltem 1xPBS gewaschen und ein drittes Mal wie oben pelletiert. Das Pellet wurde nun in 100 µl PI/FACS-Mix [95 µl 1xPBS, 4 µl PI (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 1 µl an 100 mg/ml RNase (Roth, Karlsruhe)] resuspendiert und im Dunkeln 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden 400 µl eiskaltes PBS zugegeben und die Zellsuspension über einen Einwegfilter (Partec, Celltrics, Görlitz) gefiltert. Danach wurde erneut für 1 min bei 1000xg zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 500 µl 1xPBS aufgenommen.

Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer BD LSRII unter Verwendung der BD FACS Diva Software Version 6.1 (BD Biosciences, Heidelberg). Es wurden in der Regel 10000 Zellen analysiert. Die Ergebnisse wurden in Punktwolkendiagrammen dargestellt (Abb. 5). Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software *summit v4.3* (BD Biosciences, Heidelberg).

### **3.2.7. Western Blot-Analyse**

Um die Auswirkungen der Radiochemotherapie auf die Proteinexpression in GBM-Zellen zu untersuchen, wurde das Verfahren des Western Blots verwendet. Untersucht wurden die Zellzyklusinhibitoren  $p21^{Cip1/WAF1}$  und  $p27^{Kip1}$  sowie das DNA-Reparaturenzym PARP-1 [Poly-(ADP-ribose)Polymerase 1] (Tab. 4).

Zunächst wurden Gesamtzellextrakte (WCE; engl.: *whole cell extract*) hergestellt. Hierzu wurden die in den 25cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen plattierten SLGC-Kulturen (s.o.) mit Trypsin/EDTA geerntet und in 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellpellets in JLB-Puffer [50mM Tris-Cl (pH

7,5); 150mM NaCl; 10% Glycerol (v/v); 0,5% Triton-X-100 (v/v)] resuspendiert. Das Volumen war dabei von der Größe des Pellets abhängig und wurde empirisch ermittelt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt. Dazu wurde das 5x Bradford Reagenz (BioRad, München) eingesetzt und nach Standardmethoden (Maniatis et al., 1989) vorgegangen. Zunächst wurden die WCEs auf einem analytischen SDS-Gel untersucht. Dazu wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli angewendet. Die Elektrophorese erfolgte mittels des Protean III-Systems (BioRad, München). Die Färbung der analytischen Gele wurde nach Standardprotokoll mit Coomassie Brilliant Blue (R-250; Roth, Karlsruhe) durchgeführt (Maniatis et al., 1989).

Für den Western Blot wurden 12 µg Protein pro Spur in einem SDS-Gel (4% Sammelgel; Tab. 3) aufgetrennt. Der Gelladepuffer enthielt 25mM Tris, 0,2M Glycin und 0,1% SDS. Für den Nachweis von PARP-1 wurden 10%ige (Tab. 3), für die Zellzyklusinhibitoren (p21<sup>Cip1/WAF1</sup> und p27<sup>Kip1</sup>) 15%ige Trenngele (Tab. 3) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 1xLaufpuffer (248mM Tris Base; 400mM Glycin; 0,5% SDS) für 45-50 min bei 200 Volt. Der Proteintransfer erfolgte für 1h bei 12 Volt mit 1xTransferpuffer (47,9mM Tris; 38,6mM Glycin; 0,037% SDS) mittels des Semi-dry-Verfahrens (Blotkammer Transblot SD, Biorad, München) auf eine Nitrozellulosemembran (BioRad, München). Nach dem Transfer wurde die Membran mit 1xPBS/1% Trockenmilch blockiert und dann über Nacht mit dem Primärantikörper (Tab. 4) bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS/0,05%Tween 20 mit dem Sekundärantikörper (Tab. 5) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte nach erneutem dreimaligen Waschen mit dem Kit „Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate“ (Thermo Scientific, Schwerte). Die Chemolumineszenz wurde mit Hilfe des ChemiDoc XRS (Biorad, München) unter Verwendung der Quantity One Software Version 4.6.2 (BioRad, München) detektiert und die Bandenintensität quantifiziert. Alle Nitrozellulosemembranen wurden nachfolgend mit Antikörpern gegen zwei oder drei Kontrollproteine inkubiert, die als Ladekontrollen dienen. Um Aussagen über die Expressionslevel der untersuchten Proteine treffen zu können, wurde die Bandenintensität der untersuchten Proteine zu derjenigen der Kontrollproteine normalisiert.

**Tab. 3: Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel**

Komponente	4%iges Sammelgel	10%iges Trenngel	15%iges Trenngel
H <sub>2</sub> O	1,8ml	2ml	1,2ml
1,5M Tris-Puffer pH 8,8	-	1,25ml	1,25ml
1M Tris-Puffer pH 6,8	750µl	-	-
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	400µl	1,66ml	2,5ml
10% APS (w/v)	15µl	50µl	50µl
TEMED	4µl	3µl	3µl

APS: Ammoniumpersulfat; TEMED: Tetramethylethylendiamin; Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

**Tab. 4: Primärantikörper für die Western Blot-Analyse**

Antikörper	Name	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
<b>αp21</b> <sup>Cip1/WAF1</sup>	AB 2946S	Maus	Cell Signaling Technology®, Danvers, Massachusetts, USA	1:1000
<b>αp27</b> <sup>Kip1</sup>	AB 2552	Kaninchen	Cell Signaling Technology®, Danvers, Massachusetts, USA	1:1000
<b>αPARP-1</b>	AB 9542S	Kaninchen	Cell Signaling Technology®, Danvers, Massachusetts, USA	1:1000
<b>αAktin</b>	MAB1501R	Maus	Millipore, Schwalbach, Deutschland	1:1000

α: Symbol für Antikörper; p21<sup>Cip1/WAF1</sup> + p27<sup>Kip1</sup>: Zellzyklusinhibitoren; PARP-1: Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase1

**Tab. 5: Sekundärantikörper für die Western Blot-Analyse**

Antikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
<b>Goat F(ab')<sub>2</sub> Fragment Anti-Mouse IgG (H+L)-Peroxidase [GAMPO]</b>	Ziege	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland	1:5000
<b>Goat F(ab')<sub>2</sub> Fragment Anti-Rabbit IgG (H+L)-Peroxidase [GARPO]</b>	Ziege	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland	1:5000

Goat (engl.): Ziege; mouse (engl.): Maus; rabbit (engl.): Kaninchen; F(ab')<sub>2</sub>: Teil des Antikörpers, der das Antigen bindet, Dimer bestehend aus zwei F(ab)-Fragmenten; IgG (H+L): Immunglobulin G bestehend aus einer schweren („heavy“ – H) und einer leichten („light“ – L) Kette.

### 3.3. Statistik

Die graphische Darstellung der Ergebnisse der BrdU-ELISA sowie der MTT- und LDH-Assays erfolgte mit Hilfe der Software Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Es wurden die Mittelwerte aus den Messwerten von jeweils acht Proben (einer Reihe auf der 96-Loch-Platte entsprechend) und die Standardabweichung berechnet. Die Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen erfolgte sowohl für die Dosiswirkungskurven der Bestrahlung als auch für die Dosiswirkungskurven der Kombinationsbehandlung mit Temozolomid mittels univariater Varianzanalyse (ANOVA). Bei vorliegender Signifikanz wurde der gepaarte t-Test eingesetzt. Beim Vergleich der Messwerte von zwei Messreihen, die aus einer Zelllinie und einem Versuchsansatz stammten, wurde ebenfalls der gepaarte t-Test verwendet. Ein p-Wert, der kleiner als 0,05 war, wurde als statistisch signifikant angesehen und mit \* bzw. für eine statistisch hohe Signifikanz ( $p < 0,005$ ) mit \*\* versehen. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe von SPSS 19 (SPSS Inc., einer IBM SPSS Statistik, Chicago, USA).

Für die Western Blot-Methode und die Durchflusszytometrie wurde der systematische Fehler empirisch mit der Software Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) bestimmt und in den Graphen angegeben.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Bestrahlung und kombinierte Therapie mit Temozolomid (TMZ)

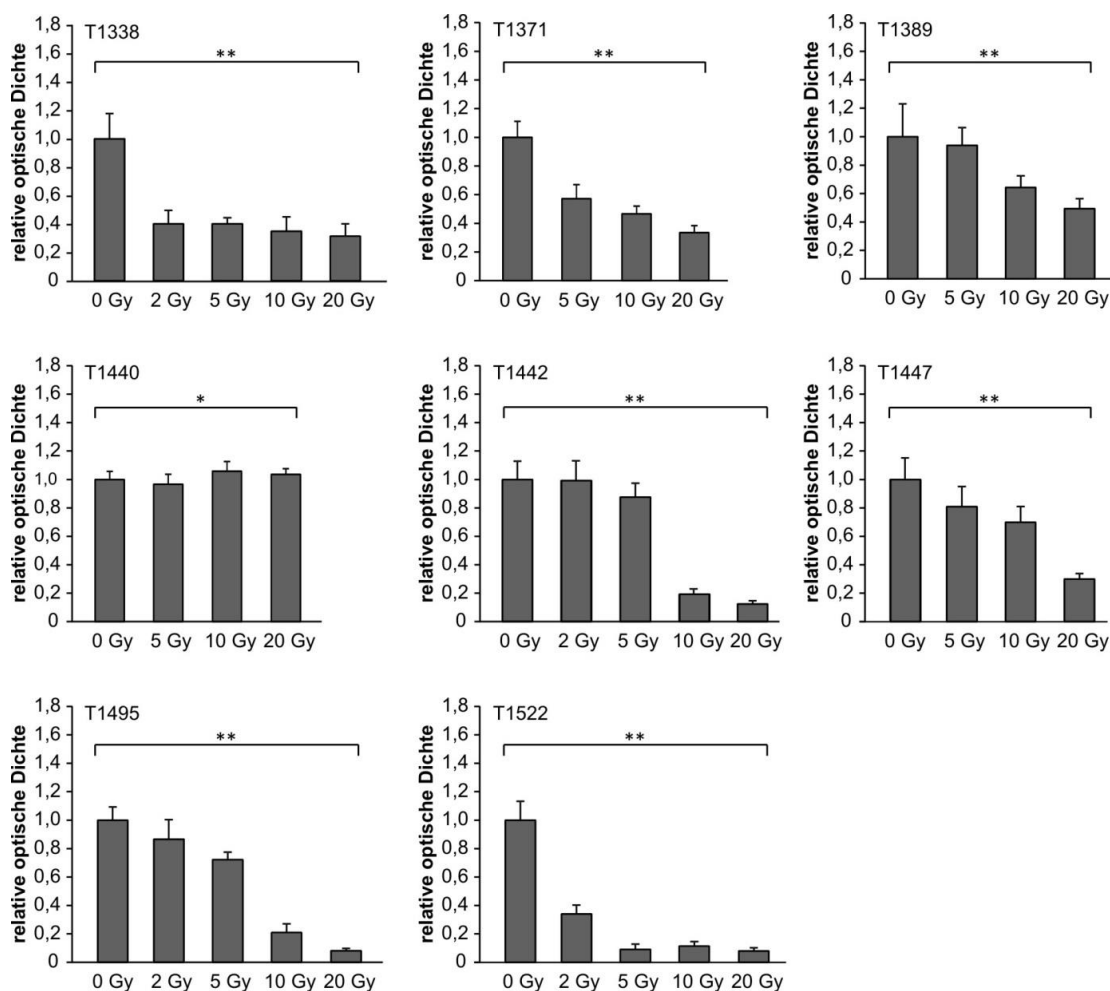
Die Radiochemotherapie von Glioblastomen erfolgt als fraktionierte Bestrahlung über 6 Wochen an 5 Tagen pro Woche. Die adjuvante Chemotherapie umfasst eine tägliche orale Applikation von Temozolomid (TMZ). In dieser Arbeit wurde *in vitro* an phänotypisch verschiedenen stammzellähnlichen Gliomzelllinien (SLGCs) untersucht, welche Sensitivität diese gegenüber einer Bestrahlung haben und ob eine Änderung in der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Gabe Auswirkungen auf das Behandlungsergebnis hat. Um Aussagen über den Effekt der unterschiedlichen Behandlungen treffen zu können, wurden die Proliferation mittels BrdU-ELISA und die Vitalität mithilfe von MTT- sowie LDH-Assays untersucht. Diese Analysen wurden mehrfach wiederholt. Ferner wurden die Expressionslevel der Zellzyklusproteine p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> sowie die des DNA-Reparaturenzyms PARP-1 mittels Western Blot analysiert, um zu prüfen, ob die Behandlungen einen Zellzyklusarrest und/oder die Induktion von Apoptose bewirken. Zur Bestimmung möglicher Einflüsse auf den Zellzyklus wurden weiterhin durchflusszytometrische Messungen Propidiumiodid-markierter Zellen durchgeführt.

#### 4.1.1. Dosiswirkungskurven der Bestrahlung

Die unterschiedliche Sensitivität der SLGC-Linien lässt sich anhand der Effektivdosis 50 [ED<sub>50</sub>] erkennen. Der ED<sub>50</sub> entspricht die Strahlendosis, die 50% der maximalen Wirkung auslöst oder bei der in 50% der Fälle der erwartete Effekt eintritt. In dieser Versuchsreihe wurden zur Bestimmung der ED<sub>50</sub> die SLGC-Linien mit unterschiedlichen Dosen von 0 bis 20 Gray (Gy) bestrahlt. Es wurden SLGC-Kulturen eingesetzt, die sich von malignen Gliomen (Glioblastom multiforme, GBM; Gliosarkom, GSarc) ableiten. Alle Kulturen zeigten eine stabile Proliferation in Serum-freiem Medium und enthielten Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften (Tab. 2).

##### 4.1.1.1. Effekt auf die Proliferation

Um den Effekt steigender Strahlendosen auf die Proliferation zu bestimmen, wurde ein BrdU-ELISA (Kap. 3.2.3.) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 bzw. Abb. 18 zusammengefasst, die abgeleiteten ED<sub>50</sub>-Werte der einzelnen SLGC-Linien in Tab. 6 dargestellt.



**Abb. 6: Effekt ansteigender Strahlendosen auf den Einbau von BrdU in die DNA proliferierender SLGC-Linien.** - BrdU-ELISA. Die Bestrahlung erfolgte in parallelen Ansätzen (96-Lochplatten) mit 2, 5, 10 und 20 Gray (Gy). Eine 96-Lochplatte wurde nicht bestrahlt (0 Gy). Die Werte der unbehandelten Kontrollproben wurden als 1 definiert und alle übrigen Werte wurden relativ dazu dargestellt. Der Einbau des Basenanalogons BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) in die DNA proliferierender Zellen wurde am Tag d5 mittels ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*; Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 parallel untersuchten Proben und die Standardabweichung. Die in der Abbildung angegebenen statistischen Unterschiede (\* für  $p < 0,05$ ; \*\* für  $p < 0,005$ ) zwischen den Bestrahlungsgruppen wurden mit der Varianzanalyse ANOVA ermittelt. T: Tumor.

Bei der Glioblastomlinie **T1338** wurde mit dem ANOVA-Test im Vergleich der Bestrahlungsgruppen untereinander ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,005$ ) ermittelt (Abb. 6). Die Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy führte bereits zu einer signifikanten Reduktion ( $p < 0,005$ ; t-Test) des Einbaus von BrdU (Abb. 18, Anhang). Die relative optische Dichte (OD) war im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle um 60% vermindert. Die  $ED_{50}$  wurde bereits bei einer Dosis von 2 Gy erreicht. Eine Erhöhung der Strahlendosis auf 5 Gy führte zu keiner weiteren Reduktion des Einbaus von BrdU. Mit 10 und 20 Gy wurden geringfügig stärker reduzierte Werte im Vergleich zu 2 und zu 5 Gy gemessen, wobei der Unterschied jedoch nicht signifikant war ( $p > 0,05$ ; t-Test). Bei der Gliosarkomlinie **T1371** zeigte sich in der ANOVA ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,005$ ) zwi-

schen den Bestrahlungsgruppen (Abb. 6). Bereits eine Dosis von 5 Gy führte zu einer signifikanten Reduktion der OD um 43% im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 18, Anhang). Die  $ED_{50}$  wurde bei 10 Gy erreicht. Die OD wurde mit dieser Strahlendosis im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle signifikant um 54% reduziert ( $p < 0,005$ ). Eine weitere Dosissteigerung auf 20 Gy verstärkte den Effekt, so dass mit 20 Gy eine Reduktion um 66% im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle erreicht wurde ( $p < 0,005$ ). Bei der Glioblastomlinie **T1389** wurde mit dem ANOVA-Test im Vergleich der Bestrahlungsgruppen untereinander ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 6). Die Bestrahlung führte jedoch erst ab einer Dosis von 10 Gy zu einer signifikanten Verminderung der BrdU-Inkorporation im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ( $p < 0,005$ ; t-Test; Reduktion um 36%; Abb. 18, Anhang). Eine Dosis von 20 Gy bewirkte im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle eine Reduktion um 50% ( $p < 0,005$ ). Bei der Glioblastomlinie **T1440** zeigte sich zwar in der ANOVA zwischen den Bestrahlungsgruppen ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ; Abb. 6). Im daraufhin durchgeführten gepaarten t-Test wurde jedoch mit keiner der verwendeten Strahlendosen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle eine statistische Signifikanz ermittelt ( $p > 0,05$ ; Abb. 18, Anhang). Die nachgewiesene Signifikanz in der ANOVA ist somit am ehesten auf eine Kombination von einzelnen Bestrahlungsgruppen zurückzuführen. Das Ergebnis weist auf eine hohe Strahlenresistenz dieser SLGC-Linie hin. Bei der Glioblastomlinie **T1442** wurde mit der ANOVA ein signifikanter Unterschied zwischen den Bestrahlungsgruppen ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 6). Die Bestrahlung mit 5 Gy ergab eine nicht signifikante Reduktion der BrdU-Inkorporation um 13% relativ zur Kontrolle ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 18, Anhang). Ab einer Dosis von 10 Gy wurde eine signifikante Reduktion der OD um über 80% relativ zur Kontrolle erreicht [10 Gy: 80% ( $p < 0,005$ ; t-Test); 20 Gy: 88% ( $p < 0,005$ ; t-Test)]. Die Gliosarkomlinie **T1447** bildet unregelmäßig adhärenzte Aggregate, die ab einer bestimmten Größe im Zentrum tote Zellen enthalten können (C. Zechel, persönliche Mitteilung). Weiterhin sind die Aggregate nicht einfach zu dissoziieren. Dies spiegelte sich in der Analyse wider, die aufgrund deutlich variierender Werte mehrfach wiederholt werden musste. Eine konklusive experimentelle Serie ist in Abb. 6 zu sehen. Zwischen den Bestrahlungsgruppen wurde in der ANOVA eine statistische Signifikanz ermittelt ( $p < 0,005$ ). Mit steigender Strahlendosis war eine zunehmende Reduktion des Einbaus von BrdU festzustellen. So wurde die OD mit 5 Gy im Vergleich zur Kontrolle um 20% reduziert, wobei diese Reduktion nicht signifikant war ( $p > 0,05$ ; t-Test). Mit 10 Gy wurde eine signifikante Reduktion um 30% im Vergleich zur Kontrolle erzielt, mit 20 Gy um 70% ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 18, Anhang). Die  $ED_{50}$  wurde somit für die Bestrahlung erst bei 20 Gy erreicht. Bei der Glioblastomlinie **T1495** wurde in dem ANOVA-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den Bestrahlungsgruppen errechnet ( $p < 0,005$ ; Abb. 6). Bereits die Bestrahlung mit 2 Gy führte zu einer signifikanten Reduktion des BrdU-Einbaus, wobei die Reduktion relativ zur Kontrolle 12% betrug ( $p < 0,05$ ; t-Test; Abb. 18, An-

hang). Dieser Effekt wurde durch die Steigerung der Strahlendosis verstärkt und die ED<sub>50</sub> mit ≤ 10 Gy erreicht [10 Gy: Reduktion um 80% (p<0,005; t-Test); 20 Gy: Reduktion um 90% (p<0,005; t-Test)]. Noch deutlich effizienter wirkte sich die Bestrahlung auf die Glioblastomlinie **T1522** aus. In der ANOVA zeigte sich eine statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Bestrahlungsgruppen (p<0,005; Abb. 6). Bei dieser SLGC-Linie wurde die ED<sub>50</sub> bereits mit 2 Gy erreicht [Reduktion relativ zur unbestrahlten Kontrolle um 64% (p<0,005; t-Test); Abb. 6; Abb. 18, Anhang]. Eine Dosis von 5 Gy führte zu einer Reduktion der OD um 90% relativ zur Kontrolle und konnte durch weitere Erhöhungen der Strahlendosis nicht weiter reduziert werden.

### Fazit

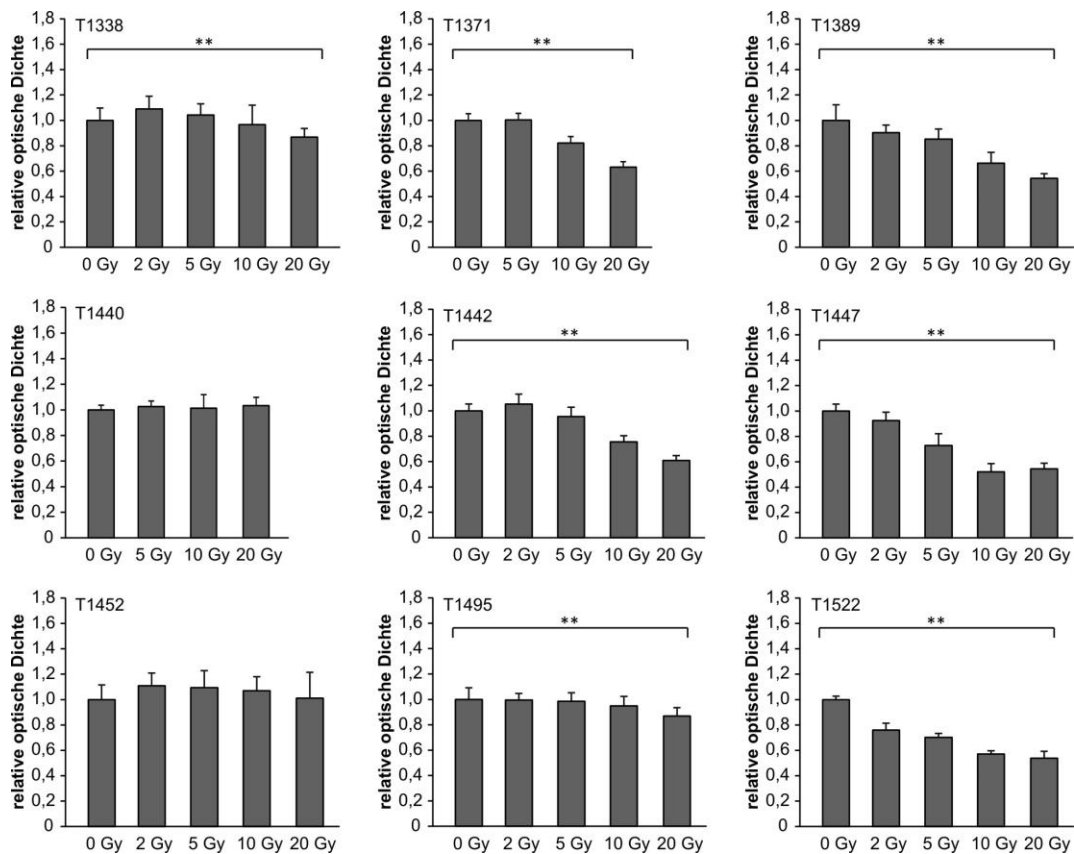
Zusammenfassend führte die Bestrahlung mit Ausnahme von T1440 zu einer Reduktion des anti-proliferativen Effektes bei den untersuchten SLGC-Linien. Allerdings wird auch deutlich, dass die ED<sub>50</sub> im Hinblick auf die Inhibition der Proliferation zwischen den einzelnen SLGC-Linien sehr stark variierte. So wurde die ED<sub>50</sub> bei zwei SLGC-Linien (T1338, T1522) bereits bei 2 Gy erreicht, bei drei SLGC-Linien (T1371, T1442, T1495) bei einer Strahlendosis von 10 Gy und bei zwei SLGC-Linien (T1389, T1447) bei 20 Gy. Bei T1440 hatte keine der verwendeten Strahlendosen einen Einfluss die Proliferation (Tab. 6).

#### **4.1.1.2. Effekt auf die Vitalität**

Um Rückschlüsse auf eine mögliche Beeinflussung der Vitalität durch die Bestrahlung zu gewinnen, wurde ein MTT-Assay (Kap. 3.2.4.) durchgeführt. Die Daten sind in Abb. 7 bzw. Abb. 21 zusammengefasst, die abgeleiteten ED<sub>50</sub>-Werte können der Tab. 6 entnommen werden.

Die Glioblastomlinie **T1338** zeigte sich im MTT-Assay kaum sensitiv auf die Bestrahlung (Abb. 7). Mit der Varianzanalyse (ANOVA) wurde zwar ein signifikanter Unterschied zwischen den Bestrahlungsgruppen ermittelt (p<0,005), im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde jedoch lediglich mit 20 Gy eine geringe, aber statistisch signifikante Senkung der OD um 15% beobachtet (p<0,05; t-Test; Abb. 21, Anhang). Der Messwert nach einer Bestrahlung mit 2 Gy lag geringfügig, aber signifikant (p<0,05; t-Test) über dem der unbehandelten Kontrolle. Dies könnte an einer höheren Zellzahl auf der 2 Gy-Platte liegen, die durch Proliferation oder experimentelle Ungenauigkeiten erklärbar wäre. Bei der Gliosarkomlinie **T1371** wurde in der ANOVA eine statistische Signifikanz zwischen den Bestrahlungsgruppen errechnet (p<0,005; Abb. 7). Nach einer Bestrahlung mit 5 Gy wurde relativ zur Kontrolle keine signifikante Veränderung der OD gemessen (p>0,05; t-Test; Abb. 21, Anhang). Relativ zur unbestrahlten Kontrolle wurde mit 10 Gy eine signifikante

Senkung um 18%, mit 20 Gy um 40% beobachtet ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 21, Anhang). Die Bestrahlung verminderte somit deutlich die Vitalität der T1371-Kultur, ohne dass die  $ED_{50}$  erreicht wurde.



**Abb. 7: Effekt ansteigender Strahlendosen auf die Vitalität von SLGC-Linien.** - MTT-Assay. Die Bestrahlung erfolgte in parallelen Ansätzen (96-Lochplatten) mit 2, 5, 10 und 20 Gray (Gy). Eine 96-Lochplatte wurde nicht bestrahlt (0 Gy). Die Werte der unbehandelten Kontrollproben wurden als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Die Umwandlung des Farbstoffes MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] in ein blauviolett Formazan wurde am Tag d5 mittels des MTT-Assays bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 parallel untersuchten Proben und die Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mit der Varianzanalyse ANOVA zwischen den Bestrahlungsgruppen ermittelt. \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,005$ . T: Tumor.

Bei der Glioblastomlinie **T1389** zeigte der ANOVA-Test eine statistische Signifikanz zwischen den Bestrahlungsgruppen ( $p < 0,005$ ; Abb. 7). Die Bestrahlung führte mit ansteigenden Dosen zu einer kontinuierlichen Abnahme der OD, wobei mit 20 Gy eine signifikante Reduktion um 46% relativ zur unbestrahlten Kontrolle erreicht wurde ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 21, Anhang). Bei der Glioblastomlinie **T1440** wurde in der ANOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Bestrahlungsgruppen ermittelt ( $p > 0,05$ ; Abb. 7), was, wie schon im BrdU-ELISA (Abb. 6) festgestellt, auf eine ausgeprägte Radioresistenz dieser SLGC-Linie hindeutet. Bei der Glioblastomlinie **T1442** wurde in der ANOVA ein signifikanter Unterschied zwischen den Bestrahlungsgruppen erhoben ( $p > 0,005$ ; Abb. 7). Die Bestrahlung mit 2 und 5 Gy erbrachte keine signifikante Änderung der OD

im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 21, Anhang). Erst mit 10 Gy wurde eine signifikante Reduktion um 25% ( $p < 0,005$ ; t-Test) beobachtet, mit 20 Gy im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante 40%ige Senkung erzielt ( $p < 0,005$ ; t-Test). Die Gliosarkomlinie **T1447** zeigte in dem ANOVA-Test eine statistische Signifikanz zwischen den Bestrahlungsgruppen ( $p < 0,005$ ; Abb. 7). Diese SLGC-Linie reagierte bereits auf 2 Gy mit einer signifikanten Reduktion der OD um 8% im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 21, Anhang). Durch eine Steigerung der Strahlendosis auf 5 und 10 Gy wurde dieser Effekt im Vergleich zur Kontrolle zunächst gesteigert [5 Gy: Reduktion um 27% ( $p < 0,005$ ; t-Test); 10 Gy: Reduktion um 48% ( $p < 0,005$ ; t-Test); Abb. 21, Anhang], um dann bei einer Dosis von 20 Gy zu stagnieren. Die Steigerung der Strahlendosis auf 20 Gy erbrachte demnach im Vergleich zu 10 Gy keinen zusätzlichen Effekt. Bei der Glioblastomlinie **T1452** wurde in dem ANOVA-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Bestrahlungsgruppen ermittelt ( $p > 0,05$ ; Abb. 7). Es führte keine der untersuchten Strahlendosen zu einer signifikanten Reduktion der OD im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 21, Anhang). Mit 2 und 5 Gy wurden hingegen leichte, signifikante Anstiege der OD beobachtet (2 Gy: Anstieg um 11%, 5 Gy: Anstieg um 9%;  $p < 0,05$ ; t-Test). Damit konnte die Bestrahlung die Vitalität der T1452-Kultur, ähnlich der T1440-Kultur, auch durch höhere Strahlendosen (20 Gy) nicht verändern. Bei der Glioblastomlinie **T1495** wurde in der ANOVA ein signifikanter Unterschied zwischen den Bestrahlungsgruppen erhoben ( $p < 0,005$ ; Abb. 7). Erst eine Bestrahlung von 20 Gy führte zu einer signifikanten Änderung der OD im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, wobei die Reduktion nur 14% ( $p < 0,005$ ; Abb. 21, Anhang) betrug. Die  $ED_{50}$  wurde folglich nicht erreicht. Somit kann festgestellt werden, dass die Vitalität von T1495-Zellen durch die Bestrahlung wenig beeinflusst wird. Die Glioblastomlinie **T1522** reagierte im MTT-Assay (Abb. 7) wie schon im BrdU-ELISA (Abb. 6) vergleichbar sensitiv auf die Bestrahlung. In der ANOVA wurde eine statistische Signifikanz zwischen den Bestrahlungsgruppen ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 7). Eine signifikante Reduktion wurde bereits mit 2 Gy erreicht und die OD mit steigender Strahlendosis kontinuierlich statistisch signifikant reduziert (t-Test; Abb. 21, Anhang). Mit 5 Gy erfolgte relativ zur Kontrolle eine Reduktion um 30% ( $p < 0,005$ ), mit 10 Gy um 43% ( $p < 0,005$ ) und mit 20 Gy um 46% ( $p < 0,005$ ). Damit wurde die  $ED_{50}$  mit 20 Gy nahezu erreicht.

### Fazit

Wie schon in der Proliferationsanalyse (BrdU-ELISA) ergab auch der Vitalitätstest (MTT-Assay) bestrahlter SLGC-Kulturen ein heterogenes Bild. So wurde die Vitalität bei zwei SLGC-Linien (T1440, T1452) durch steigende Strahlendosen nicht beeinflusst. Die übrigen SLGC-Linien zeigten nach Bestrahlung mit steigenden Dosen einen signifikanten Vitalitätsverlust, ohne dass die  $ED_{50}$  erreicht wurde. Für die signifikante Reduktion der Vitalität im Vergleich zur Kontrolle genügten

bei 2 SLGC-Linien 2 Gy (T1447, T1522). Höhere Dosen von 5 Gy waren bei T1389, von 10 Gy bei T1371 und T1442 erforderlich. Bei zwei SLGC-Linien (T1338, T1495) waren 20 Gy notwendig, um überhaupt eine signifikante Reduktion der Vitalität zu erzielen (Tab. 6).

**Tab. 6: Effektivdosis 50 (ED<sub>50</sub>) der Bestrahlung bei SLGC-Linien in BrdU-ELISA und MTT-Assay**

SLGC-Linie	ED <sub>50</sub> - BrdU-ELISA	ED <sub>50</sub> - MTT-Assay
<b>T1338</b>	≤ 2Gy	n.e.
<b>T1371</b>	≤ 10Gy	n.e.
<b>T1389</b>	20Gy	> 20 Gy
<b>T1440</b>	n.e.	n.e.
<b>T1442</b>	≤ 10Gy	n.e.
<b>T1447</b>	≤ 20Gy	n.e.
<b>T1452</b>	#	n.e.
<b>T1495</b>	≤ 10Gy	n.e.
<b>T1522</b>	≤ 2 Gy	> 20 Gy

ED<sub>50</sub> – BrdU-ELISA: erzielte Effektivdosis 50 durch die Bestrahlung von SLGC-Linien, gemessen im BrdU-ELISA; ED<sub>50</sub> – MTT-Assay: erzielte Effektivdosis 50 durch Bestrahlung von SLGC-Linien, gemessen im MTT-Assay. BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; ELISA: enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*); MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; ED<sub>50</sub>: Effektivdosis 50; Gy: Gray; T: Tumor; n.e.: nicht erreicht; #: T1452 konnte aufgrund fehlender bis geringer Haftung an der Matrix der 96-Lochplatten nicht mittels BrdU-ELISA untersucht werden.

#### 4.1.2. Effekte der Kombinationsbehandlung

In der GBM-Therapie wird routinemäßig eine adjuvante Radiochemotherapie eingesetzt. Es sollte daher untersucht werden, ob TMZ die Radiosensitivität von SLGCs fördern kann. Wie zuvor wurden die Effekte auf die Proliferation und die Vitalität untersucht.

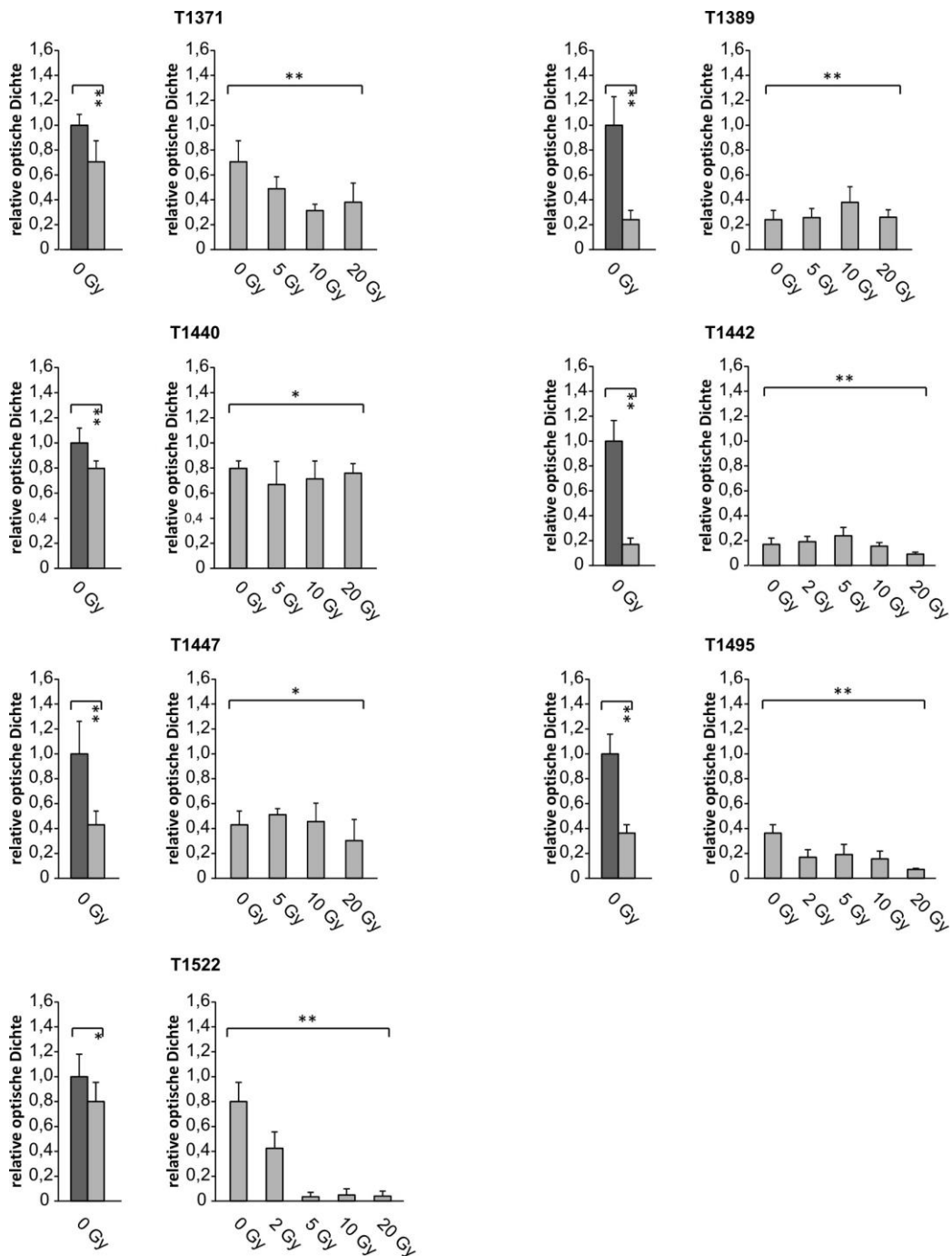
##### 4.1.2.1. Effekt auf die Proliferation

Um den Effekt von TMZ auf die Proliferation der bestrahlten SLGC-Linien zu untersuchen, wurden die TMZ-Konzentrationen so gewählt, dass eine 50%ige Reduktion der Proliferation mit TMZ allein annähernd erzielt wurde. Die SLGC-Linie T1338 wurde hier nicht weiter untersucht, da keine klare Dosiswirkungskurve mit aufsteigenden Strahlendosen zu generieren war (Abb. 6; Abb. 7).

Die Behandlung von unbestrahlten SLGC-Kulturen der Gliosarkomlinie **T1371** mit 200µM TMZ ( $\hat{=}$  T200) bewirkte eine signifikante Verminderung der OD um 30% ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 8, linker Graph). Dieser Effekt wurde durch die Bestrahlung weiter verstärkt (Abb. 8; Abb. 19, Anhang). In der ANOVA zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen ( $p < 0,005$ ; Abb. 8, rechter Graph). Im daraufhin durchgeführten t-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied zur alleinigen TMZ-Behandlung nach einer Doppelbehandlung mit 10 und 20 Gy ( $p < 0,05$ ; t-Test). Mit 10 Gy wurde relativ zum Ansatz T200/Gy0 eine

Reduktion der OD um 69% beobachtet. Eine Steigerung der Strahlendosis auf 20 Gy ergab jedoch keine weitere Senkung der OD (Reduktion um 62%). Bei 20 Gy waren die Werte nach alleiniger Bestrahlung jedoch nicht signifikant von der Doppelbehandlung verschieden ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 19, Anhang). Folglich wirkte die Kombinationsbehandlung bei T1371 bei niedrigen Strahlendosen bis 10 Gy signifikant besser als die alleinige chemotherapeutische Behandlung. Die Behandlung unbestrahlter T1371-Kulturen mit dem Lösungsmittel DMSO ergab keinen zytotoxischen Effekt (Abb. 17, Anhang).

Die Gabe von 200 $\mu$ M TMZ ( $\hat{=}$  T200) zu unbestrahlten Kulturen der Glioblastomlinie **T1389** bewirkte eine signifikante Verminderung des BrdU-Einbaus um 76% ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 8, linker Graph). Mit dem ANOVA-Test wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 8, rechter Graph). Die zusätzliche Bestrahlung mit 5 Gy und auch 20 Gy erbrachte keine signifikante Verstärkung des TMZ-Effektes im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung, d.h. die Werte von T200/Gy0, T200/Gy5 und T200/Gy20 waren nahezu identisch ( $p > 0,05$ ; t-Test). In Kombination von 200 $\mu$ M TMZ mit 10 Gy wurde sogar eine geringe, aber nicht signifikant höhere BrdU-Inkorporation als mit TMZ allein gemessen ( $p > 0,05$ ; t-Test). Damit konnte die zusätzliche Bestrahlung den TMZ-Effekt nicht steigern, umgekehrt dagegen schon. So unterschieden sich die Werte von T0/Gy5 und T200/Gy5 um das Dreifache voneinander ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 19, Anhang). Bei T0/Gy10 und T200/Gy10 sowie bei T0/Gy20 und T200/Gy20 war der Unterschied dagegen nicht mehr signifikant ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 19, Anhang). DMSO hatte keinen zytotoxischen Effekt auf unbestrahlte T1389-Kulturen (Abb. 17, Anhang). Insgesamt deuten die Experimente daraufhin, dass 200 $\mu$ M TMZ bei niedrigeren Strahlendosen eine zusätzliche proliferationshemmende Wirkung hatten.



**Abb. 8: Effekt steigender Strahlendosen in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). Analyse der Proliferation von SLGC-Linien.** - BrdU-ELISA. Die Bestrahlung erfolgte in parallelen Ansätzen (96-Lochplatten) mit 2, 5, 10 und 20 Gray (Gy). Eine 96-Lochplatte wurde nicht bestrahlt (0 Gy). Die eingesetzten TMZ-Konzentrationen betragen 50µM (T1440), 100µM (T1442, T1447, T1495, T1522), 200µM (T1371, T1389). DMSO (Dimethylsulfoxid) diente als Lösungsmittel für die hydrophobe Substanz TMZ. Der Einbau des Basenanalogons BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) in die DNA proliferierender Zellen wurde am Tag d5 mittels ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*; Enzym-gekoppelter Immunsorptionsstest) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 parallel untersuchten Proben und die Standardabweichung. Die relative optische Dichte in der unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbestrahlten DMSO-Kontrolle und der TMZ-Einfachbehandlung wurden mittels t-Test bestimmt (linker Graph). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den TMZ-behandelten und zusätzlich mit unterschiedlichen Dosen bestrahlten Ansätzen wurden mittels ANOVA ermittelt (rechter Graph). Die Signifikanzen wurden mit \*(p<0,05) und \*\*(p<0,005) gekennzeichnet. Dunkelgraue Balken: DMSO; hellgraue Balken: TMZ (Temozolomid). T: Tumor.

Die Gabe von 50µM TMZ ( $\hat{=}$  T50) zu Kulturen der Glioblastomlinie **T1440** führte zu einer signifikanten Reduktion der BrdU-Inkorporation um 20% relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 8, linker Graph). In der Analyse der mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen untereinander wurde mit dem ANOVA-Test ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,05$ ; Abb. 8, rechter Graph). Bei einer zusätzlichen Bestrahlung mit 5 Gy (T50/Gy0 *versus* T50/Gy5) war im gepaarten t-Test keine signifikante Änderung des Effektes auf die BrdU-Inkorporation zu beobachten ( $p > 0,05$ ). Auch die weitere Erhöhung der Strahlendosis bewirkte keinen zusätzlichen signifikanten Effekt. So waren die Ergebnisse für T50/Gy5, T50/Gy10 und T50/Gy20 nahezu identisch [T50/Gy5 (0,67); T50/Gy10 (0,71); T50/Gy20 (0,76)]. Umgekehrt hingegen war stets ein Unterschied zwischen der Kombinationsbehandlung und der korrespondierenden Probe der alleinigen Bestrahlung zu beobachten. So wurden ähnlich signifikante Unterschiede zwischen DMSO/Gy5 und T50/Gy5, zwischen DMSO/Gy10 und T50/Gy10 sowie zwischen DMSO/Gy20 und T50/Gy20 gemessen ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 19, Anhang). Insgesamt induzierten 50µM TMZ in T1440-Kulturen einen deutlichen Proliferations-inhibierenden Effekt, der aber durch die zusätzliche Bestrahlung nicht zu steigern war. Umgekehrt bewirkte die Bestrahlung allein keine Reduktion der Proliferation ( $ED_{50}$ -Proliferation nicht erreicht), so dass die antiproliferative Wirkung in der Koapplikation von TMZ und Bestrahlung hier allein auf der TMZ-Wirkung beruhte (Abb. 19, Anhang). DMSO hatte auf T1440 keinen zytotoxischen Effekt (Abb. 17, Anhang).

Die Behandlung mit 100µM TMZ ( $\hat{=}$  T100) reduzierte die Inkorporation von BrdU bei der Glioblastomlinie **T1442** signifikant um 83% relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 8, linker Graph). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde mit dem ANOVA-Test ein statistisch signifikanter Unterschied erhoben ( $p < 0,005$ ; Abb. 8, rechter Graph). Im daraufhin durchgeführten gepaarten t-Test zeigte sich, dass lediglich die zusätzliche Bestrahlung mit 20 Gy eine signifikante Änderung der durch TMZ allein induzierten Verminderung der OD bewirkte (zwischen T100/Gy0 und T100/Gy20:  $p = 0,003$ ). Die OD wurde durch die zusätzliche Bestrahlung um fast 50% im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung reduziert (Abb. 8). Kein signifikanter Unterschied zur alleinigen TMZ-Behandlung wurde bei zusätzlicher Bestrahlung mit 2, 5 und 10 Gy beobachtet (zwischen T100/Gy0 und T100/Gy2 bzw. T100/Gy5 und T100/Gy10 jeweils  $p > 0,05$ ; t-Test). In Abwesenheit von TMZ war dagegen ein deutlicher Dosiswirkungseffekt der Bestrahlung erkennbar (dunkelgraue Balken Abb. 19 - T1442,  $ED_{50}$ -Proliferation zwischen 5 und 10 Gy). Insgesamt zeigte sich, dass die reduzierenden Effekte der alleinigen TMZ-Behandlung nur durch die Bestrahlung mit 20 Gy signifikant verstärkt wurden. Umgekehrt unterstützte TMZ in allen Ansätzen die Wirkung der Bestrahlung, wobei dies bei niedrigen Strahlendosen (2 Gy, 5 Gy)

effizienter war ( $ED_{50}$ -Proliferation in Anwesenheit von TMZ zwischen 5 und 10 Gy). DMSO hatte einen geringen zytotoxischen Effekt auf T1442, der jedoch nicht signifikant war (Abb. 17, Anhang).

Mit 100 $\mu$ M TMZ ( $\hat{=}$  T100) wurde in den unbestrahlten Proben der Gliosarkomlinie **T1447** eine signifikante Reduktion der BrdU-Inkorporation um 58% relativ zur DMSO-Kontrolle erreicht ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 8, linker Graph). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde in der ANOVA ebenfalls ein signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,05$ ; Abb. 8, rechter Graph). Im daraufhin durchgeführten gepaarten t-Test wurde jedoch bei zusätzlicher Bestrahlung mit 5 oder 10 Gy im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung keine statistische Signifikanz erhoben ( $p > 0,05$ ). Die OD lag im Vergleich zu T100/Gy0 im Bereich eines Mittelwertes von 0,4 (T100/Gy0:  $0,4 \pm 0,1$ ; T100/Gy5:  $0,5 \pm 0,1$ ; T100/Gy10:  $0,5 \pm 0,2$ ). Dagegen hatte die Doppelbehandlung mit 100 $\mu$ M TMZ und 20 Gy eine geringe Reduktion der relativen OD im Vergleich zu T100/Gy0 zur Folge, die jedoch nicht signifikant war ( $p > 0,05$ ). Ebenso bestand zwischen den Messwerten T0/Gy10 und T100/Gy10 bzw. T0/Gy20 und T100/Gy20 kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ; Abb. 19, Anhang). Somit konnte TMZ den antiproliferativen Effekt höherer Strahlendosen (10 und 20 Gy;  $ED_{50}$ -Proliferation zwischen 10 und 20 Gy) nicht weiter steigern, während bei geringen Strahlendosen bzw. unbestrahlten Proben der Proliferations-reduzierende Effekt verstärkt wurde. DMSO hatte keinen erkennbaren zytotoxischen Effekt (Abb. 17, Anhang).

Die Behandlung von Kulturen der Glioblastomlinie **T1495** mit 100 $\mu$ M TMZ verminderte den BrdU-Einbau im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant um 64% ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 8, linker Graph). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde mit der ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 8, rechter Graph). Im daraufhin durchgeführten t-Test wurde bei zusätzlicher Bestrahlung mit 2, 5, 10 und 20 Gy jeweils im Vergleich zur allein mit TMZ behandelten Probe ein signifikanter Unterschied berechnet ( $p < 0,005$  für 2, 10 und 20 Gy;  $p < 0,05$  für 5 Gy). Die zusätzliche Bestrahlung verstärkte folglich bereits den mit TMZ allein beobachteten Effekt, wobei mit den ansteigenden Strahlendosen ein ähnliches Ergebnis erreicht wurde (T100/Gy2:  $0,2 \pm 0,1$ ; T100/Gy5:  $0,2 \pm 0,1$ ; T100/Gy10:  $0,2 \pm 0,1$ ). Mit 20 Gy wurde in Anwesenheit von TMZ eine weitere Senkung der BrdU-Inkorporation auf 7% des Wertes der DMSO-Kontrolle beobachtet. Dabei unterschieden sich die Werte für T0/Gy20 und T100/Gy20 nur geringfügig, aber signifikant voneinander ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 19, Anhang). TMZ bewirkte folglich bei allen Strahlendosen eine zusätzliche Verminderung des BrdU-Einbaus, wobei dieser nur bei geringen Strahlendosen sehr deutlich war. DMSO zeigte keinen zytotoxischen Effekt (Abb. 17, Anhang).

Die Gabe von 100µM TMZ ( $\hat{=}$  T100) zu Kulturen der Glioblastomlinie **T1522** führte zu einer signifikanten Reduktion des BrdU-Einbaus um 20% relativ zur DMSO-Kontrolle ( $p < 0,05$ ; t-Test; Abb. 8, linker Graph). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde mit dem ANOVA-Test ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 8, rechter Graph). Der daraufhin durchgeführte t-Test erbrachte den Nachweis einer vorliegenden Signifikanz zwischen jeder der mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen und der alleinigen TMZ-Behandlung ( $p < 0,005$ ). Bereits mit einer zusätzlichen Bestrahlung von 2 Gy zur TMZ-Behandlung betrug die Reduktion der OD 55%, mit einer Bestrahlung von 5 Gy wurde eine Senkung um 89% relativ zur DMSO-Kontrolle erzielt. Dieser Effekt konnte durch eine weitere Erhöhung der Strahlendosis nicht gesteigert werden. Wurden in einem zusätzlichen t-Test die korrespondierenden Behandlungsgruppen untersucht, ergaben sich dagegen keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$  für DMSO/2Gy und T100/2Gy, DMSO/5Gy und T100/5Gy, DMSO/10Gy und T100/10Gy sowie DMSO/20Gy und T100/20Gy; Abb. 19, Anhang). Die Bestrahlung allein hatte bei T1522-Kulturen bereits einen drastischen, reduzierenden Effekt ( $ED_{50}$ -Proliferation 2 Gy), der durch die zusätzliche Behandlung mit TMZ nicht gesteigert werden konnte. Damit entsprach die Reduktion der OD nach der Doppelbehandlung exakt derjenigen nach alleiniger Bestrahlung (Abb. 6, Abb. 8). DMSO wirkte nicht zytotoxisch auf T1522 (Abb. 17, Anhang).

### Fazit

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit Ausnahme von zwei SLGC-Linien (T1440, T1522) TMZ in allen weiteren SLGC-Linien die reduzierenden Effekte der Bestrahlung auf die Proliferation verstärken konnte, wobei dies primär bei niedrigen Strahlendosen evident war (Tab. 7). Bei vier SLGC-Linien (T1371, T1442, T1447 und T1495) lagen die Werte für die Kombinationsbehandlung mit TMZ und Bestrahlung deutlich unter denen für TMZ allein. Bei zwei Linien (T1389, T1440) waren die Werte für TMZ und für doppelt behandelte Proben nahezu identisch. Bei einer SLGC-Linie (T1522) waren die Effekte bereits mit 2 Gy so stark, dass TMZ keine zusätzlich fördernde Wirkung auf die Senkung der Proliferation hatte. Der Vorteil der Doppelbehandlung gegenüber der alleinigen Bestrahlung war somit bei vier SLGC-Linien evident. Allerdings waren die Unterschiede bei drei dieser SLGC-Linien (T1371, T1447 und T1495) nur mit Dosen  $\leq 10$ Gy signifikant (Tab. 7).

**Tab. 7: Effekte der Doppelbehandlung mit TMZ und ionisierender Strahlung auf die Proliferation von Gliomzellen**

SLGC-Linie	Bestrahlung ED <sub>50</sub>	Zytotoxischer Effekt von DMSO	Reduktion der Proliferation mit TMZ (0 Gy)	Steigerung des Effektes von TMZ [relativ zu Gy allein]	Steigerung des Effektes von Gy [relativ zu TMZ allein]
<b>T1371</b>	≤10 Gy	nein	200µM / 30%±15	ja (5Gy)	ja (bis 10Gy)
<b>T1389</b>	20 Gy	nein	200µM / 76%±10	nein	ja (bis 5Gy)
<b>T1440</b>	n.e.	nein	50µM / 20%±5	Sonderfall	Sonderfall
<b>T1442</b>	≤10 Gy	nein	100µM / 80%±7	ja ( bis 5Gy)	ja (20Gy)
<b>T1447</b>	≤20 Gy	nein	100µM / 60%±15	nein	ja (bis 5Gy)
<b>T1452</b>	#	#	#	#	#
<b>T1495</b>	≤10 Gy	nein	100µM / 64%±5	ja (bis 2 Gy)	ja (bis 20Gy)
<b>T1522</b>	≤2 Gy	nein	100µM / 23%±20	Sonderfall	Sonderfall

# T1452 konnte aufgrund fehlender bis geringer Haftung an der Matrix der 96-Lochplatten nicht mittels BrdU-ELISA untersucht werden. Sonderfall T1440: Die Zelllinie erwies sich als radioresistent, so dass der Effekt allein auf TMZ beruhte. Sonderfall T1522: Die Effekte waren mit 2 Gy so stark, dass TMZ keine fördernde Wirkung auf die Senkung der Proliferation hatte. ED<sub>50</sub>: Effektivdosis 50; n.e.: nicht erreicht; DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; TMZ: Temozolomid; T:Tumor.

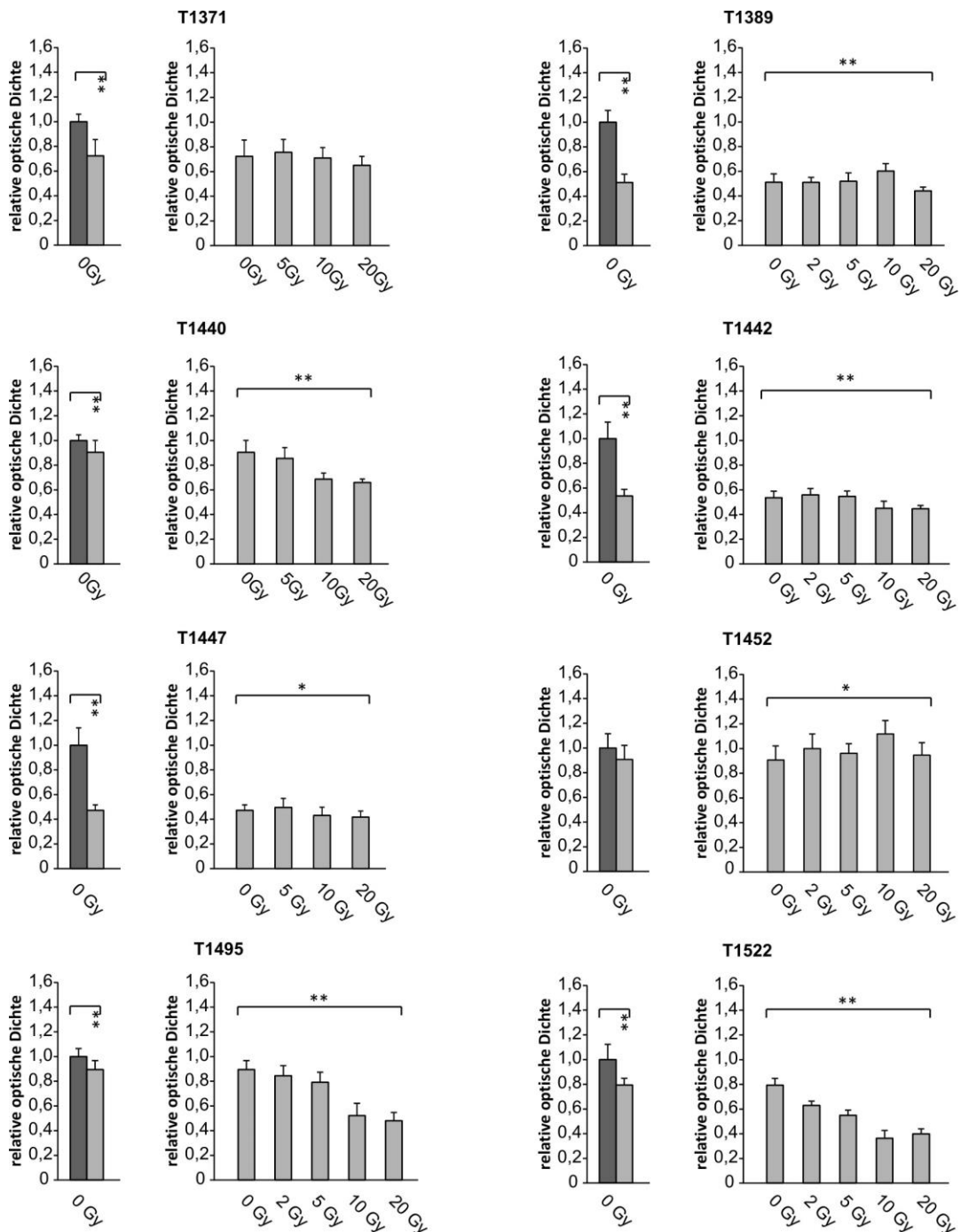
#### 4.1.2.2. Effekt auf die Vitalität

Die Experimente zur Änderung der Vitalität durch die Bestrahlung allein ergaben bei zwei SLGC-Linien keine und bei sieben SLGC-Linien moderate Effekte (s. Kapitel 4.1.1.2; Tab. 8). Hier wurde nun geprüft, ob TMZ einen Einfluss auf die Vitalität hatte und ob die nach Bestrahlung detektierten Effekte durch TMZ moduliert werden konnten. DMSO, das als Lösungsmittel für TMZ diente, zeigte nur bei vier SLGC-Linien einen geringen, messbaren Effekt (Abb. 20, Anhang).

Bei der Gliosarkomlinie **T1371** wurde zwischen der DMSO-Kontrolle und der mit TMZ behandelten Probe (200µM TMZ  $\hat{=}$  T200) ohne Bestrahlung eine signifikante Reduktion um 28% beobachtet ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 9, linker Graph). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen war jedoch in der ANOVA kein statistisch signifikanter Unterschied erkennbar ( $p > 0,05$ ; Abb. 9, rechter Graph). Somit reduzierten 200µM TMZ die Vitalität der Zellen deutlich, ohne dass dieser Effekt durch die Bestrahlung mit steigenden Strahlendosen weiter verstärkt werden konnte. Allerdings waren die ODs nach der Doppelbehandlung mit TMZ und Bestrahlung stets signifikant niedriger als die nach der korrespondierenden alleinigen Bestrahlung ( $p < 0,005$  für 5 und 10 Gy;  $p < 0,05$  für 20 Gy; t-Test; Abb. 22, Anhang). Die Unterschiede der ODs waren dabei mit niedrigen Strahlendosen größer. Die Differenz der relativen OD zwischen T0/Gy5 und T200/Gy5 betrug 0,25, während sie zwischen T0/Gy20 und T200/Gy20 nur noch bei 0,13 lag. Folglich konnten 200µM TMZ die Wirkung der Bestrahlung, insbesondere bei niedrigen Strahlendosen, verstärken.

Umgekehrt konnte die Wirkung des TMZ durch die zusätzliche Bestrahlung nicht beeinflusst werden.

Bei der Glioblastomlinie **T1389** wurde mit 200 $\mu$ M TMZ ( $\hat{=}$  T200) die relative OD der Zellen deutlich reduziert, wobei die statistisch signifikante Reduktion in den unbestrahlten Proben 50% der DMSO-Kontrolle betrug ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 9, linker Graph). Die Analyse der mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen untereinander ergab in der ANOVA einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,005$ ; Abb. 9, rechter Graph). Der reduzierende Effekt des TMZ änderte sich jedoch in Kombination mit steigenden Strahlendosen kaum, was sich auch im gepaarten t-Test widerspiegelte. Die zusätzliche Bestrahlung mit 2 und 5 Gy erbrachte keine statistisch signifikante Reduktion im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung ( $p > 0,05$ ). Ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg der OD wurde nach einer zusätzlichen Bestrahlung mit 10 Gy im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung beobachtet ( $p > 0,05$ ). Dieser wurde in weiteren Experimenten nicht bestätigt und basiert vermutlich auf der bereits angesprochenen Problematik der Dissoziation von Spheroidkulturen. Lediglich die zusätzliche Bestrahlung mit 20 Gy erbrachte im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung eine geringfügige, aber statistisch signifikante Reduktion der relativen OD (T200/Gy20: Reduktion um 14%;  $p < 0,05$ ). Das bedeutet, dass die Bestrahlung nur bei einer hohen Strahlendosis einen geringfügigen zusätzlichen Reduktions-fördernden Effekt hatte. Mit steigenden Strahlendosen nahm die Differenz zwischen der alleinigen Bestrahlung und der Doppelbehandlung ab (Abb. 22, Anhang). Beispielsweise lag die Differenz der relativen OD zwischen T0/Gy2 und T200/Gy2 bei 0,4, während sie zwischen T0/Gy10 und T200/Gy10 nur noch 0,1 betrug. Daher kann geschlussfolgert werden, dass TMZ primär bei niedrigen Strahlendosen einen zusätzlichen Effekt auf die Reduktion der Vitalität ausübte.



**Abb. 9: Effekt steigender Strahlendosen in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). Analyse der Vitalität von SLGC-Linien.- MTT-Assay.** Die Bestrahlung erfolgte in parallelen Ansätzen (96-Lochplatten) mit 2, 5, 10 und 20 Gray (Gy). Eine 96-Lochplatte wurde nicht bestrahlt (0 Gy). Die eingesetzten TMZ-Konzentrationen betragen 50μM (T1440), 100μM (T1442, T1447, T1495, T1522), 200μM (T1371, T1389). DMSO (Dimethylsulfoxid) diente als Lösungsmittel für die hydrophobe Substanz TMZ. Die Umwandlung des Farbstoffes MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] in ein blauviolettetes Formazan wurde am Tag d5 mittels des MTT-Assays bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 parallel untersuchten Proben und die Standardabweichung. Die relative optische Dichte in der unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbestrahlten DMSO-Kontrolle und der TMZ-Einfachbehandlung wurden mittels t-Test bestimmt (linker Graph). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den TMZ-behandelten und zusätzlich mit unterschiedlichen Dosen bestrahlten Ansätzen wurden mittels ANOVA ermittelt (rechter Graph). Die Signifikanzen wurden mit \* (p<0,05) und \*\* (p<0,005) gekennzeichnet. Dunkelgraue Balken: DMSO; hellgraue Balken: TMZ (Temozolomid). T: Tumor.

Für die Glioblastomlinie **T1440** wurde nach alleiniger Behandlung mit 50 $\mu$ M TMZ ( $\hat{=}$  T50) eine signifikante Reduktion der OD um 10% relativ zur DMSO-Kontrolle festgestellt ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 9, linker Graph). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde in der ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 9, rechter Graph). Im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung wurde bei zusätzlicher Bestrahlung mit steigenden Strahlendosen eine Reduktion der OD beobachtet. Die zusätzliche Bestrahlung mit 5 Gy führte bereits zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Senkung der OD im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung ( $p > 0,05$ ; t-Test). Eine statistisch signifikante Reduktion der OD wurde sowohl für die Kombinationen T50/Gy10 und T50/Gy20 zu T50/Gy0 beobachtet (T50/Gy10: Reduktion um 32%; T50/Gy20: Reduktion um 34%;  $p < 0,005$ ; t-Test). Im Vergleich des Effektes der Doppelbehandlung von TMZ und Bestrahlung relativ zur korrespondierenden alleinigen Bestrahlung lag bei allen Kombinationen der Wert für die Bestrahlung allein stets signifikant über dem der Doppelbehandlung ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 22, Anhang). Im Gegensatz zu anderen SLGC-Linien (z.B. T1371 und T1389) wurden diese Differenzen mit steigenden Strahlendosen jedoch nicht geringer. Somit konnte TMZ den nur gering ausgeprägten reduzierenden Effekt der alleinigen Bestrahlung ( $ED_{50}$ -Vitalität nicht erreicht) deutlich verstärken und folglich konnte die Doppelbehandlung die Vitalität besser reduzieren als die alleinige Bestrahlung.

Nach Gabe von 100 $\mu$ M TMZ ( $\hat{=}$  T100) allein wurde die OD der Glioblastomlinie **T1442** im Vergleich zur Kontrolle bereits um 47% reduziert ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 9, linker Graph). Die zusätzliche Bestrahlung änderte daran nur wenig, obwohl in der ANOVA zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt wurde ( $p < 0,005$ ; Abb. 9, rechter Graph). Dieser Unterschied resultierte daraus, dass die Werte der OD für die Ansätze T100/Gy10 bzw. T100/Gy20 geringfügig, aber statistisch signifikant niedriger als die der T100/Gy0-Probe waren ( $p < 0,05$ ; t-Test). Im Vergleich des Effektes der Doppelbehandlung von TMZ und Bestrahlung relativ zur korrespondierenden alleinigen Bestrahlung mittels t-Test wurde für alle untersuchten Strahlendosen ein signifikanter Unterschied beobachtet ( $p < 0,005$ ; Abb. 22, Anhang). Relativ zur alleinigen Bestrahlung konnte somit der reduzierende Effekt mit TMZ deutlich verstärkt werden. Dabei war der Effekt bei niedrigen Strahlendosen größer als bei höheren. So betrug die Differenz der relativen OD zwischen T0/Gy2 und T100/Gy2 0,4, während der Unterschied zwischen T0/Gy200 und T100/Gy200 nur noch bei 0,2 lag. Im Vergleich zur alleinigen TMZ-Gabe konnte die Doppelbehandlung jedoch nur bei hohen Strahlendosen eine geringe Verstärkung des die Vitalität reduzierenden Effektes bewirken.

Bei der Gliosarkomlinie **T1447** wurde die relative OD nach einer Behandlung mit 100 $\mu$ M TMZ ( $\hat{=}$  T100) relativ zur DMSO-Kontrolle signifikant um 53% reduziert ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 9, linker

Graph). Zwischen den einzelnen mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde mit dem ANOVA-Test ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,05$ ; Abb. 9, rechter Graph). Im daraufhin durchgeführten gepaarten t-Test zeigte sich jedoch zwischen T100/Gy0 und T100/Gy5, T100/Gy10 sowie T100/Gy20 kein signifikanter Unterschied. Die relative OD blieb im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung trotz steigender Strahlendosen ähnlich (T100/Gy 5: 0,49; T100/Gy10: 0,43; T100/Gy20: 0,41). Relativ zur Bestrahlung allein nahm der reduzierende Effekt der zusätzlichen TMZ-Behandlung bei 5, 10 und 20 Gy stetig ab (Abb. 22, Anhang). Während die Differenz zwischen T0/Gy5 und T100/Gy5 0,5 betrug, lag der Wert zwischen T0/Gy20 und T100/Gy20 noch bei 0,4. Somit war der die Vitalität reduzierende Effekt von TMZ ohne Bestrahlung bzw. bei niedrigen Strahlendosen am größten. Bezogen auf die Behandlung mit TMZ allein verminderte die zusätzliche Bestrahlung die Vitalität zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Bei der sphärisch wachsenden Glioblastomlinie **T1452** wurde die  $ED_{50}$  durch die alleinige Bestrahlung nicht erreicht und selbst Strahlendosen von 20 Gy bewirkten keine signifikante Reduktion der OD (Abb. 7). Auch die Einzelbehandlung mit  $100\mu\text{M}$  TMZ ( $\hat{=}$  T100) reduzierte die OD nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 9, linker Graph). Unabhängig von der Strahlendosis wurden nach den Doppelbehandlungen keine signifikanten Unterschiede zur DMSO-Kontrolle bzw. zur alleinigen TMZ-Behandlung beobachtet. Der in der ANOVA ermittelte statistisch signifikante Unterschied zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen ( $p < 0,05$ ) ist auf einen im gepaarten t-Test nachgewiesenen signifikanten Anstieg der relativen OD bei T100/Gy10 im Vergleich zu T100/Gy0 zurückzuführen ( $p < 0,005$ ; Abb. 9). Folglich erwies sich die sphärische SLGC-Linie T1452 als strahlen- und TMZ-resistent.

Bei der Glioblastomlinie **T1495** führte die Gabe von  $100\mu\text{M}$  TMZ ( $\hat{=}$  T100) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu einer geringen, aber signifikanten Reduktion der relativen OD um 11% ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 9, linker Graph). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde in der ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 9, rechter Graph). Im daraufhin durchgeführten t-Test wurde nach zusätzlicher Bestrahlung mit 2 Gy noch keine statistische Signifikanz im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung errechnet ( $p > 0,05$ ). Erst ab einer Strahlendosis von 5 Gy wurde in der Kombinationsbehandlung ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung beobachtet ( $p < 0,05$ ; t-Test), der bei T100/Gy10 und T100/Gy20 zunahm ( $p < 0,005$ ; t-Test). Folglich verstärkte die Bestrahlung die Wirkung des TMZ mit steigender Strahlendosis. Die Gabe von  $100\mu\text{M}$  TMZ führte in Kombination mit allen untersuchten Strahlendosen zu einem signifikanten Unterschied der ODs relativ zur alleinigen Bestrahlung ( $p < 0,005$ ; Abb. 22, Anhang). Die größte Differenz der relativen OD zwischen alleiniger Bestrahlung und der TMZ/Gy-Doppelbehandlung wurde bei 10 Gy (0,4) gemessen. Die Differenz der relativen

OD zwischen T0/Gy20 und T100/Gy20 betrug 0,2, bei niedrigeren Strahlendosen (2 Gy bzw. 5 Gy) war sie noch etwas geringer. Damit wurde die Vitalitäts-senkende Wirkung in allen Ansätzen durch 100 $\mu$ M TMZ verstärkt, wobei der Vorteil der Doppelbehandlung bei höheren Strahlendosen deutlicher war.

Die Applikation von 100 $\mu$ M TMZ ( $\hat{=}$  T100) allein führte bei der Glioblastomlinie **T1522** im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion der relativen optischen Dichte um 20% ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 9, linker Graph). Mithilfe des ANOVA-Tests wurde zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 9, rechter Graph). Der daraufhin durchgeführte gepaarte t-Test erbrachte sowohl zwischen der alleinigen TMZ-Behandlung als auch der DMSO-Kontrolle und den Ansätzen mit zusätzlicher Bestrahlung signifikante Unterschiede ( $p < 0,005$ ). Bei zusätzlicher Bestrahlung mit 2 und 5 Gy wurde ein weiterer reduzierender Effekt des TMZ beobachtet (Abb. 22, Anhang). So betrug die Reduktion der OD relativ zur alleinigen Bestrahlung bei T100/Gy2 17% und bei T100/Gy5 8% ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 22, Anhang). Ab einer Strahlendosis von 10 Gy wurde kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den ODs nach alleiniger Bestrahlung und nach den Doppelbehandlungen beobachtet ( $p > 0,05$ , Abb. 22, Anhang). Folglich zeigte TMZ bei T1522-Kulturen bei niedrigen, nicht aber bei hohen Strahlendosen einen zusätzlichen Vitalitäts-reduzierenden Effekt.

### Fazit

Zusammenfassend ist festzustellen, dass im Fall der sphärischen SLGC-Linie T1452 eine ausgeprägte Radio- und TMZ-Resistenz vorlag, die auch nach der Doppelbehandlung auftrat. In allen übrigen SLGC-Linien erbrachte die Behandlung mit TMZ allein eine Verminderung der Vitalität, die aber nur in vier (T1440, T1442, T1495, T1522) von acht Fällen durch die zusätzliche Bestrahlung signifikant gesenkt wurde (Tab. 8). Umgekehrt konnte, insbesondere bei niedrigen Strahlendosen, die Reduktion der Vitalität durch TMZ verstärkt werden (Tab. 8).

**Tab. 8: Effekt der Doppelbehandlung mit TMZ und ionisierender Strahlung auf die Vitalität von Gliomzellen**

SLGC-Linie	Bestrahlung ED <sub>50</sub>	Reduktion der Vitalität mit TMZ (0 Gy)	Steigerung des Effektes von TMZ [relativ zu Gy allein]	Steigerung des Effektes von Gy [relativ zu TMZ allein]
T1371	n.e.	100µM / 28%±20	nein	ja (bis 10Gy)
T1389	>20Gy	200µM / 50%±5	nein	ja (bis 5Gy)
T1440	n.e.	50µM / 10%±10	ja (10/20Gy)	ja (bis 20Gy)
T1442	n.e.	100µM / 50%±5	ja (10/20Gy)	ja (bis 10Gy)
T1447	n.e.	100µM / 52%±5	nein	ja (bis 5Gy)
T1452	n.e.	100µM / 0%±10	nein	nein
T1495	n.e.	100µM / 0%±5	ja (bis 20Gy)	ja (bis 20Gy)
T1522	>20Gy	100µM / 23%±5	ja (bis 10Gy)	ja (bis 5Gy)

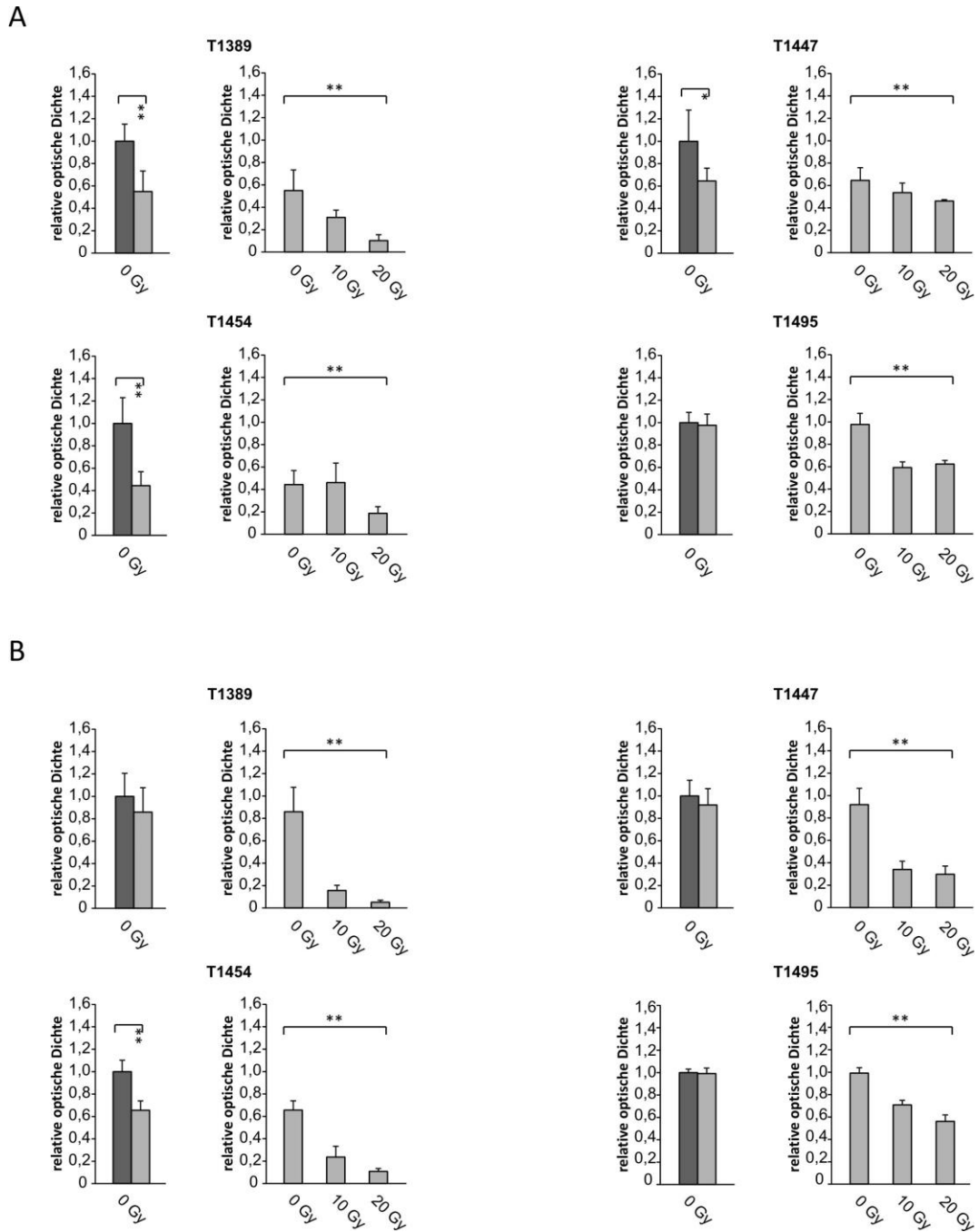
ED<sub>50</sub>: Effektivdosis 50; n.e.: nicht erreicht; DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; TMZ: Temozolomid; T: Tumor.

## 4.2. Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Gabe

Um zu untersuchen, ob eine Änderung der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Zugabe einen Effekt auf die Sensitivität von SLGC-Linien gegenüber der Behandlung hat, wurden einige der untersuchten SLGC-Linien nach verschiedenen Behandlungsregimen behandelt. Diese werden nachfolgend als Regime A und Regime B bezeichnet. Dabei wurden die Zellen einmalig mit 10 oder 20 Gy bestrahlt und dieselben TMZ-Konzentrationen wie in Kapitel 4.1.2 eingesetzt. Regime A steht für eine zeitgleiche Behandlung, d.h. das TMZ wurde direkt nach der Bestrahlung zugegeben. Regime B unterscheidet sich von Regime A dadurch, dass das TMZ erst 24 Stunden nach der Bestrahlung appliziert wurde (Abb. 2, Kapitel 3.2). Untersucht wurden wiederum die Proliferation (BrdU-ELISA) und die Vitalität (MTT- und LDH-Assay). Darüber hinaus wurde mit Hilfe der Western Blot-Methode die Expression des DNA-Reparaturenzyms PARP-1 bestimmt. Des Weiteren wurden die Auswirkungen der Behandlung auf den Zellzyklus sowohl über die Interkalierung von Propidium-iodid (PI) mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht als auch mittels Western Blot-Analysen die Expression der Zellzyklusinhibitoren p21<sup>Cip1/WAF1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> bestimmt. Alle Werte wurden stets gegen die unbestrahlte DMSO-Kontrolle normalisiert.

### 4.2.1. Effekt auf die Proliferation

Mittels BrdU-ELISA wurden die Auswirkungen der unterschiedlichen Behandlungsregime auf die Proliferation von drei Glioblastom-abgeleiteten und einer Gliosarkom-abgeleiteten SLGC-Linie untersucht (Abb. 10).



**Abb. 10: Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Proliferation von SLGC-Linien. – BrdU-ELISA. (A):** Zeitgleiche Behandlung mit ionisierender Strahlung und TMZ. (B): Zugabe von TMZ 24h nach der Bestrahlung. Die Bestrahlung erfolgte in parallelen Ansätzen (96-Lochplatten) mit 10 und 20 Gray (Gy). Eine 96-Lochplatte wurde nicht bestrahlt (0 Gy). Die TMZ-Konzentrationen betragen 50 $\mu$ M (T1495), 100 $\mu$ M (T1447) und 200 $\mu$ M (T1389, T1454). DMSO (Dimethylsulfoxid) diente als Lösungsmittel für die hydrophobe Substanz TMZ. Der Einbau des Basenanalogons BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) in die DNA proliferierender Zellen wurde am Tag d4 (A) bzw. Tag d5 (B) mittels ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*; Enzym-gekoppelter Immunsorptionsstest) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 parallel untersuchten Proben und die Standardabweichung. Die relative optische Dichte in der unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbestrahlten DMSO-Kontrolle und der TMZ-Einfachbehandlung wurden mittels t-Test bestimmt (linker Graph). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den TMZ-behandelten und zusätzlich mit unterschiedlichen Dosen bestrahlten Ansätzen wurden mittels ANOVA ermittelt (rechter Graph). Die Signifikanzen wurden mit \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,005$ ) gekennzeichnet. Dunkelgraue Balken: DMSO; hellgraue Balken: TMZ (Temozolomid). T: Tumor.

Bei der Glioblastomlinie **T1389** führte die alleinige Behandlung mit 200 $\mu$ M TMZ im zeitgleichen Ansatz (Regime A) relativ zur DMSO-Kontrolle zu einer signifikanten Verminderung der BrdU-Inkorporation um 45% ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 10 A, linker Graph). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde in der ANOVA ein signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 10 A, rechter Graph). Bei gleichzeitiger Bestrahlung mit 10 und 20 Gy wurden für die TMZ-Behandlung signifikant niedrigere ODs gemessen, sowohl im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung (t-Test; Abb. 24 A, Anhang) als auch im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle ergab sich bei T200/Gy10 eine Verminderung um 70% ( $p < 0,005$ ; t-Test), für T200/Gy20 um 90% ( $p < 0,005$ ; t-Test). Erfolgte die TMZ-Gabe 24h nach der Bestrahlung (Regime B), war die Reduktion des BrdU-Einbaus bereits in den bestrahlten Ansätzen nachvollziehbar deutlich höher (Abb. 10 B), da die Messung einen Tag später als bei Regime A stattfand (Abb. 2, Kapitel 3.2). Während bei Regime B zwischen der DMSO-Kontrolle und der alleinigen TMZ-Behandlung kein signifikanter Unterschied erkennbar war (Abb. 10 B, linker Graph), wurde in der ANOVA zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen ( $p < 0,005$ ; Abb. 10 B, rechter Graph). Im daraufhin durchgeführten gepaarten t-Test wurde sowohl zwischen T200/Gy0 und T200/Gy10 als auch zwischen T200/G0 und T200/Gy20 bestätigt, dass die Reduktion der relativen OD signifikant war ( $p < 0,005$ ; Abb. 24 B, Anhang). Relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde unter Regime B für 10 Gy eine Verminderung um 85% ( $p < 0,005$ ; t-Test), für 20 Gy um 95% ( $p < 0,005$ ; t-Test) festgestellt. Betrachtet man die Unterschiede zwischen den ODs für die alleinige Bestrahlung im Vergleich zur Doppelbehandlung, zeigte sich, dass die Differenz zwischen den ODs größer war, wenn die Ansätze zeitgleich mit ionisierender Strahlung und TMZ behandelt wurden (Abb. 23 A). So betrug die Differenz der relativen ODs bei Regime A zwischen T0/Gy10 und T200/Gy10 0,3 ( $p < 0,005$ ; Reduktion um 50% durch zusätzliche Gabe von TMZ) und zwischen T0/Gy20 und T200/Gy20 0,03 ( $p > 0,05$ ; Reduktion um 23% durch zusätzliche Gabe von TMZ). Regime B erbrachte zwischen T0/Gy10(24h) und T200/Gy10(24h) eine signifikante Differenz von 0,07 ( $p < 0,005$ ; Reduktion um 30% durch zusätzliche Gabe von TMZ), während bei 20 Gy kein signifikanter Unterschied zwischen T0/Gy20(24h) und T200/Gy20(24h) zu beobachten war ( $p > 0,05$ ; Abb. 23 B). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass ein zusätzlicher Effekt von TMZ auf eine strahleninduzierte Reduktion der Proliferation effizienter ist, wenn eine zeitgleiche Behandlung erfolgte. Umgekehrt schien jedoch der zusätzliche Effekt der Bestrahlung auf die durch TMZ-induzierte Reduktion der Proliferation effizienter, wenn eine zeitversetzte Behandlung erfolgte.

Bei der Gliosarkomlinie **T1447** führte die alleinige Behandlung mit 100 $\mu$ M TMZ im zeitgleichen Behandlungsansatz (Regime A) zu einer signifikanten Reduktion der BrdU-Inkorporation um 35% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ( $p < 0,05$ ; t-Test; Abb. 10 A, linker Graph), im zeitversetzten Ansatz

(Regime B) lediglich zu einer Verminderung um 9%, die nicht signifikant war ( $p > 0,05$ ; Abb. 10 B, linker Graph). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde bei Regime A in der ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 10 A, rechter Graph). Bei gleichzeitiger Bestrahlung mit 10 und 20 Gy wurden für die TMZ-Behandlung signifikant niedrigere ODs im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung gemessen ( $p < 0,05$ ; t-Test), wobei der Unterschied zwischen 10 und 20 Gy jedoch nicht signifikant war ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 24 A, Anhang). Relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle ergab sich bei T100/Gy10 eine Verminderung um 47%, für T100/Gy20 um 54%. Erfolgte die TMZ-Gabe 24h nach der Bestrahlung, war die Reduktion des BrdU-Einbaus bereits in den bestrahlten Ansätzen aufgrund der methodenbedingten zeitversetzten Messung deutlich stärker (Abb. 2, Kapitel 3.2; Abb. 10 B). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde in der ANOVA ein signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 10 B, rechter Graph). Im daraufhin durchgeführten t-Test wurde sowohl zwischen T100/Gy0 und T100/Gy10 als auch T100/Gy0 und T100/Gy20 ein signifikanter Unterschied berechnet ( $p < 0,005$ ; Abb. 24 B, Anhang). Relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde bei Regime B für 10 Gy eine Verminderung um 64%, für 20 Gy um 71% festgestellt (Abb. 24 B, Anhang). Betrachtet man die Unterschiede zwischen den ODs für die alleinige Bestrahlung im Vergleich zur Doppelbehandlung, war mit 10 Gy weder im zeitversetzt doppelt behandelten Ansatz noch bei zeitgleicher Behandlung eine signifikante Differenz zwischen den ODs erkennbar (Abb. 23, Anhang). Zwischen T0/Gy20 und T100/Gy20 (Regime A) betrug die TMZ-vermittelte signifikante Reduktion 20% ( $p > 0,005$ , t-Test). Regime B erbrachte jedoch zwischen T0/Gy20(24h) und T100/Gy20(24h) keine signifikante Differenz. Folglich ergab sich aus diesen Ergebnissen bei der SLGC-Linie T1447 kein sicherer Vorteil für ein Behandlungsregime.

Bei der Glioblastomlinie **T1454** führte die alleinige Behandlung mit 200 $\mu$ M TMZ nach Behandlungsregime A im Vergleich zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle zu einer signifikanten Verminderung der BrdU-Inkorporation um 56% ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 10 A, linker Graph), bei Regime B zu einer signifikanten Reduktion um 35% ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 10 B, linker Graph). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde bei Regime A in der ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 10 A, rechter Graph). Im daraufhin durchgeführten gepaarten t-Test wurde bei gleichzeitiger Bestrahlung mit 20 Gy ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung berechnet ( $p < 0,05$ ; Abb. 24 A, Anhang). Relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle ergab sich bei T200/Gy20 eine Verminderung um 82% (Regime A). Erfolgte die Behandlung gemäß Regime B, war die Reduktion des BrdU-Einbaus bereits in den bestrahlten Ansätzen deutlich stärker (Abb. 10 B), was zumindest teilweise daran lag, dass die Messung aufgrund der zeitversetzten Zugabe des TMZ einen Tag später stattfand (Abb. 2, Kapitel 3.2). Wie schon bei Regime A beobachtet, wurde auch für Regime B in der

ANOVA für die mit TMZ behandelten Proben ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 10 B, rechter Graph). Der daraufhin durchgeführte t-Test ergab sowohl für T200/Gy10 als auch T200/Gy20 im Vergleich zu T200/Gy0 einen signifikanten Unterschied der relativen ODs ( $p < 0,005$ ). Relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde bei Regime B für 10 Gy eine Verminderung um 77%, für 20 Gy um 90% festgestellt (Abb. 23, Anhang). Betrachtet man die Unterschiede zwischen den ODs für die Bestrahlung allein im Vergleich zur Doppelbehandlung, zeigte sich, dass die zeitversetzt doppelt behandelten Ansätze eine geringere Differenz zwischen den ODs aufwiesen als die Ansätze bei zeitgleicher Behandlung mit ionisierender Strahlung und TMZ (Abb. 23, Anhang). So entsprach bei Regime A zwischen T0/Gy10 und T200/Gy10 die Differenz von 0,4 einer durch TMZ induzierten Reduktion um 44% ( $p < 0,005$ ; t-Test). Für T0/Gy20 und T200/Gy20 betrug die TMZ-vermittelte Reduktion 60% (Differenz von 0,3;  $p < 0,005$ ; t-Test). Regime B erbrachte zwischen T0/Gy10(24h) und T200/Gy10(24h) keine signifikante Differenz ( $p > 0,05$ ; t-Test), während bei 20 Gy ein signifikanter Unterschied zwischen T0/Gy20(24h) und T200/Gy20(24h) von 0,3 zu beobachten war ( $p < 0,005$ ; t-Test). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass ein zusätzlicher Effekt von TMZ auf eine strahleninduzierte Reduktion der Proliferation effizienter ist, wenn eine zeitgleiche Behandlung erfolgte.

Bei der Glioblastomlinie **T1495** führten 50 $\mu$ M TMZ allein unabhängig vom Behandlungsansatz im Vergleich zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle zu keiner signifikanten Reduktion der BrdU-Inkorporation ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 10 A, B). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde bei Regime A in der ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 10 A, rechter Graph). Bei gleichzeitiger Bestrahlung mit 10 und 20 Gy wurden für die TMZ-Behandlung signifikant niedrigere ODs gemessen, wobei die Differenz zwischen 10 und 20 Gy nicht signifikant war ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 24 A, Anhang). Relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle ergab sich bei Regime A bei T50/Gy10 eine Verminderung um 40%, für T50/Gy20 um 38%. Erfolgte die Behandlung gemäß Regime B, war die Reduktion des BrdU-Einbaus in den bestrahlten Ansätzen für 10 Gy geringer, für 20 Gy stärker ausgeprägt (Abb. 10 B), was zumindest teilweise auf den späteren Messzeitpunkt zurückzuführen ist, der durch die zeitversetzte TMZ-Zugabe bedingt war (Abb. 2, Kapitel 3.2). Zwischen den mit TMZ behandelten Proben wurde in der ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 10 B, rechter Graph), der mit dem gepaarten t-Test sowohl zwischen T50/Gy0 und T50/Gy10 als auch T50/Gy0 und T50/Gy20 als beobachtete signifikante Reduktion bestätigt wurde ( $p < 0,005$ ; Abb. 24, Anhang). Relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde bei Regime B für 10 Gy eine Verminderung um 30%, für 20 Gy um 44% festgestellt. Betrachtet man die Unterschiede zwischen den ODs für die Bestrahlung allein im Vergleich zur Doppelbehandlung, war für keines der getesteten Behandlungsregime eine signifikante Differenz zwischen den ODs erkennbar (Abb. 23, Anhang). Dieses

Ergebnis spricht dafür, dass bei T1495 kein Vorteil eines Behandlungsschemas bestand. Zudem war auch der Effekt der Bestrahlung durch TMZ nicht steigerbar.

### Fazit

Bei zeitlicher Variation der TMZ-Behandlung in Relation zur Bestrahlung wurde bei zwei SLGC-Linien (T1389, T1454) ein Vorteil für die zeitgleiche Behandlung mit ionisierender Strahlung und TMZ beobachtet. Hier waren die Differenzen der ODs zwischen T0/Gy10 und T200/Gy10 sowie T0/Gy20 und T200/Gy20 größer, das heißt, der Effekt von TMZ war stärker ausgeprägt. Bei den SLGC-Linien T1447 und T1495 wurde ein solcher Effekt hingegen nicht beobachtet. Hier waren die Differenzen der ODs sowohl für die Paare T0/Gy10 und T50/Gy10 (T1495) bzw. T100/Gy10 (T1447) sowie T0/Gy20 und T50/Gy20 (T1495) bzw. T100/Gy20 (T1447) als auch für die Paare T0/Gy10(24h) und T50/Gy10(24h) bzw. T100/Gy10(24h) sowie T0/Gy20(24h) und T50/Gy20(24h) bzw. T100/Gy20(24h) nahezu identisch. Allerdings erschien bei T1389 und T1454 die Verminderung der Proliferation in Regime B stärker ausgeprägt, während diese bei T1495 im Vergleich zu Regime A eher geringer bis gar nicht nachweisbar war.

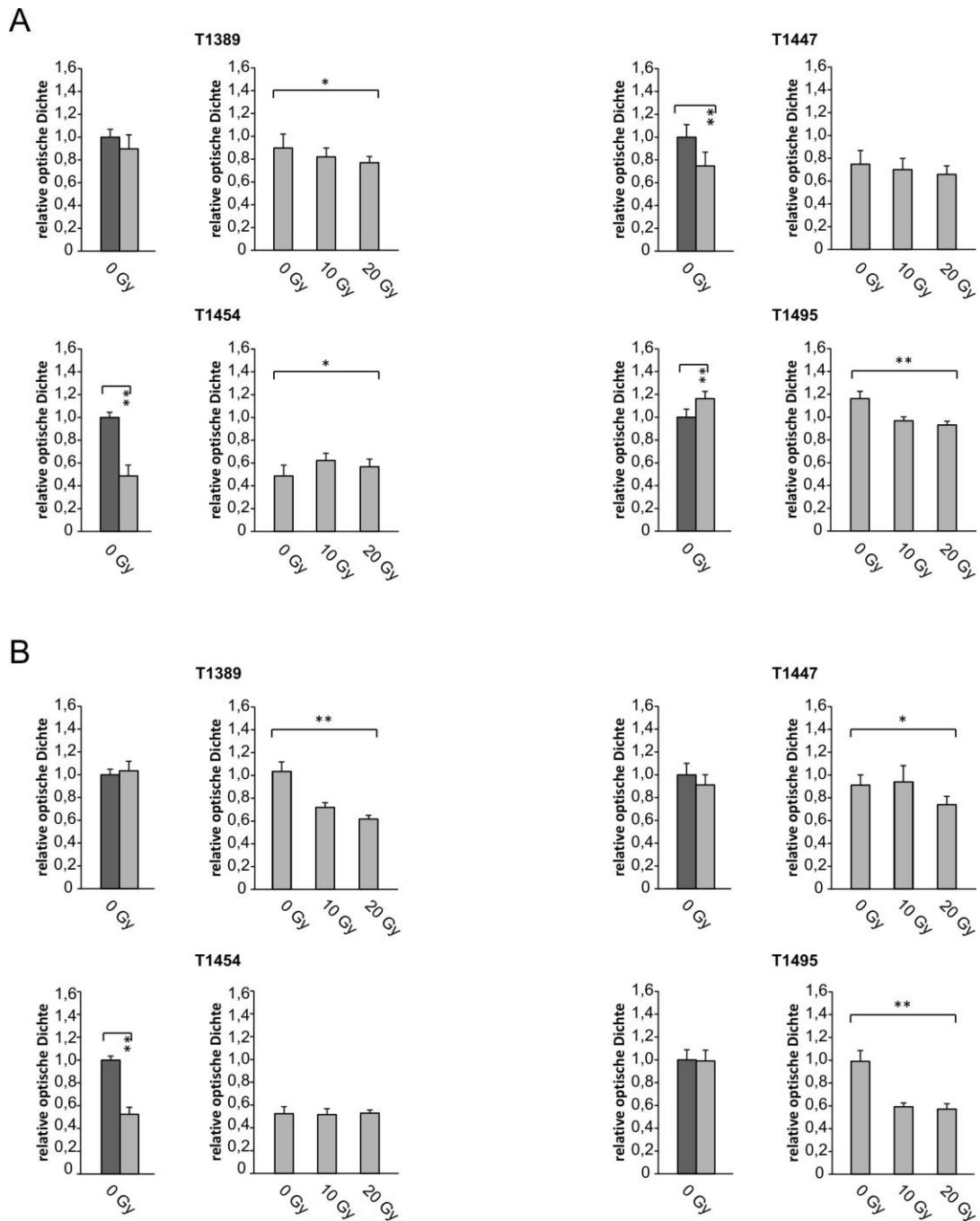
## **4.2.2. Effekt auf die Vitalität**

Um einen möglichen Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auch auf die Vitalität zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Analysen durchgeführt. Da der MTT-Assay durch Änderungen im Metabolismus und/oder Änderungen der Proliferation beeinflusst wird, wurde zusätzlich die Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH) untersucht, die auf die Induktion von Zelltod hinweist. Es wurde wiederum mit 10 und 20 Gy bestrahlt. Im Anschluss daran erfolgte analog zu den Proliferationsanalysen ein Vergleich der isoliert bestrahlten Ansätze mit denen der Kombinationsbehandlung zwischen Regime A und Regime B.

### **4.2.2.1. MTT-Assay**

Bei der Glioblastomlinie **T1389** führte die alleinige Behandlung mit 200µM TMZ in keinem der beiden Ansätze relativ zur DMSO-Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion der OD ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 11 A, B). Bei Regime A wurde mit dem ANOVA-Test zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen ( $p < 0,05$ ; Abb. 11 A, rechter Graph). Im daraufhin durchgeführten gepaarten t-Test wurde jedoch nur bei gleichzeitiger Bestrahlung mit 20 Gy für die TMZ-Behandlung eine signifikant unterschiedliche OD ( $p < 0,005$ ) im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung gemessen (Abb. 26 A, Anhang). Relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle ergab sich bei T200/Gy10 (Regime A) eine Verminderung um 20%, für T200/Gy20 um 24%. Wurde die Behandlung gemäß Regime B durchgeführt, war die Reduktion der

OD in den bestrahlten Ansätzen aufgrund der zeitversetzt durchgeführten TMZ-Gabe und der daraus resultierenden um 24h zeitversetzt durchgeführten Messung geringfügig stärker als bei Regime A (Abb. 2, Kapitel 3.2; Abb. 11 B). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde bei Regime B in der ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 11 B, rechter Graph). Im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung wurde daraufhin im gepaarten t-Test sowohl bei zusätzlicher Bestrahlung mit 10 Gy als auch mit 20 Gy eine signifikante Differenz nachgewiesen ( $p < 0,005$ ; Abb. 11 B). Relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde bei Regime B in Kombination mit TMZ für 10 Gy eine Verminderung um 28%, für 20 Gy um 40% festgestellt. Betrachtet man die Unterschiede zwischen den ODs für die Bestrahlung allein im Vergleich zur Doppelbehandlung, zeigte sich, dass die gemäß Regime B behandelten Ansätze im Falle von 10 Gy [Abb. 25 B: T200/Gy0(24h) – T200/Gy10(24h)] eine geringere Differenz zwischen den ODs aufwiesen als bei Regime A (Abb. 25 A: T200/Gy0 – T200/Gy10). Bei zeitgleicher Behandlung zwischen T0/Gy10 und T200/Gy10 betrug die Differenz 0,2 ( $p < 0,005$ ; t-Test; Reduktion durch die zusätzliche Gabe von TMZ um 20%), während bei zeitversetzter Behandlung zwischen T0/Gy10(24h) und T200/Gy10(24h) eine Differenz von 0,1 ( $p < 0,05$ ; t-Test; Reduktion durch die zusätzliche Gabe von TMZ um 12%;) bestand. Für T0/Gy20 und T200/Gy20 (Regime A) war die TMZ-vermittelte Reduktion bei zeitgleicher Behandlung nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; t-Test). Die zeitversetzte Behandlung erbrachte für das Paar T0/Gy20(24h) und T200/Gy20(24h) eine signifikante Differenz von 0,1 ( $p < 0,005$ ; t-Test; Reduktion durch die zusätzliche Gabe von TMZ um 15%). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass ein zusätzlicher Effekt von TMZ auf eine strahleninduzierte Reduktion der Vitalität insbesondere bei 10 Gy effizienter ist, wenn eine zeitgleiche Behandlung erfolgte. Bei 20 Gy hingegen schien die zeitversetzte Behandlung von Vorteil.



**Abb. 11: Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Vitalität von Gliomzellen.** – MTT-Assay. (A): Zeitgleiche Behandlung mit ionisierender Strahlung und TMZ. (B): Zugabe von TMZ 24h nach der Bestrahlung. Die Bestrahlung erfolgte in parallelen Ansätzen (96-Lochplatten) mit 10 und 20 Gray (Gy). Eine 96-Lochplatte wurde nicht bestrahlt (0 Gy). Die TMZ-Konzentrationen betragen 50µM (T1495), 100µM (T1447) und 200µM (T1389, T1454). DMSO (Dimethylsulfoxid) diente als Lösungsmittel für die hydrophobe Substanz TMZ. Die Umwandlung des Farbstoffes MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] in ein blauviolett Formazan wurde am Tag d4 (A) bzw. Tag d5 (B) mittels des MTT-Assays bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 parallel untersuchten Proben und die Standardabweichung. Die relative optische Dichte in der unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbestrahlten DMSO-Kontrolle und der TMZ-Einfachbehandlung wurden mittels t-Test bestimmt (linker Graph). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den TMZ-behandelten und zusätzlich mit unterschiedlichen Dosen bestrahlten Ansätzen wurden mittels ANOVA ermittelt (rechter Graph). Die Signifikanzen wurden mit \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,005$ ) gekennzeichnet. Dunkelgraue Balken: DMSO; hellgraue Balken: TMZ (Temozolomid). T: Tumor.

Bei der Gliosarkomlinie **T1447** führte die alleinige Behandlung mit 100µM TMZ im zeitgleichen Ansatz relativ zur DMSO-Kontrolle zu einer signifikanten Verminderung der OD um 28% ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 11 A, linker Graph). Im zeitversetzten Ansatz war die beobachtete Reduktion der OD jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 11 B, linker Graph). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde bei Regime A in der ANOVA kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p > 0,05$ ; Abb. 11 A, rechter Graph) und auch im gepaarten t-Test wurden bei gleichzeitiger Bestrahlung sowohl mit 10 als auch mit 20 Gy für die TMZ-Behandlung keine signifikanten Unterschiede der ODs im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung berechnet (Abb. 26 A, Anhang). Bei Regime A ergab sich relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle bei T100/Gy10 eine signifikante Verminderung der OD um 30% ( $p < 0,005$ ; t-Test), für T100/Gy20 wurde eine signifikante Reduktion um 35% beobachtet ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 26 A, Anhang). Erfolgte die TMZ-Gabe 24h nach der Bestrahlung, wurde eine ähnlich stark ausgeprägte Reduktion der OD in den bestrahlten Ansätzen festgestellt (Abb. 11 B). Der in der ANOVA ermittelte statistisch signifikante Unterschied zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen ( $p < 0,05$ ; Abb. 11 B, rechter Graph) wurde im gepaarten t-Test nur zwischen T100/Gy0 und T100/Gy20 bestätigt ( $p < 0,005$ ; Abb. 26 B, Anhang). Auch relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde bei Regime B für 10 Gy zwar keine signifikante Verminderung beobachtet, für 20 Gy wurde jedoch eine signifikante Reduktion um 36% festgestellt ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 26 B, Anhang). Vergleicht man die relativen ODs nach alleiniger Bestrahlung mit denen nach der Doppelbehandlung, zeigte sich, dass bei Behandlungsregime A kein signifikanter Unterschied festzustellen war ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 25 A). So waren die relativen ODs in den T0/Gy10- und T100/Gy10-behandelten sowie den T0/Gy20- und T100/Gy20-behandelten Ansätzen nahezu identisch. Im Gegensatz dazu war bei Regime B eine Differenz sowohl zwischen T0/Gy10(24h) und T100/Gy10(24h) als auch T0/Gy20(24h) und T100/Gy20(24h) zu beobachten, die jedoch ebenfalls nicht signifikant war ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 25 B). Allerdings stieg die OD unerwartet nach der Doppelbehandlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung bei den Paaren T0/Gy10(24h) und T100/Gy10(24h) bzw. T0/Gy20(24h) und T100/Gy20(24h) an. Durch die Bestrahlung mit 20 Gy wurden bei Regime A (Abb. 11 A) und bei Regime B (Abb. 11 B) die ODs ähnlich effizient reduziert, ohne dass ein Vorteil für eines der Behandlungsregime erkennbar war.

Bei der Glioblastomlinie **T1454** führte die alleinige Behandlung mit 200µM TMZ bei beiden Regimen relativ zur DMSO-Kontrolle zu einer signifikanten Verminderung der ODs um die Hälfte ( $p < 0,005$ ; t-Test; Abb. 11). Bei gleichzeitiger Bestrahlung mit 10 und 20 Gy wurden für die TMZ-Behandlung ähnlich niedrige ODs gemessen [T200/Gy0: 0,49; T200/Gy10: 0,62; T200/Gy20: 0,56; Abb. 11 A]. Zwischen diesen mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde jedoch in der ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen ( $p < 0,05$ ; Abb. 11 A, rechter Graph).

Im daraufhin durchgeführten gepaarten t-Test wurde dann gezeigt, dass diese aus einem signifikanten Anstieg der OD zwischen T200/Gy0 und T200/Gy10 resultierte ( $p < 0,005$ ). Relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle ergab sich in Regime A bei T200/Gy10 eine Verminderung um 38% ( $p < 0,005$ ), für T200/Gy20 um 44% ( $p < 0,005$ , Abb. 26 A). Erfolgte die TMZ-Gabe 24h nach der Bestrahlung (Regime B), war die Reduktion der ODs in den bestrahlten Ansätzen relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle nur geringfügig stärker als bei zeitgleicher Doppelbehandlung [T200/Gy10(24h): 48%; T200/Gy20(24h): 49%; Abb. 11 B]. Im Gegensatz zu Regime A war hier mit dem ANOVA-Test zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen kein statistisch signifikanter Unterschied zu erheben ( $p > 0,05$ ; Abb. 11 B, rechter Graph). Vergleicht man die relativen ODs nach alleiniger Bestrahlung mit denen nach der Doppelbehandlung, war zwischen den beiden Behandlungsregimen A und B nur ein geringfügiger Unterschied zu beobachten (Abb. 25, Anhang). Sowohl zwischen den Paaren T0/Gy10 und T200/Gy10 als auch T0/Gy10(24h) und T200/Gy10(24h) war die Differenz der relativen OD mit 0,37 bzw. 0,36 ähnlich ( $p < 0,005$ , t-Test). Zwischen T0/Gy20 und T200/Gy20 betrug die Differenz 0,37 ( $p < 0,005$ ), zwischen T0/Gy20(24h) und T200/Gy20(24h) waren es 0,31 ( $p < 0,005$ ). Eine Steigerung der Strahlendosis zeigte folglich keinen zusätzlichen Effekt. Weiterhin ergaben die Ergebnisse, dass zwischen den beiden Regimen im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung kein erkennbarer Unterschied bzgl. des Zeitpunktes der TMZ-Gabe relativ zur Bestrahlung vorlag. Bei einer Steigerung der Strahlendosis schien die vorteilhafte Wirkung des TMZ in beiden Fällen geringer.

Bei der Glioblastomlinie **T1495** führte die alleinige Behandlung mit 50 $\mu$ M TMZ bei keinem der beiden Regime relativ zur DMSO-Kontrolle zu einer Reduktion der OD (Abb. 11 A, B). Bei Regime A wurde jedoch ein signifikanter Anstieg der OD beobachtet ( $p < 0,005$ ; t-Test). Zwischen den mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen wurde in der ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 11 A, rechter Graph). Sowohl zwischen T50/Gy0 und T50/Gy10 als auch zwischen T50/Gy0 und T50/Gy20 wurde im gepaarten t-Test eine signifikante Differenz zwischen den relativen ODs nachgewiesen ( $p < 0,005$ ). Dennoch hatte die gleichzeitige Bestrahlung mit 10 und 20 Gy gemäß Regime A keinen weiteren Einfluss. Die relative OD für T50/Gy10 bzw. T50/Gy20 im Vergleich zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle differierte nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 26 A, Anhang). Die berechnete Signifikanz zwischen den mit TMZ behandelten Proben ist auf die im Vergleich zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle größere relative OD der allein mit TMZ behandelten Probe zurückzuführen (Abb. 11 A, linker Graph; Abb. 25 A, Abb. 26 A, Anhang). Erfolgte die TMZ-Gabe hingegen 24h nach der Bestrahlung (Regime B), war die relative OD bereits in den bestrahlten Ansätzen (Messung erfolgte methodenbedingt einen Tag später als bei Regime A) deutlich reduziert (Abb. 2, Kapitel 3.2; Abb. 11 B). Im Vergleich der mit TMZ behandelten Bestrahlungsgruppen ergab sich in der ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,005$ ;

Abb. 11 B, rechter Graph), der im gepaarten t-Test sowohl zwischen T50/Gy0(24h) und T50/Gy10(24h) als auch zwischen T50/Gy0(24h) und T50/Gy20(24h) bestätigt wurde ( $p < 0,005$ ). Relativ zur unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde für 10 Gy eine signifikante Verminderung um 40% ( $p < 0,005$ ; t-Test), für 20 Gy um 43% ( $p < 0,005$ ; t-Test) festgestellt (Abb. 26 B, Anhang). Vergleicht man die relativen ODs nach alleiniger Bestrahlung mit denen nach der Doppelbehandlung, wurde bei T50/Gy10 nach zeitversetzter TMZ-Zugabe eine geringe, aber signifikante Differenz zwischen den ODs ( $p < 0,05$ ; t-Test) beobachtet, nicht aber bei zeitgleicher Behandlung (Abb. 25, Anhang). Die zeitversetzte Behandlung erbrachte zwischen T0/Gy10(24h) und T50/Gy10(24h) eine Differenz von 0,08. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass ein zusätzlicher Effekt von TMZ auf eine strahleninduzierte Reduktion der Vitalität bestenfalls in einem Ansatz der zeitversetzten Behandlung erfolgte. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Konzentration von 50 $\mu$ M TMZ schon in der Einzelbehandlung keinen Effekt hatte.

#### Fazit

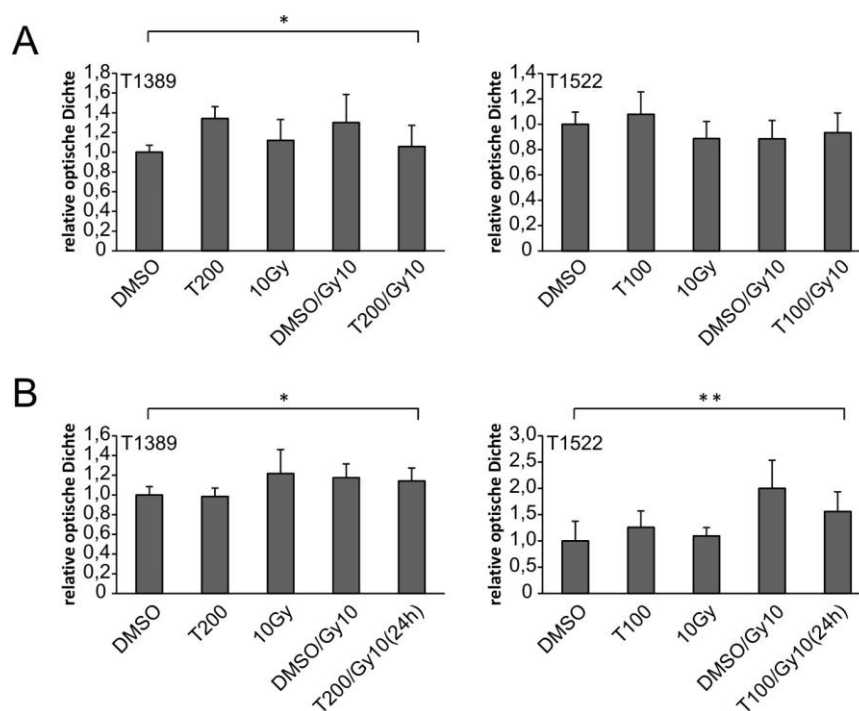
Wie auch schon im BrdU-ELISA beobachtet, besteht bei der SLGC-Linie T1389 die Möglichkeit, dass die zeitgleiche Behandlung mit ionisierender Strahlung und TMZ von Vorteil ist, da hier die Differenz der ODs zwischen T0/Gy10 und T200/Gy10 größer und somit die Wirkung von TMZ effizienter war. Bei T1454, T1447 und T1495 waren hinsichtlich des Zeitpunktes der TMZ-Zugabe keine eindeutigen Unterschiede zwischen Regime A und Regime B erkennbar.

#### **4.2.2.2. Lactatdehydrogenase-Assay**

Da der MTT-Assay für die SLGC-Linie T1389 den Hinweis lieferte, dass möglicherweise die zeitgleiche Zugabe von TMZ hinsichtlich der Vitalitätsreduktion von Vorteil sein könnte, wurde für diese SLGC-Linie zusätzlich die Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH) untersucht, um Hinweise auf die Induktion von Zelltod zu gewinnen. Weiterhin wurde für T1522 festgestellt, dass diese SLGC-Linie besonders gut auf die Bestrahlung reagierte. Diese beiden SLGC-Kulturen wurden daher im LDH-Assay ausschließlich nach einer Bestrahlung mit 10 Gy analysiert.

Bei der Glioblastomlinie **T1389** wurde mit dem ANOVA-Test sowohl bei Regime A als auch bei Regime B ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen ermittelt ( $p < 0,05$ ; Abb. 12 A, B). Die alleinige Behandlung mit 200 $\mu$ M TMZ führte bei Regime A relativ zur DMSO-Kontrolle zu einem Anstieg der LDH-Freisetzung um 34%, der im t-Test nachweislich signifikant war ( $p < 0,05$ ; Abb. 27 A, Anhang). Im zeitversetzten Ansatz (Regime B; Abb. 27 B, Anhang) fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied zur korrespondierenden DMSO-Kontrolle. Die alleinige Bestrahlung führte relativ zur DMSO-Kontrolle in beiden Ansätzen zu einer gesteigerten LDH-Freisetzung, wobei dieser Anstieg nur im zeitversetzten Ansatz signifikant war [1,2-fach,

$p < 0,05$ ; t-Test; Abb. 27 B, Anhang]. Bei gleichzeitiger Bestrahlung mit 10 Gy wurde nach der TMZ-Behandlung ein geringer Anstieg der LDH-Freisetzung beobachtet, der jedoch weder zur DMSO-Kontrolle, noch zu den Einzelbehandlungen signifikant verschieden war ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 27 A, Anhang). Erfolgte die TMZ-Gabe 24h nach der Bestrahlung, war der Anstieg der OD im doppelt behandelten Ansatz geringfügig höher als der im Ansatz nach zeitgleicher TMZ-Applikation und Bestrahlung (Abb. 27 B, Anhang). Relativ zum Ergebnis für die alleinige Bestrahlung mit 10 Gy wurde bei Regime B weder für T200/Gy10(24h) noch für die Kontrolle DMSO/Gy10 ein signifikanter Unterschied beobachtet (Abb. 27 B, Anhang). Damit ergab sich für keine der beiden Behandlungsstrategien ein Vorteil, weder für die zeitgleiche noch für die zeitversetzte TMZ-Zugabe.



**Abb. 12: Auswirkungen der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH).** – LDH-Assay. (A): zeitgleiche Behandlung mit Bestrahlung und TMZ (T/Gy10). (B): Zugabe des TMZ 24h nach der Bestrahlung [T/Gy10(24h)]. Die Bestrahlung erfolgte jeweils mit 10 Gray. TMZ wurde in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben (T1389: 200µM; T1522: 100µM). Für jede Behandlung wurde der Mittelwert aus 8 Proben berechnet und die Standardabweichung angegeben. Es wurde jeweils mit Hilfe des ANOVA-Tests die Signifikanz zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bestimmt: \* für  $p < 0,05$ ; \*\* für  $p < 0,005$ . DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; LDH: Lactatdehydrogenase; TMZ: Temozolomid; T: Tumor.

Bei der Glioblastomlinie **T1522** wurde in der ANOVA zwischen den Behandlungsgruppen bei Regime A das Signifikanzniveau knapp nicht erreicht ( $p = 0,05$ ; Abb. 12 A). Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen wurde bei Regime B jedoch ein signifikanter Unterschied ermittelt ( $p < 0,005$ ; Abb. 12 B). Die alleinige Behandlung mit 100µM TMZ führte in beiden Ansätzen zu einem nicht

signifikanten Anstieg der LDH-Freisetzung ( $p > 0,05$ ; t-Test; Abb. 27, Anhang). Die alleinige Bestrahlung führte dagegen in Anwesenheit von DMSO in beiden Ansätzen zu einer signifikanten Änderung der LDH-Freisetzung. Der geringen Abnahme im zeitgleichen Ansatz ( $p < 0,05$ ; t-Test; Abb. 27 A, Anhang) stand eine Zunahme bei Regime B ( $p < 0,05$ ; t-Test; Abb. 27 B, Anhang) gegenüber. Aufgrund der hohen LDH-Freisetzung bei Regime B bei DMSO/Gy10 ist die Aussagekraft des Unterschieds zwischen T0/Gy10(24h) und T100/Gy10(24h) im zeitversetzten Ansatz zweifelhaft. Dies ist möglicherweise auf einen zytotoxischen Effekt des DMSO zurückzuführen.

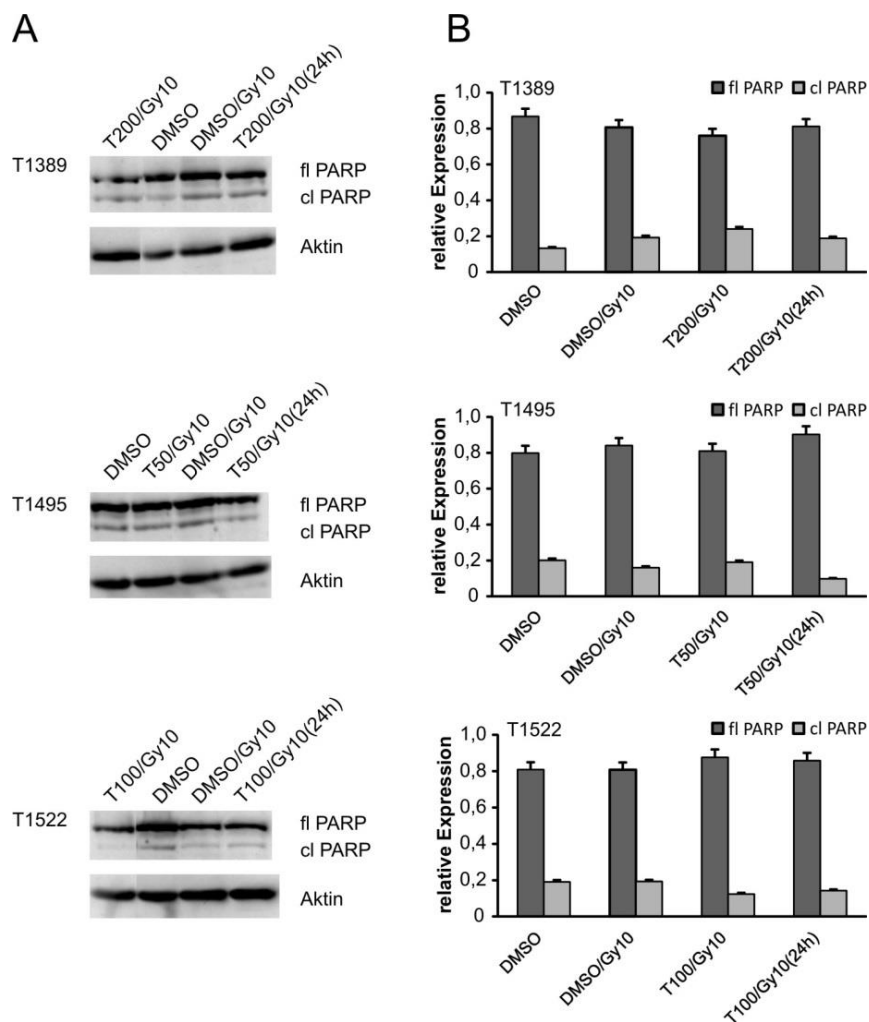
### Fazit

Für keine der beiden im LDH-Assay untersuchten SLGC-Linien (T1389, T1522) war ein konklusiver Effekt der Doppelbehandlung erkennbar, weder im zeitgleichen noch im zeitversetzten Ansatz. Da die Untersuchung nur einmal durchgeführt wurde, ist eine Interpretation schwierig. Es ist zudem zu vermuten, dass im vorliegenden Fall experimentelle Probleme vorlagen.

### **4.2.3. Induktion der proteolytischen Spaltung von PARP-1**

Die MTT-Assays gaben Hinweise darauf, dass die Bestrahlung und TMZ-Behandlung Zelltod auslösen könnten. Um dies zu erhärten, wurde die proteolytische Spaltung von PARP-1 [Poly-(ADP-ribose)-Polymerase-1] untersucht. PARP-1 wird von der Effektorcaspase-3 gespalten (Galia et al., 2012). Mit Hilfe der Western Blot-Methode wurde die proteolytische Spaltung des volle Länge [engl.: *full length* (fl)] PARP-1 (116 kD) in das 89 kD-Fragment *cleaved* (cl) PARP-1 untersucht. Dazu wurden die SLGC-Linien T1389, T1495 und T1522 nach zeitgleicher Bestrahlung und TMZ-Gabe (Regime A) bzw. nach der um 24h verzögerten TMZ-Applikation (Regime B) untersucht. Da TMZ in DMSO gelöst ist, dienten die mit DMSO behandelten Ansätze als Kontrollen.

In der DMSO-Kontrolle der **T1389-Kulturen** betrug das Verhältnis von fl PARP-1 zu cl PARP-1 0,87:0,13 (Abb. 13 B). Die Bestrahlung führte zu einer Erhöhung des relativen Anteils an gespaltenem PARP-1 (fl:cl 0,8:0,2). Die Kombinationsbehandlung gemäß Regime A (T200/Gy10) führte im Vergleich zum Ansatz mit alleiniger Bestrahlung zu einer weiteren Zunahme des Anteils an gespaltenem PARP-1-Protein (fl:cl 0,75:0,25). Bei Regime B wurde das Verhältnis von fl PARP-1 zu cl PARP-1 im Vergleich zu Regime A zu Gunsten von fl PARP-1 leicht verschoben (fl:cl 0,81:0,19). Damit resultierte die zeitgleiche Behandlung mit TMZ und 10 Gy in einer geringfügig stärkeren Induktion der PARP-1-Proteolyse im Vergleich zur um 24h versetzten TMZ-Gabe. Im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung hingegen kam es jedoch durch die Doppelbehandlung bei Regime B zu keiner Erhöhung des Anteils an cl PARP-1, so dass durch die zusätzlich TMZ-Gabe nur bei zeitgleicher Zugabe zur Bestrahlung geringfügig vermehrt PARP-1 gespalten wurde.



**Abb. 13: Proteolyse von PARP-1 in SLGC-Kulturen am Tag d3 nach Behandlung.** – (A): Western Blot-Analyse. (B): Graphische Darstellung der relativen Level des DNA-Reparaturenzyms PARP-1 [Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-1] in der volle Länge Form [full length (fl) PARP-1; 116kD] und der gespaltenen Form [cleaved (cl) PARP-1; 89kD]. Die Level wurden gegen die Werte der Expression von Aktin normalisiert. Für jeden Behandlungsansatz wurde die Summe der Level von fl PARP-1 und cl PARP-1 gleich 1 gesetzt. T/Gy10: TMZ-Zugabe direkt nach der Bestrahlung; T/Gy10(24h): TMZ-Zugabe 24h nach der Bestrahlung. fl PARP: ungespaltenes (volle Länge) PARP-1-Protein (full length PARP-1); cl PARP: gespaltenes PARP-1-Protein (cleaved PARP-1); DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; T: Temozolomid (T1389: 200µM; T1495: 50µM; T1522: 100µM). Der systematische Fehler ist angegeben.

In der DMSO-Kontrolle der **T1495**-Behandlungen betrug das Verhältnis von fl PARP-1 zu cl PARP-1 0,8:0,2 (Abb. 13 B). Die Bestrahlung führte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu einem leichten Rückgang des relativen Anteils an gespaltenem PARP-1-Protein (fl:cl 0,85:0,15). Die Kombinationsbehandlung gemäß Regime A mit 50µm TMZ und einer Bestrahlung mit 10 Gy führte im Vergleich zum Ansatz mit alleiniger Bestrahlung zu einer leichten Zunahme des Anteils an gespaltenem PARP-1 (fl:cl 0,8:0,2). Die um 24h versetzte TMZ-Applikation ergab hingegen eine Abnahme des Anteils an gespaltenem PARP-1-Protein sowohl im Vergleich zur DMSO-Kontrolle als auch zu T50/Gy10, so dass das Verhältnis von fl PARP-1 zu cl PARP-1 zu Gunsten von fl PARP-1 verschoben

wurde (fl:cl 0,9:0,1). Damit resultierte die zeitgleiche TMZ-Gabe zur Bestrahlung in einer etwas stärkeren Induktion der PARP-1-Proteolyse im Vergleich zur um 24h versetzten TMZ-Gabe, jedoch war kein Unterschied zwischen T50/Gy10 und der DMSO-Kontrolle erkennbar.

In der DMSO-Kontrolle von **T1522-Kulturen** betrug das Verhältnis von fl PARP-1 zu cl PARP-1 0,8:0,2 (Abb. 13 B). Die Bestrahlung bewirkte keine Verschiebung des Verhältnisses zu Gunsten von cl PARP-1 (fl:cl 0,8:0,2) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Kombinationsbehandlung mit TMZ (T50/Gy10) führte in beiden Ansätzen zu einer ähnlichen Verschiebung des Verhältnisses zu Gunsten von fl PARP-1 (T100/Gy10: fl:cl 0,87:0,13; T100/Gy10(24h): fl:cl 0,85:0,15) sowohl im Vergleich zur DMSO-Kontrolle als auch zur alleinigen Bestrahlung. Somit konnte die zusätzliche Behandlung mit TMZ den Effekt der alleinigen Bestrahlung auf die Proteolyse von PARP-1 nicht verstärken.

#### Fazit

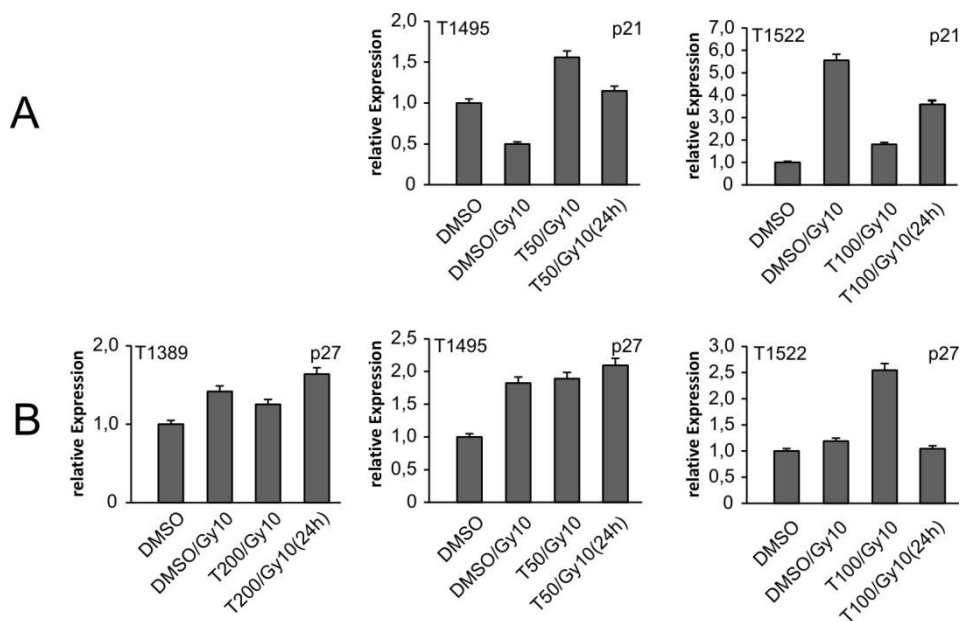
Insgesamt war die Spaltung von PARP-1 in allen Ansätzen gering ausgeprägt und die Induktion der PARP-1-Proteolyse mittels TMZ und/oder Bestrahlung nur bei einer SLGC-Linie (T1389) erkennbar.

#### **4.2.4. Effekt auf die Expressionslevel von Zellzyklusinhibitoren**

Um die möglichen Auswirkungen der unterschiedlichen Behandlungsregime (zeitgleiche *versus* 24h versetzte TMZ-Applikation) auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurde mit Hilfe der Western Blot-Methode analog zur PARP-1-Spaltung die Expression der Zellzyklusinhibitoren p21<sup>Cip1/WAF1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> bestimmt (Abb. 14). Diese sind an der Progression des Zellzyklus maßgeblich beteiligt (Abbas und Dutta, 2009; Abukhdeir und Park, 2008). Die SLGC-Linien T1389, T1495 und T1522 wurden sowohl nach zeitgleicher Bestrahlung (10 Gy) und TMZ-Gabe als auch nach einer zeitlich versetzten Doppelbehandlung (TMZ-Zugabe 24h nach der Bestrahlung) untersucht. Da TMZ in DMSO gelöst ist, wurden wiederum parallel Kontrollen mit DMSO behandelt. Die Analyse umfasste zudem eine Einfachbestrahlung mit 10 Gy.

Bei der SLGC-Linie **T1389** waren die Level von p21<sup>Cip1/WAF1</sup> nicht messbar. Die Bestrahlung mit 10 Gy führte zu einem 1,6-fach höheren Expressionslevel von p27<sup>Kip1</sup> im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 14). Die gleichzeitige Behandlung mit 10 Gy und 200µM TMZ ergab zwar einen Anstieg des p27<sup>Kip1</sup>-Levels um das 1,3-fache im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, jedoch einen geringeren Anstieg als bei der alleinigen Bestrahlung (1,6-fach). Die um 24h zeitversetzte Gabe von TMZ zur Bestrahlung führte zu einer Steigerung um das 1,7-fache im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Da die Expressionslevel von p27<sup>Kip1</sup> insgesamt sehr niedrig waren, kann nicht abschließend geschlussfolgert werden, ob die Unterschiede signifikant waren.

In der SLGC-Linie **T1495** wurden niedrige Expressionslevel der beiden Zellzyklusinhibitoren  $p21^{Cip1/WAF1}$  und  $p27^{Kip1}$  in der DMSO-Kontrolle detektiert (Abb. 14). Die Bestrahlung der Zellen mit 10 Gy führte zu einer Halbierung des  $p21^{Cip1/WAF1}$ -Levels relativ zur DMSO-Kontrolle. Die gleichzeitige Behandlung mit 50 $\mu$ M TMZ erhöhte das  $p21^{Cip1/WAF1}$ -Level auf das 1,5-fache relativ zur DMSO-Kontrolle. Auch in den Ansätzen, in denen die TMZ-Gabe 24h nach der Bestrahlung erfolgte, wurde ein Anstieg festgestellt. Der Anstieg relativ zur DMSO-Kontrolle war hier jedoch mit einer 1,2-fachen Erhöhung geringer als im zeitgleichen Behandlungsansatz (1,5-fach) ausgeprägt. Die Änderungen des  $p27^{Kip1}$ -Levels verhielten sich anders. Durch 10 Gy wurde das  $p27^{Kip1}$ -Level um das 1,8-fache relativ zur DMSO-Kontrolle erhöht und durch die gleichzeitige Behandlung mit TMZ und 10 Gy weiter auf das 1,9-fache der Kontrolle gesteigert. Eine um 24h zur Bestrahlung versetzte Gabe des TMZ steigerte das  $p27^{Kip1}$ -Level auf das 2,1-fache der DMSO-Kontrolle. Damit schien die Doppelbehandlung eine effizientere Induktion von  $p21^{Cip1/WAF1}$  zu bewirken, wenn die Applikation von TMZ zeitgleich zur Bestrahlung erfolgte, während die Induktion von  $p27^{Kip1}$  im Falle der zeitversetzten Behandlung in T1495-Kulturen geringfügig effizienter war (Abb. 14).



**Abb. 14: Relative Expression der Zellzyklusinhibitoren  $p21^{Cip1/WAF1}$  und  $p27^{Kip1}$  in behandelten und unbehandelten Gliomzellen.** – Graphische Darstellung der Expressionen der Zellzyklusinhibitoren  $p21^{Cip1/WAF1}$  (A) und  $p27^{Kip1}$  (B) an Tag d3 in Relation zur Expression von Aktin. Die Expression in der DMSO-behandelten Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. T/Gy10: TMZ-Zugabe direkt nach der Bestrahlung; T/Gy10(24h): TMZ-Zugabe 24h nach der Bestrahlung. DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; TMZ (T): Temozolomid (T1389: 200 $\mu$ M; T1495: 50 $\mu$ M; T1522: 100 $\mu$ M). Der systematische Fehler ist angegeben.

In der SLGC-Linie **T1522** war das Expressionslevel von  $p21^{Cip1/WAF1}$  in der DMSO-Kontrolle sehr niedrig (Abb. 14; Abb. 28, Anhang). Die Bestrahlung mit 10 Gy führte zu einem 5,8-fach erhöhten

p21<sup>Cip1/WAF1</sup>-Level, die gleichzeitige Behandlung mit 100µM TMZ aber lediglich zu einer Verdoppelung. Der Anstieg des p21<sup>Cip1/WAF1</sup>-Levels betrug das 3,6-fache, wenn die TMZ-Gabe 24h nach der Bestrahlung erfolgte. Die Expression von p27<sup>Kip1</sup> wurde durch 10 Gy um das 1,2-fache relativ zur DMSO-Kontrolle erhöht. Die gleichzeitige Behandlung mit TMZ steigerte das p27<sup>Kip1</sup>-Level auf das 2,7-fache der Kontrolle. Eine um 24h zur Bestrahlung versetzte TMZ-Gabe hatte im Vergleich zur DMSO Kontrolle keinen Einfluss auf das p27<sup>Kip1</sup>-Level. Damit könnte in T1522-Kulturen die zeitversetzte Behandlung mit TMZ und ionisierender Strahlung eine effizientere Induktion von p21<sup>Cip1/WAF1</sup> bewirken, während die Induktion von p27<sup>Kip1</sup> bei zeitgleicher Behandlung optimaler wäre.

### Fazit

Die Induktion der Zellzyklusinhibitoren p21<sup>Cip1/WAF1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> erfolgte SLGC-Linien-spezifisch. Die Bestrahlung mit 10 Gy steigerte die p21<sup>Cip1/WAF1</sup>-Level in einer (T1522), nicht aber in den anderen SLGC-Linien, erhöhte dagegen in allen drei SLGC-Linien das p27<sup>Kip1</sup>-Level, wenn auch unterschiedlich stark. TMZ induzierte p21<sup>Cip1/WAF1</sup> in T1495 und T1522, nicht aber in T1389; es erhöhte aber in allen Analysen in Gegenwart von 10 Gy das p27<sup>Kip1</sup>-Level im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die zeitgleiche *versus* zeitversetzte Behandlung mit TMZ relativ zur Bestrahlung führte wiederum zu unterschiedlichen Ergebnissen. So war die Induktion von p21<sup>Cip1/WAF1</sup> bei zeitgleicher Doppelbehandlung in T1495-Kulturen effizienter. Die Level von p27<sup>Kip1</sup> waren in zwei Fällen (T1389, T1495) geringfügig höher, wenn die TMZ-Gabe 24h verzögert erfolgte.

## **4.2.5. Effekte auf den Zellzyklus**

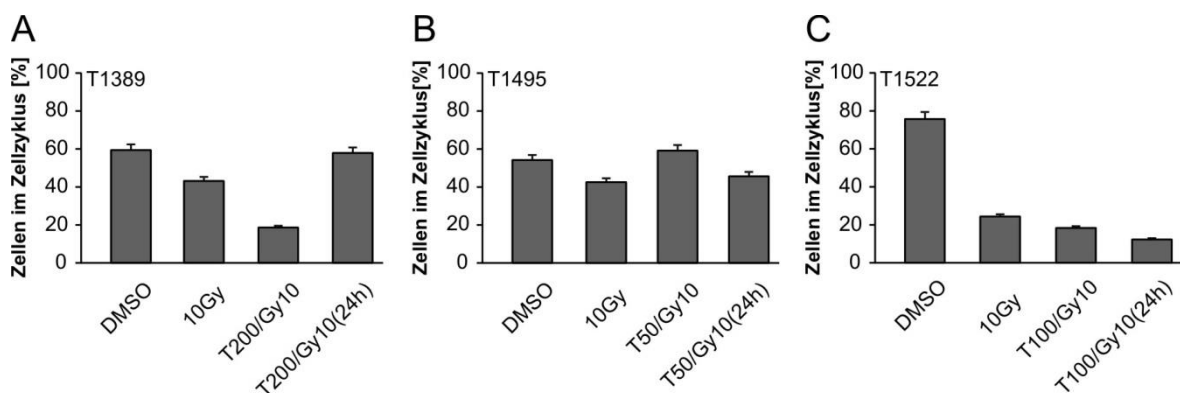
Die Western Blot-Analyse der p21<sup>Cip1/WAF1</sup>- und p27<sup>Kip1</sup>-Expression wies auf Änderungen des Levels dieser Zellzyklusinhibitoren nach der Behandlung hin. Um die Auswirkungen von Bestrahlung und TMZ-Behandlung hinsichtlich der Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen zu ermitteln, wurden Propidiumiodid-markierte Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Dabei stand zum einen die Frage im Vordergrund, ob die Einfach- und Doppelbehandlungen zu einem Absterben der Zellen führten. Zum anderen sollte ermittelt werden, ob der zeitliche Ablauf der Doppelbehandlung einen Einfluss auf den Zellzyklus hatte. Es wurden wie zuvor die SLGC-Linien T1389, T1495 und T1522 an Tag d3 untersucht (Abb. 15; Abb. 16).

### **4.2.5.1. Verteilung der SLGCs in die Lebend- bzw. Totfraktion**

In **T1389-Kulturen** befanden sich in der DMSO-Kontrolle 60% der Zellen im Zellzyklus, 40% entfielen auf die Fraktion der toten Zellen (Abb. 15 A). Die Bestrahlung mit 10 Gy führte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu einem Rückgang des Anteils an Lebend-Zellen um 25%. Bei gleichzeitiger Gabe

von 200µM TMZ und Bestrahlung befanden sich noch 18% der Zellen im Zellzyklus. Wurde die TMZ-Zugabe um 24h relativ zur Bestrahlung verzögert, betrug der Anteil von Zellen im Zellzyklus 57%. Damit scheint die gleichzeitige Bestrahlung und TMZ-Behandlung den Anteil lebender Zellen stärker zu reduzieren als die zeitversetzte Behandlung.

Bei **T1495-Kulturen** hingegen wurde ein anderes Ergebnis beobachtet (Abb. 15 B). Hier befanden sich in der DMSO-Kontrolle 54% der Zellen im Zellzyklus, 46% entfielen auf die Totfraktion. Die Bestrahlung führte zu einem Rückgang des Anteils an Lebend-Zellen auf 43%. In der Kombinationsbehandlung mit gleichzeitiger Bestrahlung und einer Gabe von 50µM TMZ betrug der Anteil lebender Zellen 60% und war damit ähnlich dem in der DMSO-Kontrolle. Erfolgte die TMZ-Gabe 24h nach der Bestrahlung, lag der Anteil lebender Zellen bei 45%. Somit kann vermutet werden, dass für T1495-Kulturen die zeitgleiche Behandlung mit ionisierender Strahlung und TMZ hinsichtlich der Induktion von Zelltod weniger effizient war.

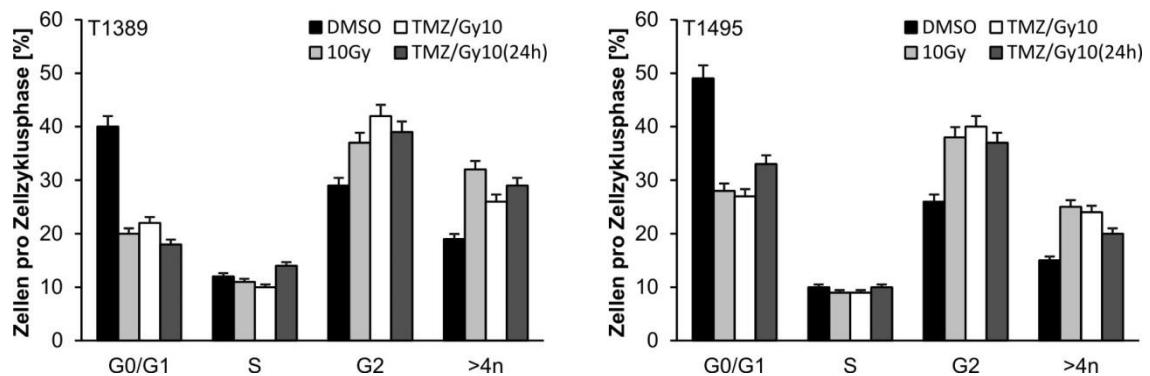


**Abb. 15: Anteil lebender Zellen nach Bestrahlung und TMZ-Behandlung.** – A; B; C: Durchflusszytometrische Analyse Propidiumiodid-markierter Zellen. Da TMZ in DMSO gelöst wird, diente der mit DMSO-behandelte Ansatz als Kontrolle. Die eingesetzten TMZ-Konzentrationen betragen für T1389 200µM, T1495 50µM, T1522 100µM. T/Gy10: zeitgleiche Behandlung; T/Gy10(24h): Zugabe des TMZ 24h nach der Bestrahlung. DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; T: Temozolomid. Der systematische Fehler ist angegeben.

In **T1522-Kulturen** lag der Anteil lebender Zellen in der DMSO-Kontrolle bei 75% (Abb. 15 C). Die alleinige Bestrahlung mit 10 Gy führte zu einem Rückgang des Anteils lebender Zellen auf 24%. Bei zeitgleicher Bestrahlung und Gabe von 100 µM TMZ betrug der Anteil lebender Zellen 18%. Die Doppelbehandlung bestehend aus Bestrahlung und um 24h zeitversetzter TMZ-Gabe senkte den Anteil lebender Zellen auf 14%. Somit konnte bei T1522 durch die Bestrahlung effizient der Anteil lebender Zellen vermindert werden. Die zusätzliche Gabe von 100µM TMZ bewirkte nur eine moderate zusätzliche Verminderung der Lebend-Zellfraktion und erschien nur in geringem Maße von der zeitlichen Abfolge der Behandlung abhängig.

#### 4.2.5.2. Analyse der Zellverteilung im Zellzyklus

Ein synergistischer Effekt von Bestrahlung und TMZ wurde bei T1389 in Hinblick auf die Reduktion des Anteils an lebenden Zellen nach zeitgleicher Behandlung (T200/Gy10) festgestellt. In T1522-Kulturen war diesbezüglich der Effekt der Doppelbehandlung für T100/Gy10 geringer ausgeprägt als im Ansatz T100/Gy10(24h). Da bei T1522 nach der Doppelbehandlung ein sehr hoher Anteil toter Zellen vorlag (Abb. 15), war eine Analyse der Zellverteilung im Zellzyklus nur für T1389 und T1495 möglich (Abb. 16).



**Abb. 16: Einfluss der Bestrahlung und TMZ-Behandlung auf die Verteilung von SLGC-Zellen in den Zellzyklusphasen.** - Durchflusszytometrische Analysen Propidiumiodid-markierter Zellen. Die eingesetzten TMZ-Konzentrationen betragen für T1389 200µM und für T1495 50µM. Zellzyklusphasen: G0/G1, S (=Synthese) und G2 und Anteil von Zellen mit einem DNA-Gehalt von >4n. TMZ/Gy10: zeitgleiche Behandlung; TMZ/Gy10(24h): zeitversetzte Zugabe von TMZ. DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; TMZ: Temozolomid; T:Tumor. Der systematische Fehler ist angegeben.

In **T1389-Kulturen** befanden sich in der DMSO-Kontrolle 40% der Zellen in der G0/G1-Phase, 12% in der S-Phase und 29% in der G2-Phase (Abb. 16). Daneben wurde ein Anteil von 19% beobachtet, der einen DNA-Gehalt von >4n aufwies, was auf Polyploidie oder Aneuploidie hinweisen könnte. Nach der Bestrahlung mit 10 Gy sank der Anteil von Zellen in der G0/G1-Phase auf 20%. Dabei stieg der Anteil von Zellen in der G2-Phase von 29% auf 37% und für >4n von 19% auf 32%. Der Anteil von Zellen in der S-Phase veränderte sich dagegen kaum (Abb. 16). Dies weist darauf hin, dass die Bestrahlung einen partiellen G2-Arrest auslöste und zum anderen mit der geordneten Zellteilung interferierte. Wurden die T1389-Kulturen zeitgleich bestrahlt und mit TMZ behandelt, ergab sich ein ähnliches Bild wie für die alleinige Bestrahlung. Dabei lag der Anteil von Zellen in der G2-Phase geringfügig höher (T0/Gy10: 37%, T200/Gy10: 42%) und im Bereich >4n geringfügig niedriger (T0/Gy10: 32%, T200/Gy10: 26%; Abb. 16). Auch die um 24h versetzte TMZ-Zugabe änderte daran wenig, wobei die prozentualen Anteile von Zellen in der G0/G1- und G2-Phase sowie im Bereich >4n mehr den Werten der alleinigen Bestrahlung entsprachen [G0/G1-Phase:

T0/Gy10 20%, T200/Gy10(24h) 18%; S-Phase: T0/Gy10 11%, T200/Gy10(24h) 14%; G2-Phase: T0/Gy10 37%, T200/Gy10(24h) 39%, >4n: T0/Gy10 32%, T200/Gy10(24h) 29%; Abb. 16]. Damit bewirkten alle drei Behandlungsmodi übereinstimmend einen partiellen G2-Arrest und eine Zunahme von Zellen mit einem DNA-Gehalt >4n. Obwohl der Anteil von Zellen in der G2-Phase für T200/Gy10 am höchsten war, ergab sich kein klarer Vorteil für eine bestimmte Behandlung.

In **T1495-Kulturen** verhielt sich die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen ähnlich wie in T1389-Kulturen (Abb. 16). In der DMSO-Kontrolle befanden sich 49% der vitalen Zellen in der G0/G1-Phase, 10% in der S-Phase und 26% in der G2-Phase. Daneben wurde ein Anteil von 15% beobachtet, der einen DNA-Gehalt von >4n enthielt, was wiederum auf Polyploidie oder Aneuploidie hinweisen könnte. Nach der Bestrahlung mit 10 Gy sank der Anteil von Zellen in der G0/G1-Phase auf 28%. Dabei stieg der Anteil von Zellen in der G2-Phase von 26% auf 38%, der im Bereich >4n von 15% auf 26%. Wie schon bei T1389 beobachtet, veränderte sich der Anteil von Zellen in der S-Phase durch die Bestrahlung kaum (Abb. 16). Dies weist darauf hin, dass die Bestrahlung einen partiellen G2-Arrest auslöste und die Zellteilung störte. Wurden die T1495-Kulturen simultan bestrahlt und mit TMZ behandelt, ergab sich ein ähnliches Bild wie für die alleinige Bestrahlung. Dabei lag der Anteil von Zellen in der G2-Phase geringfügig höher (T0/Gy10: 38%, T50/Gy10: 40%) und im Bereich >4n geringfügig niedriger (T0/Gy10: 26%, T50/Gy10: 24%; Abb. 16). Auch die um 24h versetzte TMZ-Zugabe änderte wenig, wobei die prozentualen Anteile von Zellen in der G0/G1- und G2-Phase näher an den Werten der alleinigen Bestrahlung lagen [G0/G1-Phase: T0/Gy10(24h) 28%, T50/Gy10(24h) 33%; S-Phase: T0/Gy10(24h) 9%, T50/Gy10(24h) 10%; G2-Phase: T0/Gy10(24h) 38%, T50/Gy10(24h) 36%; Abb. 16]. Im Bereich >4n lag der prozentuale Anteil mit 20% etwas unter dem Wert, der bei alleiniger Bestrahlung und zeitgleicher Kombinationsbehandlung ermittelt wurde [T0/Gy10(24h): 26%; T50/Gy10: 24%; T50/Gy10(24h): 20%; Abb. 16]. Damit bewirkten alle drei Behandlungsmodi übereinstimmend einen partiellen G2-Arrest und eine Zunahme von Zellen mit einem DNA-Gehalt >4n. Es ergab sich kein klarer Vorteil für eine bestimmte Behandlung.

### Fazit

Insgesamt ergab sich im Hinblick auf die Verteilung der Zellen in die Lebend- bzw. Totfraktion kein einheitliches Bild. Die zusätzliche Gabe sowie der Zeitpunkt der Zugabe von TMZ wirkten sich in Bezug auf die strahleninduzierte Verminderung der Lebend-Zellfraktion bei den drei untersuchten SLGC-Linien unterschiedlich aus. Die detaillierte Analyse der Zellverteilung im Zellzyklus ergab für die beiden untersuchten SLGC-Linien (T1389, T1495) nach allen drei Behandlungsmodi übereinstimmend einen partiellen G2-Arrest und eine Zunahme von Zellen mit einem DNA-Gehalt >4n ohne klaren Vorteil für eine bestimmte Behandlung.

## 5. Diskussion

Glioblastome (GBMs) sind mit einer sehr schlechten Prognose die bösartigsten Tumore des zentralen Nervensystems. Trotz einer multimodalen Therapie, die aus maximal möglicher chirurgischer Resektion, fraktionierter Bestrahlung und einer adjuvanten Chemotherapie mit dem alkylierenden Agens Temozolomid (TMZ) besteht, beträgt die mittlere Überlebenszeit ausgehend vom Zeitpunkt der Diagnosestellung 14,6 Monate (Hegi et al., 2008; Stupp et al., 2009; Stupp et al., 2005). Die derzeitige Standardtherapie ist somit ausschließlich palliativ (Hegi et al., 2008; Stupp und Hegi, 2007). Ursachen für die ausgeprägte Therapieresistenz werden zum einen im infiltrativen Wachstum der GBMs und zum anderen in der Expression des Reparaturenzyms O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) gesehen. Wird MGMT in GBMs exprimiert, entfernt diese Transferase die Alkylgruppen von den durch TMZ gebildeten Methyladdukten in der Tumor-DNA und hebt folglich die zytotoxische Wirkung von TMZ auf (Hegi et al., 2008). Weitere Ursachen für die Therapieresistenz werden vor allem in der Existenz von sog. SLGCs (engl.: *stem-like glioma cells*) gesehen (Huse und Holland, 2010; Schonberg et al., 2013; Van Meir et al., 2010). SLGCs, die Ähnlichkeiten zu adulten neuronalen Stammzellen aufweisen, besitzen die Eigenschaft zur Selbsterneuerung und die Fähigkeit zur Tumorinduktion (Dirks, 2010; Huse und Holland, 2010; Schonberg et al., 2013; Van Meir et al., 2010). Weiterhin wurde beobachtet, dass GBM-Zellen mit Stammzeleigenschaften die Fähigkeit besitzen, strahleninduzierte DNA-Schäden effizient zu reparieren (Bao et al., 2006a). An einem transgenen Mausmodell wurde gezeigt, dass die GBM-Zellen mit Stammzeleigenschaften die TMZ-Behandlung überleben und nachfolgend ein Rezidiv bilden (Chen et al., 2012).

Wegen der ausgeprägten Therapieresistenz und Rezidivbildung unter Standardtherapie wurde versucht, die GBM-Standardtherapie zu optimieren. Dazu wurden die Effekte höherer TMZ-Konzentrationen und eine Ergänzung der Standardtherapie um weitere Medikamente wie MGMT-, PARP-1- oder Tyrosinkinaseinhibitoren sowie Interferon- $\beta$  in klinischen Studien analysiert (Ohka et al., 2012). Bislange konnte jedoch keine dieser Modifizierungen eine deutliche Lebenszeitverlängerung der Patienten bewirken. Nicht geklärt ist weiterhin, ob der Zeitpunkt der TMZ-Gabe in Relation zur Bestrahlung eine Rolle spielt. In mehreren Studien wurden nach der sechswöchigen adjuvanten Radiochemotherapie unterschiedliche TMZ-Behandlungsregime getestet (Ohka et al., 2012). Der Vergleich einer intensivierten TMZ-Therapie (RTOG 0525/EORTC 26052-22053-Studie) im Sinne einer 21-tägigen TMZ-Behandlung mit nachfolgender siebentägiger Behandlungspause (insgesamt 28-tägiger Zyklus) nach erfolgter adjuvanter Therapie erbrachte keinen Vorteil. In Abhängigkeit vom Fortschreiten der Tumorerkrankung während der adjuvanten Thera-

pie wurde in einer weiteren Studie (RESCUE-Studie) eine kontinuierliche TMZ-Gabe über maximal 12 Monate untersucht. Die Patienten wurden hierzu in drei Gruppen gemäß des Progresses ihrer Erkrankung während der adjuvanten Therapie eingeteilt (früher oder später Progress der Tumorerkrankung bzw. Progress nach einem behandlungsfreien Intervall). Es wurde jedoch kein eindeutiger Vorteil im Vergleich zur Standardradiochemotherapie beobachtet, insbesondere vor dem Hintergrund, dass die einzelnen Gruppen unterschiedlich auf die kontinuierliche TMZ-Gabe ansprachen. Ebenfalls keinen Vorteil erbrachte eine einwöchige TMZ-Therapie im Wechsel mit einer einwöchigen Behandlungspause über 12 Monate (NOA-08-Studie) (Ohka et al., 2012). Zudem wäre es denkbar, dass die Strahlentherapie durch die Induktion eines Zellzyklusarrestes die Sensitivität der Gliomzellen für die adjuvante TMZ-Therapie senkt. Dieser Aspekt wäre insbesondere im Hinblick auf die Therapiesensitivität der SLGCs bedeutend, da bei guter TMZ-Sensitivität möglicherweise nicht das beste Behandlungsergebnis erzielt werden kann. Weiterhin ist unklar, ob SLGCs verschiedener Patienten einheitlich auf die Bestrahlung reagieren und welchen Beitrag TMZ zum Effekt der Bestrahlung auf die Proliferation und Vitalität dieser SLGCs bringt. Die hier untersuchten SLGC-Linien sind gut charakterisiert (Tab. 1; Tab. 9; Choschick et al., 2014). So liegen Daten über den PTEN (Phosphatase und Tensin-Homolog)-, p53- und MGMT-Status vor (Tab. 9). Auch der Grad des Stammzellcharakters wurde mit Hilfe mehrerer SLGC-Marker, darunter das Intermediärfilament Nestin, die Transkriptionsfaktoren Sox2 [engl.: *sex determining region Y (SRY)-box 2*], Oct4 und Nanog sowie die Zelloberflächenproteine CD15/SSEA-1 (engl: *stage-specific embryonic antigen 1*), CD49f/Integrin- $\alpha 6$  und CD133/Prominin-1, ermittelt.

In dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob die Proliferation und Vitalität von SLGC-Linien, die aus verschiedenen Patienten stammen, durch vergleichbare Strahlendosen gehemmt werden können. Dazu wurden Dosiswirkungskurven erstellt. Ferner wurde analysiert, ob ein Zusammenhang zwischen der Strahlensensitivität und dem Phänotyp der SLGCs (in Abhängigkeit vom Wachstumsverhalten und der Expression von CD133, PTEN, p53 und Sox2) existiert. Diese beiden Aspekte werden in Abschnitt 5.1 besprochen. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Applikation von TMZ den Effekt ionisierender Strahlung auf die Proliferation und die Vitalität in SLGCs moduliert und insbesondere, ob TMZ die SLGCs radiosensitiver macht. Dies wird in Abschnitt 5.2 diskutiert. Abschließend wurde der Frage nachgegangen, ob die unmittelbare Koapplikation von ionisierender Strahlung und TMZ effizienter als eine zeitlich versetzte Behandlung ist. Dabei wurden die Effekte einer um 24h versetzten TMZ-Gabe in Relation zur zeitgleichen Behandlung (Bestrahlung und TMZ-Gabe) untersucht. Im Fokus standen hier die SLGC-Linien, die in den vorangegangenen Analysen ein gutes Ansprechen gegenüber der Bestrahlung und/oder TMZ zeigten. Dies wird in Abschnitt 5.3 besprochen.

## 5.1. Dosiswirkungskurven ionisierender Strahlung

Um zu untersuchen, ob die aus verschiedenen Patienten gewonnenen SLGC-Linien im Hinblick auf die Proliferation und Vitalität durch vergleichbare Strahlendosen gehemmt werden, wurden Dosiswirkungskurven erstellt. Neun ausgewählte SLGC-Linien wurden mit Dosen von 2, 5, 10 und 20 Gray (Gy) bestrahlt. Um die Effektivität der Therapie hinsichtlich einer Proliferations- und Vitalitätsreduktion der SLGCs bewerten zu können, wurde für jede SLGC-Linie die Effektivdosis 50 ( $ED_{50}$ ) bestimmt.

Die Experimente ergaben, dass die Proliferation bei sieben von acht SLGC-Linien durch die Bestrahlung reduziert wurde, jedoch in unterschiedlich starkem Ausmaß. Bei T1440 wurde keine Responsivität beobachtet. Bei den übrigen sieben SLGC-Linien variierte die  $ED_{50}$  in Hinblick auf die Inhibition der Proliferation zwischen den einzelnen SLGC-Linien sehr stark. Bei zwei SLGC-Linien (T1338, T1522) wurde die  $ED_{50}$  bereits bei 2 Gy erreicht, bei drei SLGC-Linien (T1371, T1442, T1495) wurde eine Strahlendosis von 10 Gy benötigt. 20 Gy waren bei zwei weiteren SLGC-Linien (T1389, T1447) erforderlich, um die  $ED_{50}$  zu erreichen (Tab. 9).

Auch der Vitalitätstest (MTT-Assay) bestrahlter SLGC-Kulturen ergab ein heterogenes Bild. Bei zwei SLGC-Linien (T1440, T1452) wurde die Vitalität durch steigende Strahlendosen nicht beeinflusst. Die übrigen sieben SLGC-Linien zeigten nach Bestrahlung mit steigenden Dosen eine Abnahme der Vitalität, ohne dass jedoch die  $ED_{50}$  erreicht wurde. Dabei wurde eine signifikante Reduktion der Vitalität im Vergleich zur Kontrolle bei zwei SLGC-Linien (T1447, T1522) schon mit 2 Gy erreicht. Höhere Dosen von 5 Gy waren bei T1389 bzw. von 10 Gy bei T1371 und T1442 erforderlich. Bei zwei SLGC-Linien (T1338, T1495) waren 20 Gy notwendig, um überhaupt eine signifikante Reduktion der Vitalität zu erzielen (Tab. 9).

In der Literatur sind lediglich Versuchsreihen mit jeweils einer einzelnen Strahlendosis (2, 5 bzw. 20 Gy) beschrieben (Afshar et al., 2006; Bao et al., 2006a; McCord et al., 2009). Dosiswirkungskurven, wie in dieser Arbeit durchgeführt, wurden bislang nicht publiziert. Eine Arbeitsgruppe beschrieb, dass die Bestrahlung mit 5 Gy bei CD133-positiven SLGCs im Vergleich zu CD133-negativen SLGCs über die Induktion eines Zellzyklusarrestes die vermehrte Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen auslöste. Die Induktion des programmierten Zelltodes wurde dabei nicht beobachtet (Bao et al., 2006a). Afshar et al. (2006) beschrieben, dass mit 20 Gy in Abhängigkeit vom p53-Status sowohl Apoptose als auch Reparaturmechanismen ausgelöst werden können. Andererseits wurde beobachtet, dass bei einer Bestrahlung mit 2 Gy CD133-positive SLGCs im Vergleich zu etablierten Gliomzelllinien wie U87 radiosensitiver sind (McCord et al., 2009). Als Ursache hierfür wurden weniger effiziente DNA-Reparaturmechanismen in den SLGCs vermutet,

die aus DNA-Schäden während der Tumorgenese resultieren könnten (Bartek et al., 2007; McCord et al., 2009). Es wird daher davon ausgegangen, dass die *in vitro* Experimente mit etablierten Gliomzelllinien wie U87 nicht die Effekte der Bestrahlung auf native Gliomzellen *in situ* widerspiegeln (McCord et al., 2009). Generell legen die genannten Studien die Vermutung nahe, dass die Bestrahlung durch die Induktion eines Zellzyklusarrestes die Proliferation von SLGCs und etablierten Gliomzelllinien reduziert, die Vitalität in SLGC-Linien jedoch weniger stark beeinflusst. In dieser Arbeit wurde nach einer Bestrahlung mit 10 Gy ein partieller Zellzyklusarrest in der G2-Phase festgestellt. Es wurde jedoch auch eine Zunahme der Zellzahl mit einem DNA-Gehalt  $>4n$  beobachtet, was auf eine Polyploidie oder Aneuploidie hinweisen könnte. Wie in den oben zitierten Studien wurde auch in dieser vorliegenden Arbeit durch die Bestrahlung die Proliferation stärker als die Vitalität beeinflusst.

Als Ursachen für die Radioresistenz von GBMs werden verschiedene Aspekte diskutiert. Bao et al. (2006a) vermuteten bei SLGCs die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen über die Phosphorylierung der Serin-Proteinkinase ATM (engl.: *ataxia-teleangiectasia-mutated*) und der Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 als Ursache für die Radioresistenz. Ein weiterer wichtiger Faktor im Hinblick auf die Radioresistenz schien der Tumorsuppressor p53 zu sein. Lag in SLGCs ein Wildtyp p53 (wtp53) vor, induzierte die Bestrahlung die Aktivierung der transkriptionellen Aktivität von p53, die wiederum über eine Aktivierung von p21<sup>Cip1/WAF1</sup> zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase führte (Abbas und Dutta, 2009). Aktuell werden in unserem Labor die Aktivierung der Kinase ATM, der Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 sowie die Aktivierung von p53 und Rad51 in zwei parallelen Dissertationen untersucht, die kurz vor dem Abschluss stehen. Auf diese Daten wird nur am Rande eingegangen, da diese Kinase-Kaskaden und Reparatursysteme nicht Bestandteil meiner Arbeit sind. In den beiden erwähnten Dissertationen wurde ebenfalls eine effiziente Induktion der Kinase ATM in den SLGC-Linien T1371 und T1495 detektiert (C. Zechel; persönliche Mitteilung), die beide mutierte p53-Gene und zwar sog. *gain of function (GOF)*-Mutanten enthalten (Bachelorarbeit C. Geisler, 2015). Weiterhin wurden die Aktivierung der Checkpointkinase Chk1 und die Beeinflussung des Rad51-Levels beobachtet. Die Bedeutung eines mutierten p53 (mutp53) scheint dabei in der verzögerten Aktivierung von p53 und der durch p53 regulierten Prozesse zu liegen (C. Zechel; persönliche Mitteilung).

Eine weitere Ursache für die ausgeprägte Therapieresistenz der SLGCs ist in deren Stammzeleigenschaften zu sehen. Der Transkriptionsfaktor Sox2 ist für die Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften von Bedeutung (Alonso et al., 2011; Guo et al., 2011). 2012 wurde an einem transgenen Mausmodell nach einer Ganzhirnbestrahlung mit 10 Gy beobachtet, dass sowohl der Wnt-Signalweg als auch die Expression von Sox2 für die Radioresistenz der GBMs mitverantwortlich

sind (Kim et al., 2012). Die Expression von Sox2 war in allen in der hier vorliegenden Arbeit analysierten SLGC-Linien nachweisbar (Choschick et al., 2014; nicht publizierte Daten unseres Labors). Eine Korrelation zwischen der Stärke der Expression und der für die ED<sub>50</sub> erforderlichen Strahlendosis war jedoch nicht eindeutig erkennbar (Tab. 9). So waren beispielsweise bei den SLGC-Linien mit einer starken Sox2-Expression (T1389, T1440, T1452, T1522) je nach Linie Strahlendosen zwischen 2 Gy (z.B. T1522) und 20 Gy (z.B. T1389) erforderlich. Auf diesen Aspekt wird später noch detailliert eingegangen.

Die Rolle des Zelloberflächenproteins CD133 als SLGC-Marker ist umstritten (siehe Kapitel 2.7). In dieser Arbeit war zwischen dem Ansprechen der untersuchten SLGC-Linien auf die Bestrahlung und dem jeweiligen Gehalt an CD133-positiven Zellen kein eindeutiger Zusammenhang erkennbar (Tab. 9). So sprach die SLGC-Linie T1338 im Hinblick auf die Beeinflussung der Vitalität trotz geringem Anteil an CD133-positiven Zellen ( $\leq 5\%$ ) schlecht auf die Bestrahlung an, die SLGC-Linie T1442 mit hohem Anteil an CD133-positiven Zellen (37%) jedoch ebenfalls. In Bezug auf den antiproliferativen Effekt zeigten sowohl T1338 als auch T1522 ein gutes Ansprechen auf die Bestrahlung, wenngleich T1338 einen geringen Anteil ( $\leq 5\%$ ), T1522 jedoch einen hohen Anteil (35%) an CD133-positiven Zellen enthielt. Dies wäre nach den Analysen von Bao et al. (2006a) nicht zu erwarten gewesen. Diese Arbeitsgruppe postulierte, dass CD133-positive Zellen effektiver DNA-Reparaturmechanismen induzieren, geringere Apoptoseraten aufweisen und somit die Bestrahlung besser überleben. Demnach wäre bei T1522 insgesamt ein schlechteres, bei T1338 ein besseres Ansprechen auf die Bestrahlung zu erwarten gewesen. In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass sich der Anteil an CD133-positiven Zellen in einer SLGC-Kultur mit der Zeit ändern kann, wobei es in späteren Passagen meist zu einer Abnahme des Anteils an CD133-positiven Zellen kommt (Dissertation I. Choschick; unpublizierte Daten des Labors). In den hier diskutierten Experimenten wird stets auf den Gehalt an CD133-positiven Zellen Bezug genommen, der zum Zeitpunkt der Analyse in den Kulturen präsent war.

Ähnlich stellten sich die Ergebnisse bei den beiden GSarc-abgeleiteten SLGC-Linien T1371 (21% CD133-positive Zellen) und T1447 (13% CD133-positive Zellen) dar. Bei T1371 wurde die ED<sub>50</sub> in Bezug auf die Proliferation mit  $\leq 10$  Gy und bei T1447 mit  $\leq 20$  Gy erreicht, unabhängig vom Anteil an CD133-positiven Zellen. Die Vitalität wurde bei T1447 bereits mit 10 Gy um 48% reduziert. Trotz des großen Anteils an CD133-positiven Zellen (37%) sprach T1442 gut auf die Bestrahlung an, während im Gegensatz dazu bei T1440 (11% CD133-positive Zellen) die Bestrahlung weder einen Proliferations- noch Vitalitäts-reduzierenden Effekt hatte. Die SLGC-Linie T1452 (45% CD133-positive Zellen), die nach den Maßstäben einer Vielzahl von Forschergruppen als *bona fide* SLGC-Linie betrachtet werden kann, da sie als einzige der untersuchten Linien sphärisch wächst,

Tumore induziert und einen hohen Anteil an CD133-positiven Zellen aufweist (Choschzick et al., 2014), erwies sich in Übereinstimmung mit den Daten von Bao et al. (2006a) als sehr strahlenresistent. Durch die Bestrahlung wurden weder die Proliferation noch die Vitalität dieser SLGC-Linie gehemmt (Tab. 9). Insgesamt bestätigen die in dieser Arbeit beobachteten Auswirkungen der Bestrahlung auf die Proliferation und Vitalität von SLGC-Kulturen in Relation zum Anteil CD133-positiver Zellen die Ergebnisse von Bao et al. (2006a) nur zum Teil, da nicht nur die SLGC-Linien mit einem hohen Anteil an CD133-positiven Zellen eine ausgeprägte Radioresistenz aufwiesen. Allerdings wird die Bedeutung des Oberflächenproteins CD133 als SLGC-Marker zunehmend kritisch gesehen. So gewannen Chen et al. (2010) Evidenzen dafür, dass nicht die Tumorstammzelle (Typ I-Zelle) CD133-positiv ist, sondern dass Gliomzellen eine Differenzierung von einem CD133-negativen zu einem CD133-positiven Progenitor (Typ II-Zelle) durchlaufen, um dann weiter in CD133-negative Typ III-Zellen zu differenzieren. Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Tumorduktion wurde für Typ I-, Typ II- und Typ III-Zellen beobachtet und war somit unabhängig vom CD133-Status. Am „unteren“ Ende dieser Hierarchie steht die Differenzierung der Typ III-Zelle in eine Gliomzelle, die sich nicht mehr selbst erneuern kann (Chen et al., 2010).

Auch das sphärische Wachstum von Gliomzellen scheint im Gegensatz zu früher publizierten Daten kein überzeugender SLGC-Marker zu sein (Schonberg et al., 2013) und erlaubt daher keine Prognose über die Strahlenresistenz. Zwar reagierte die sphärisch wachsende SLGC-Linie T1452 nicht auf die Bestrahlung mit Dosen bis zu 20 Gy, jedoch zeigten andere SLGC-Linien mit hohem Anteil an Sphären oder einem ähnlichen Wachstumsverhalten deutlich verschiedene Reaktionen auf identische Strahlendosen. So wiesen zum Beispiel die SLGC-Linien, die adhärente Aggregate bilden (T1338, T1371, T1389, T1447, T1495) eine ED<sub>50</sub>-Proliferation von  $\leq 2$  Gy bis 20 Gy auf. Für die zwei SLGC-Linien mit vollständig adhärentem Wachstum (T1440, T1522) wurde ein unterschiedliches Ansprechen auf die Bestrahlung beobachtet (Tab. 1, Kapitel 3.1; Tab. 9). Während die Bestrahlung mit allen untersuchten Strahlendosen keinen Effekt auf die SLGC-Linie T1440 hatte, wurde bei der Linie T1522 bereits ein deutliches Ansprechen auf die ionisierende Strahlung mit 2 Gy beobachtet. Bei allen Interpretationen, die das Wachstumsverhalten der SLGCs einbeziehen, muss zudem beachtet werden, dass sich die Sphärenbildung auf die Differenzierung und Vitalität von SLGCs auswirken kann. So kann davon ausgegangen werden, dass bei großen Sphären und Aggregaten die Versorgung von Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen im Innern dieser Strukturen reduziert ist. Insbesondere die Hypoxie im Innern der Sphären könnte kritisch sein, da dieser Parameter sowohl die Stabilität des Genoms als auch den Stammzellstatus beeinflusst (Lathia et al., 2011; Persano et al., 2011). Im Folgenden sollen die Parameter Stammzellstatus, p53- und PTEN-Status sowie die Strahlenresistenz genauer für die einzelnen Zelllinien diskutiert werden. Dazu wird auf Tab. 9 Bezug genommen.

**Tab. 9: Eigenschaften der untersuchten SLGC-Linien und Effektivität von alleiniger Bestrahlung und TMZ-Behandlung**

SLGC-Linie	MGMT-Status	p53 Status Expression	CD133	PTEN	Sox2	BrdU-Elisa		MTT-Assay	
						TMZ EC <sub>50</sub>	ED <sub>50</sub>	TMZ EC <sub>50</sub>	ED <sub>50</sub>
T1338	m	mut\$. /(-)	< 5%	-	(-/ +)	<25µM	≤ 2Gy	100µM	n.e.
T1371	u	R175H / +	21%	-	+	≥200µM	≤ 10Gy	≥300µM	n.e.
T1389	u	mut. / +	11%	-	+++	200µM	20Gy	≥200µM	> 20 Gy
T1440	m	wt / (-)	11%	++	+++	≤25µM	n.e.	100µM	n.e.
T1442	m/u	wt / (-)	37%	-	+	100µM	≤ 10Gy	≥100µM	n.e.
T1447	m/u	mut. / +	13%	-	+	<100µM	≤ 20Gy	100µM	n.e.
T1452	m/u	mut. <sup>RNA</sup> / +	45%	++	+++	#	#	≤100µM	n.e.
T1495	m/u	R273H / +++	15%	++	+	≥100µM	≤ 10Gy	≤200µM	n.e.
T1522	m/u	wt / (-)	35%	-	+++	<200µM	≤ 2 Gy	≤200µM	> 20 Gy

MGMT: O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; m: methyliert; u: nicht methyliert; m/u: gemischter Status; CD133 (engl.): cluster of differentiation 133; PTEN: Phosphatase und Tensin-Homolog; Sox2: engl.: sex determining region Y (SRX)-Box 2; BrdU: 5-Brom-2-desoxyuridin; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; #: T1452 konnte aufgrund des sphärischen Wachstums nicht mittels BrdU-ELISA untersucht werden; n.e.: nicht erreicht; n.u.: nicht untersucht; mut.: mehrere Einzel-Nukleotidaustausche in Bereich von Exon 5 bis Exon 7; mut\$: monoallelische Veränderungen in einer Subpopulation von Zellen; mut.<sup>RNA</sup>: atypische p53 mRNA; R175H: Aminosäurerest Arginin 273 durch Histidin ersetzt; R273H: Aminosäurerest Arginin 273 durch Histidin ersetzt; wt: Wildtyp; (-) bzw. - : Expression unterhalb der Nachweisgrenze des Antikörpers; +, ++, +++ : Stärke der Expression; EC<sub>50</sub>: Effektivkonzentration 50; ED<sub>50</sub>: Effektivdosis 50; Gy: Gray; T: Tumor; TMZ: Temozolomid;

Anmerkung: Die hier angegebenen EC<sub>50</sub>-Werte für TMZ basieren auf mehreren unabhängigen Experimenten, so dass es zu Variationen zwischen der in dieser Arbeit mit TMZ erzielten Wirkung (siehe Graphen) und den im Labor gültigen EC<sub>50</sub>-Werten kommen konnte.

### 5.1.1. Strahlensensitivität der SLGC-Linien in Bezug zu deren Eigenschaften

Insgesamt zeigten die untersuchten SLGC-Linien mit einer Ausnahme (T1440) in Bezug auf die Inhibition der Proliferation ein gutes Ansprechen auf die Bestrahlung. Da die Anwesenheit des Tumorsuppressors PTEN (Phosphatase und Tensin-Homolog) mit einem verbesserten Überleben von Glioblastompatienten assoziiert zu sein scheint (Ang et al., 2010), stellt sich die Frage, ob dieser Aspekt eine Rolle spielen könnte. In der Tat ist T1440 eine der wenigen von mir untersuchten SLGC-Linien mit einer PTEN-Expression. Neben T1440 wiesen auch die SLGC-Linien T1452 und T1495 eine PTEN-Expression auf (Tab. 9). Die ED<sub>50</sub>-Proliferation und die ED<sub>50</sub>-Vitalität lagen für T1440 und T1452 über 20 Gy, nicht so jedoch die ED<sub>50</sub>-Proliferation von T1495 (≤ 10 Gy). Umgekehrt fanden sich unter den SLGC-Linien mit guter und schlechter Strahlenresponsivität solche mit fehlender PTEN-Expression. Damit lassen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zum anti-proliferativen Effekt der Bestrahlung keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem PTEN-Status einer SLGC-Linie und ihrem jeweiligen Grad der Radioresistenz erkennen. Folglich müssen andere Faktoren und Mechanismen in Hinblick auf die Proliferation und die Vitalität für das Verhalten der SLGC-Linien eine Rolle spielen. Zheng et al. (2008) wiesen einen Zusammenhang zwischen p53- und PTEN-Mutationen nach. Eine Assoziation von fehlender PTEN-Expression und

Mutation des Tumorsuppressors p53 führte in jenen Analysen zu einer gesteigerten c-Myc-Aktivität (Zheng et al., 2008). Mit dieser war eine gesteigerte Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Erhaltung des tumorigenen Potentials assoziiert (Zheng et al., 2008). Ein solcher Zusammenhang war jedoch für die in dieser Arbeit untersuchten SLGC-Linien nicht erkennbar. Beispielsweise wies die SLGC-Linie T1452, die im Vitalitäts-Assay nicht auf die Bestrahlung ansprach, zwar eine Mutation von p53 auf, exprimierte jedoch PTEN. Die PTEN-Expression war in T1495-Kulturen, die im BrdU-ELISA ein gutes Ansprechen auf die Bestrahlung zeigten, sich jedoch im Vitalitäts-Assay als strahlenresistent erwiesen, ebenfalls mit einer p53-Mutation assoziiert. Ein wtp53-Status bei fehlender PTEN-Expression lag dagegen bei der SLGC-Linie T1442 vor, die im BrdU-ELISA ein gutes Ansprechen, im Vitalitäts-Assay hingegen kein Ansprechen auf die Bestrahlung aufwies. Dabei war insgesamt das Ansprechen von T1442 und T1495 auf die Bestrahlung durchaus vergleichbar, während T1452 sich als strahlenresistent erwies (Tab. 9). Die im Labor gewonnenen Daten zum p53-Status stützten sich auf Expressions- und Sequenzanalysen. Abschließend sei hier bemerkt, dass das Fehlen bzw. eine Mutation von PTEN in SLGCs zu einer vermehrten Aktivierung des AKT-Signalweges und über diesen zu einer verstärkten Radio- und Chemoresistenz der SLGCs führte (Bleau et al., 2009; Hu et al., 2005).

Grundsätzlich ist zu erwarten, dass die Bestrahlung eine Aktivierung des Tumorsuppressors p53 bewirkt, der als Transkriptionsfaktor über die Aktivierung des p53-Zielgens p21<sup>Cip1/WAF1</sup> einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase induziert (Abbas und Dutta, 2009). Weiterhin kann p53 die Apoptose und Seneszenz von Zellen regulieren (Biegging et al., 2014; Kreis et al., 2014). Die Apoptose kann durch die Aktivierung von p53-abhängigen und p53-unabhängigen Signalwegen ausgelöst werden (Kreis et al., 2014). Auf den ersten Blick war das Ansprechen der in dieser Arbeit untersuchten SLGC-Linien in Bezug auf den antiproliferativen Effekt unabhängig vom p53-Status. Die sog. „*gain of function*“-Mutanten (T1371; T1495) reagierten ähnlich auf die Bestrahlung wie die SLGC-Linie T1442, die einen wtp53-Status aufwies (ED<sub>50</sub>-Proliferation ≤ 10 Gy bei allen drei SLGC-Linien; Tab. 9). Auch die Reduktion der Vitalität schien unabhängig vom p53-Status. Die beiden SLGC-Linien (T1389, T1522), bei denen die ED<sub>50</sub>-Vitalität knapp erreicht wurde, wiesen einen unterschiedlichen p53-Status auf (T1389: mutp53; T1522: wtp53). Detaillierte Analysen von M. Dahlke im Labor ergaben ein differenzierteres Bild. So scheint es in T1495-Kulturen (mutp53), im Vergleich zur wtp53-Linie U87, zu einer starken zeitlichen Verzögerung der Aktivierung von p21<sup>Cip1/WAF1</sup> nach Bestrahlung zu kommen, während bei der SLGC-Linie T1371 die Induktion von p21<sup>Cip1/WAF1</sup> sogar nahezu fehlte. Auch die Erhöhung des p53-Levels erfolgte effizienter in T1495- als in T1371-Kulturen und war deutlich effizienter in U87-Kulturen (M. Dahlke, E. Hirseland, C. Zechel; Manuskript in Vorbereitung). In Übereinstimmung mit dem Konzept von Afshar et al. (2006) wurden in unserem Labor für einige SLGC-Linien mit mutp53 sowohl vor als auch nach Bestrahlung höhere

p53-Proteinlevel beobachtet als bei SLGC-Linien mit wtp53. Im Falle der Analysen von Afshar et al. (2006) resultierte die Mutation im p53-Gen in einer Caspase-8 vermittelten Apoptose und verhinderte einen frühen Zellzyklusarrest.

Weder die Expression von CD133 noch die von p53 oder PTEN konnten die gewonnenen Ergebnisse zur Radiosensitivität hinreichend erklären. Es fiel jedoch auf, dass alle untersuchten SLGC-Linien in unterschiedlichem Ausmaß Sox2 exprimierten. Der Transkriptionsfaktor Sox2 ist für die Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften von Bedeutung und könnte durchaus mit der Ausbildung einer Radioresistenz der GBMs assoziiert sein (Alonso et al., 2011; Guo et al., 2011; Kim et al., 2012). Diese Tatsache könnte das ausgeprägte Resistenzverhalten von T1440 und T1452 erklären. Die Glioblastomlinie T1452 gilt in vieler Hinsicht als *bona fide* SLGC-Linie. Neben dem charakteristischen sphärischen Wachstum exprimiert T1452 Nestin, CD133 (45%) und PTEN, jedoch nur wenig saures Gliafaserprotein (GFAP). T1440 hingegen weist neben einem rosettenähnlichen adhärenenten Wachstum eine sehr starke GFAP-Expression auf und es liegt wtp53 vor; diese Linie exprimiert jedoch CD133 (11%) schwächer als T1452 (Tab. 9). Aber auch SLGC-Linien mit guter Responsivität auf die Bestrahlung wie z.B. T1522 zeigten hohe Sox2-Level (Tab. 9). Die ED<sub>50</sub>-Proliferation für die Bestrahlung war zudem in SLGC-Linien mit etwas niedrigeren aber ähnlichen Sox2-Leveln (T1371, T1442, T1447 und T1495) verschieden. So zeigten zwar T1371 und T1442 eine ähnliche ED<sub>50</sub>-Proliferation ( $\leq 10$  Gy), für T1447 lag sie jedoch bei  $\leq 20$  Gy. Somit stellt neben dem p53- und dem PTEN-Status auch das Sox2-Expressionslevel kein verlässliches prognostisches Kriterium für die Radiosensitivität der SLGC-Linien dar. Es könnte aber durchaus ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren vorliegen, die mit dem Stammzellstatus assoziiert sind, darunter die Expression der Transkriptionsfaktoren Sox2 und c-Myc, der Anteil CD133- und CD15-positiver Zellen und das Sphärenwachstum (Huse und Holland, 2010; Schonberg et al., 2013). Um Aussagen über den Beitrag der einzelnen Faktoren zum Gesamtbild zu erhalten, müssten einzelne Faktoren durch geeignete Techniken (z.B. gezielter „Knock-down“ oder „Knock-out“) manipuliert werden. Auch micro-RNAs könnten eine Rolle spielen (Jun et al., 2015; Lee et al., 2014; Liu et al., 2014; Luo et al., 2015), was aber in dieser Arbeit experimentell nicht untersucht wurde.

In diesem Zusammenhang soll außerdem die Expression des Intermediärfilamentes GFAP kurz betrachtet werden. GFAP ist ein Marker für adulte neurale Stammzellen (adNSCs) (Morshead und van der Kooy, 2004). Zusammen mit dem rosettenähnlichen Wachstum, welches typischerweise nur bei bestimmten und undifferenzierten neuronalen Zellen auftritt, wäre es denkbar, dass die starke GFAP-Expression der Zellen der T1440-Kultur anzeigt, dass sich diese SLGC-Linie von adNSCs ableitet (Choschick et al., 2014). In der Gliomforschung hingegen wird die GFAP-Expression in SLGCs meist als ein Zeichen von Differenzierung angesehen (Singh et al., 2004; Yuan

et al., 2004). Somit könnte die GFAP-Expression der hier untersuchten SLGC-Linien einerseits eine partielle Differenzierung der Kulturen in astrozytäre Phänotypen bedeuten, oder aber die GFAP-Expression würde andererseits, wie vermutlich im Falle von T1440, den Herkunftszelltyp der Gliome anzeigen. Ähnliches wurde bereits 1971 von Eng et al. formuliert. In der vorliegenden Arbeit wurde keine erkennbare Korrelation zwischen der ED<sub>50</sub>-Proliferation und dem GFAP-Expressionslevel beobachtet, da sich zwar die stark GFAP-positive T1440-Kultur als radioresistent erwies, jedoch die GFAP-positive T1495-Kultur und die nahezu GFAP-defiziente SLGC-Linie T1389 eine ähnliche ED<sub>50</sub>-Proliferation und ED<sub>50</sub>-Vitalität nach Bestrahlung aufwiesen (Tab. 1; Tab. 9).

Bei den untersuchten SLGC-Linien wurde in Bezug auf den antiproliferativen Effekt bei sieben von acht Linien durch die alleinige Bestrahlung die ED<sub>50</sub> erreicht, in Bezug auf die Vitalitätsreduktion jedoch bei keiner der untersuchten SLGC-Linien. Folglich hatte die Bestrahlung primär einen antiproliferativen Effekt auf SLGC-Linien, während die Vitalität nur geringfügig beeinträchtigt wurde. Tendenziell kann aber festgestellt werden, dass eine SLGC-Linie sich umso resistenter darstellte, je mehr Kriterien einer *bona fide* SLGC erfüllt waren (hohe Sox2-Level, großer Anteil CD133-positiver Zellen, Sphärenwachstum). Wie oben erwähnt bleibt jedoch fraglich, ob diese Stammzeleigenschaften für die Resistenz der SLGC-Linien verantwortlich sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit maximal verwendete Strahlendosis, die als Einzeldosis appliziert wurde, betrug 20 Gy. Grundsätzlich müsste jedoch eine Strahlendosis von 23 Gy appliziert werden, um eine vergleichbare Wirksamkeit zum Schema von Stupp et al. (2005; 5x2Gy/Woche; Gesamtdosis 60 Gy) zu erzielen. So würde die Applikation von 23 Gy als Einzeldosis einer Äquivalentdosis von 63 Gy in 2 Gy Fraktionen entsprechen (Brenner et al., 1998). Folglich ist zu überlegen, ob die Einzeldosis zu gering gewählt wurde. Weiterhin muss bedacht werden, dass die Ergebnisse einer Einzeitbestrahlung von Gliomzellen *in vitro* generell nur bedingt mit dem Ergebnis einer fraktionierten Bestrahlung am Patienten verglichen werden können. Zudem muss berücksichtigt werden, dass Zellen, die sich in einer strahlenresistenten Zellzyklusphase befinden, durch eine fraktionierte Bestrahlung im Bestrahlungsintervall in eine strahlensensiblere Zellzyklusphase - wie die M- oder G2-Phase - übergehen können (Pajonk et al., 2010). Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Einzeitbestrahlung in einer strahlenresistenten Zellzyklusphase befinden, können somit durch diese Methode nur bedingt beeinträchtigt werden. Ein Nachteil der fraktionierten Bestrahlung stellen die Repopulationsvorgänge und die aktivierten Reparaturmechanismen im Bestrahlungsintervall dar, die wiederum die Strahlenresistenz erhöhen (Pajonk et al., 2010). Folglich wäre es denkbar, dass höhere Strahlendosen beziehungsweise eine wie auch schon in mehreren Phase I-Studien erfolgreich getestete Hypofraktionierung erfolgversprechender sind (Ammirati et al., 2014; Jastaniyah et al., 2013; Monjazeb et al., 2012; Rycaj und Tang, 2014; Ryu et al., 2014).

## 5.2. Effekt von ionisierender Strahlung in Anwesenheit von TMZ

In mehreren publizierten Studien wurden Evidenzen dafür gewonnen, dass SLGCs durch eine ausgeprägte Radio- und Chemoresistenz für den fehlenden Heilungserfolg bei GBM-Patienten verantwortlich sind (Bao et al., 2006a; Schonberg et al., 2013). Nur ein kleiner Teil der in dieser Arbeit untersuchten SLGC-Linien wies eine gute Responsivität gegenüber der Bestrahlung auf. Es war daher naheliegend zu untersuchen, ob die Doppelbehandlung von SLGCs mit ionisierender Strahlung und TMZ den Effekt der alleinigen Bestrahlung steigert, das heißt, ob TMZ die SLGCs radiosensitiver macht. Umgekehrt stellte sich natürlich auch die Frage, ob die Bestrahlung die SLGCs für die TMZ-Behandlung sensitiviert. Um diese Sachverhalte zu untersuchen, wurde in Anwesenheit einer definierten TMZ-Konzentration eine Bestrahlung mit 2, 5, 10 und 20 Gy durchgeführt. Die eingesetzte TMZ-Konzentration wurde zuvor durch Kollegen im Labor ermittelt, die hierzu Dosiswirkungskurven erstellten (Bachelor- und Masterarbeiten im Labor). Da TMZ in DMSO gelöst vorlag, wurde stets eine Kontrollprobe zusätzlich zur Bestrahlung mit DMSO behandelt, um einen möglichen zytotoxischen Effekt dieses Lösungsmittels beurteilen zu können.

Die Empfindlichkeit von CD133-negativen und CD133-positiven SLGCs auf TMZ wird kontrovers diskutiert. So gibt es Untersuchungen, die eine höhere TMZ-Resistenz für CD133-positive Zellen ergaben (Liu et al., 2006; Schonberg et al., 2013), aber auch eine Publikation, die eine präferentielle Eliminierung der CD133-positiven Zellen beschreibt (Beier et al., 2008). Bei diesen Untersuchungen wurde das Differenzierungsstadium der SLGC-Kulturen außer Acht gelassen und die CD133-positive Zelle mit der Gliomstammzelle gleichgesetzt. Nach den oben erwähnten Analysen von Chen et al. (2010) kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Gliomstammzelle CD133-negativ ist, jedoch in eine CD133-positive Typ II-Zelle differenzieren kann, die dann wiederum in CD133-negative Typ III-Zellen weiter differenziert. Daher ist unklar, ob die von Beier et al. (2008) beobachtete präferentielle Eliminierung von CD133-positiven Zellen eine TMZ-vermittelte Eliminierung von Typ II-Zellen zugunsten von Typ I-Zellen oder Typ III-Zellen anzeigt. In einem transgenen Mausmodell wurde jedoch überzeugend gezeigt, dass die Stammzell-ähnlichen Zellen im GBM die TMZ-Behandlung überleben (Chen et al., 2012).

In etwa 70% der GBMs wird MGMT exprimiert, das in seiner Funktion als DNA-Reparaturenzym den Effekt des TMZ neutralisiert, da es die Methyladdukte von der Tumorzell-DNA entfernt (Friedman et al., 2000; Hegi et al., 2008). Auch die Rolle des MGMT-Proteins wird derzeit kontrovers diskutiert. Weitestgehend akzeptiert ist, dass die Methylierung des *mgmt*-Promotors ein *Silencing* des Gens bewirkt und die *mgmt*-Promotormethylierung gut mit der Sensitivität des GBMs gegenüber der TMZ-Behandlung korreliert (Friedman et al., 2000; Hegi et al., 2008). Aller-

dings ist der Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf TMZ und dem Methylierungsstatus des *mgmt*-Promotors nicht eindeutig (Blough et al., 2010), so dass eine Beteiligung weiterer Faktoren, insbesondere im GBM-Patienten, vermutet wird. Hier könnten neben der Bluthirnschranke auch Transporterproteine aus der Familie der ABC-Transporter eine Rolle spielen (Beier et al., 2011; Bleau et al., 2009; Schonberg et al., 2013).

Der MGMT-Status der in dieser Arbeit untersuchten SLGC-Linien und Tumore wurde von Kollegen im Labor untersucht (Bachelor- und Masterarbeiten). In der vorliegenden Arbeit wurde bei allen mit TMZ behandelten SLGC-Linien mit einem hypermethylierten *mgmt*-Promotor (T1338, T1440; „m“ in Tab. 9) in Bezug auf die Proliferation eine  $EC_{50}$ -Proliferation von  $\leq 25\mu\text{M}$  beobachtet. SLGC-Linien mit hypomethyliertem *mgmt*-Promotor (T1371, T1389; „u“ in Tab. 9) wiesen eine  $EC_{50}$ -Proliferation von  $\geq 200\mu\text{M}$  TMZ auf (Tab. 9). Neben SLGC-Linien mit einem hyper- bzw. hypomethylierten *mgmt*-Promotor wurden in den Analysen zusätzlich solche mit einem sog. m/u-Status untersucht. Dabei war jedoch nicht klar, ob m/u anzeigt, dass die Kulturen neben Zellen mit methylierten (m) auch Zellen mit unmethylierten (u) *mgmt*-Promotor enthalten oder ob in den Zellen einer Kultur eine monoallelische Methylierung des *mgmt*-Promotors vorliegt. SLGC-Linien mit einem m/u-Status (T1442, T1447, T1452, T1495, T1522) zeigten eine  $EC_{50}$ -Proliferation von  $< 100\mu\text{M}$  bis  $> 100\mu\text{M}$  TMZ. Bei den SLGC-Linien T1442 und T1447 lag die  $EC_{50}$  in Bezug auf den Proliferations-reduzierenden Effekt bei  $\leq 100\mu\text{M}$  TMZ, für T1442 in Bezug auf den Vitalitäts-reduzierenden Effekt bei  $\geq 100\mu\text{M}$  TMZ und für T1447 bei  $100\mu\text{M}$  TMZ. Für T1452 betrug sie  $\leq 100\mu\text{M}$ . Bei T1495 wurde hinsichtlich des Proliferations-reduzierenden Effektes eine  $EC_{50}$ -Proliferation von  $\geq 100\mu\text{M}$ , für T1522  $< 200\mu\text{M}$  beobachtet. In Bezug auf den Vitalitäts-reduzierenden Effekt betrug die  $EC_{50}$ -Vitalität bei beiden SLGC-Linien  $\leq 200\mu\text{M}$  TMZ (Tab. 9). Die TMZ-Sensitivität der SLGC-Linien mit einem eindeutigen m- beziehungsweise u-Status wurden in dieser Arbeit hinsichtlich des antiproliferativen Effektes weitestgehend reproduziert.

Wie schon bei alleiniger Bestrahlung beobachtet, waren auch die gemessenen Effekte der alleinigen TMZ-Behandlung im MTT-Assay (Vitalität) geringer ausgeprägt als die im BrdU-ELISA (Proliferation). Demzufolge wurde die  $EC_{50}$ -Vitalität erst bei wesentlich höheren TMZ-Konzentrationen erreicht und ein Zusammenhang zur *mgmt*-Promotor-Methylierung war weniger deutlich erkennbar (Tab. 9). So induzierten  $50\mu\text{M}$  TMZ bei T1440 (m-Status,  $EC_{50}$ -Vitalität  $100\mu\text{M}$ ) eine geringe Reduktion der Vitalität (-10%), wohingegen  $200\mu\text{M}$  TMZ bei T1389 (u-Status,  $EC_{50}$ -Vitalität  $\geq 200\mu\text{M}$ ) eine 50%ige Reduktion der Vitalität bewirkten (Tab. 8; Tab. 9). Bei den SLGC-Linien, die einen gemischten MGMT-Status (m/u) aufwiesen (T1442, T1447, T1452, T1495, T1522), war der Effekt der eingesetzten TMZ-Konzentration wiederum verschieden. So wurde mit  $100\mu\text{M}$  TMZ nur bei drei (T1442, T1447 und T1522) von fünf SLGC-Linien mit einem gemischten MGMT-Status eine

Reduktion der Vitalität (T1442: -50%; T1447: -52%; T1552: -23%) beobachtet (Tab. 8; Tab. 9). Allerdings wurde hier bei dem m/u-Status nicht zwischen SLGC-Linien mit stärker methylierten bzw. weniger methylierten *mgmt*-Promotoren unterschieden.

Im vorangegangenen Kapitel (5.1) wurde bereits der alleinige Effekt der Bestrahlung diskutiert. Die zusätzliche Gabe von TMZ verstärkte das Ansprechen aller untersuchten SLGC-Linien auf die Bestrahlung in Bezug auf die Reduktion der Proliferation (BrdU-ELISA), wenn auch in unterschiedlich starkem Maße (Tab. 10).

Bei vier SLGC-Linien (T1371, T1442, T1447 und T1495) lagen die Ergebnisse des antiproliferativen Effektes für die Kombinationsbehandlung mit TMZ und Bestrahlung deutlich unter denen für die alleinige TMZ-Behandlung, wobei diese Unterschiede bei T1371, T1447 und T1495 primär bei Strahlendosen  $\leq 10$  Gy evident waren. Bei T1442 wurde erst mit einer Strahlendosis von 20 Gy ein Vorteil der Doppelbehandlung im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung beobachtet. Bei zwei SLGC-Linien (T1389, T1440) bewirkte die zusätzliche Bestrahlung keine zusätzliche Reduktion der Proliferation im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung. Die Werte bei T1389 und T1440 unterschieden sich bei keiner der untersuchten Strahlendosen in der Kombinationsbehandlung von denen der reinen TMZ-Behandlung. Bei der SLGC-Linie T1522 waren die Effekte der Bestrahlung bereits mit 2 Gy so stark, dass TMZ keine zusätzliche Wirkung auf die Verminderung der Proliferation hatte. Der Wert für die Kombinationsbehandlung fiel mit steigender Strahlendosis analog zu dem der alleinigen Bestrahlung.

Tab. 10: ED<sub>50</sub>-Proliferation und ED<sub>50</sub>-Vitalität in Abhängigkeit von der Anwesenheit von TMZ

SLGC-Linie	MGMT Status	p53 Status/ Expression	PTEN	BrdU-ELISA				MTT-Assay	
				ED <sub>50</sub>	Reduktion der Proliferation mit TMZ (µM) & 10 Gy	ED <sub>50</sub> bei Co-Applikation von TMZ (µM)	ED <sub>50</sub>	Reduktion der Vitalität mit TMZ (µM) & 10 Gy	ED <sub>50</sub> bei Co-Applikation von TMZ (µM)
T1338	m	mut\$. /(-)	-	≤ 2Gy	n.u.	n.u.	n.e.	n.u.	20Gy (50µM)
T1371	u	R175H / +	-	≤ 10Gy	200µM / 60%±7	5Gy (200µM)	n.e.	100µM / 30%±12	20Gy:-45% (200µM)
T1389	u	mut. / +	-	20Gy	200µM / 50%±20	<5Gy (200µM)	> 20 Gy	200µM / 40%±6	<20Gy (200µM)
T1440	m	wt / (-)	++	n.e.	50µM / 60%±17	20Gy:-35% (50µM)	n.e.	50µM / 44%±10	20Gy:-40% (50µM)
T1442	m/u	wt / (-)	-	≤ 10Gy	100µM / 85%±2	<2Gy (100µM)	n.e.	100µM / 55%±6	10Gy (100µM)
T1447	m/u	mut. / +	-	≤ 20Gy	100µM / 55%±17	<10Gy (100µM)	n.e.	100µM / 57%±5	<2Gy (100µM)
T1452	m/u	mut. <sup>RNA</sup> / +	++	#	#	#	n.e.	100µM / 0%±10	n.e. (100µM)
T1495	m/u	R273H / +++	++	≤ 10Gy	100µM / 85%±6	<5Gy (100µM)	n.e.	100µM / 48%±10	10Gy (100µM)
T1522	m/u	wt / (-)	-	≤ 2 Gy	100µM / 91%±5	2Gy (100µM)	> 20 Gy	100µM / 64%±6	10Gy (100µM)

MGMT: O<sup>6</sup>-Methylguaninmethyltransferase; m: methyliert; u: nicht methyliert; m/u: gemischter Status; CD133 (engl.): cluster of differentiation 133; PTEN: Phosphat und Tensin-Homolog; Sox2: SRY (engl.: sex determining region Y)-Box 2; BrdU: Bromdesoxyuridin; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; #: T1452 konnte aufgrund fehlender bis geringer Haftung an der Matrix der 96-Lochplatten nicht mittels BrdU-ELISA untersucht werden; n.e.: nicht erreicht; n.u.: nicht untersucht; mut.: mehrere Einzel-Nukleotidaustausche in Bereich von Exon 5 bis Exon 7; mut\$: monoallelische Veränderungen in einer Subpopulation von Zellen; mut.<sup>RNA</sup>: atypische p53 mRNA; R175H: Aminosäurerest Arginin 175 durch Histidin ersetzt; R273H: Aminosäurerest Arginin 273 durch Histidin ersetzt; wt: Wildtyp; (-) bzw. - : Expression unterhalb der Nachweisgrenze des Antikörpers bzw. abwesend; +, ++, +++ : Stärke der Expression; EC<sub>50</sub>: Effektivkonzentration 50; ED<sub>50</sub>: Effektivdosis 50; Gy: Gray; T: Tumor; TMZ: Temozolomid; ±: Standardfehler.

Anmerkung: Die hier angegebenen EC<sub>50</sub> -Werte für TMZ basieren auf mehreren unabhängigen Experimenten, so dass es zu Variationen zwischen der in dieser Arbeit mit TMZ erzielten Wirkung (siehe Graphen) und den im Labor gültigen EC-Werten kommen konnte.

Hinsichtlich der Vitalität (MTT-Assay) war der Effekt der Kombinationsbehandlung, wie schon bei der Einfachbehandlung beobachtet, geringer ausgeprägt als derjenige auf die Proliferation (BrdU-ELISA). Bei vier (T1440, T1442, T1495, T1522) von acht SLGC-Linien wurde ein verstärkender Effekt in Bezug auf die Vitalitätsreduktion beobachtet, wenn die Bestrahlung in Gegenwart von TMZ erfolgte. Legt man die Effektivität der Bestrahlung zu Grunde, dann steigerte TMZ den Vitalitäts-reduzierenden Effekt der Bestrahlung mit Ausnahme von T1452 bei allen untersuchten SLGC-Linien. Bei den vier SLGC-Linien (T1371, T1440, T1442, T1495), bei denen mit niedrigen Strahlendosen (2 und 5 Gy) keine Reduktion der Vitalität feststellbar war, konnte in Anwesenheit von TMZ eine deutliche Verbesserung des Vitalitäts-reduzierenden Effektes erzielt werden (Tab. 10). Auch der bereits mit niedrigen Strahlendosen erzielte Effekt der alleinigen Bestrahlung von T1389-, T1447- und T1522-Kulturen wurde durch die zusätzliche Gabe von TMZ verstärkt. Dagegen lag bei der sphärischen SLGC-Linie T1452 eine ausgeprägte Radio- und Chemoresistenz sowohl nach alleiniger Bestrahlung als auch nach der Doppelbehandlung vor. Diese SLGC-Linie wies im MTT-Assay eine  $EC_{50}$ -Vitalität von  $100\mu\text{M}$  TMZ auf. Die  $ED_{50}$ -Vitalität wurde sowohl durch die alleinige Bestrahlung mit 20 Gy als auch nach der Doppelbehandlung mit T100/20Gy nicht erreicht. Klare Aussagen zum Einfluss der alleinigen Bestrahlung und der Doppelbehandlung auf die Proliferation von T1452 können nicht gemacht werden, da diese SLGC-Linie einen sphärischen Phänotyp aufweist und daher aus methodischen Gründen im Proliferationsassay (BrdU-ELISA), der ein adhären-tes Wachstum erfordert, nicht untersucht werden kann.

Mit Ausnahme von T1452 zeigten die Ergebnisse jedoch auch, dass TMZ allein oftmals eine identische Reduktion der Proliferation und Vitalität wie die korrespondierenden Kombinationsbehandlungen TMZ/2Gy, TMZ/5Gy und häufig sogar wie TMZ/10Gy oder TMZ/20Gy verursachte. So lagen die Werte der im BrdU-ELISA gemessenen optischen Dichten (OD) für die SLGC-Linien T1389, T1440 und T1447 bei allen untersuchten Strahlendosen in der Kombinationsbehandlung auf demselben Level wie die der alleinigen TMZ-Behandlung. Lediglich bei vier SLGC-Linien (T1371, T1442, T1495 und T1522) lagen die ODs für die Ansätze in denen Strahlendosen von 10 und 20 Gy eingesetzt wurden unter dem Wert für die alleinige TMZ-Behandlung, wobei nur im Falle von T1495 und T1522 eine deutliche Dosiswirkungskurve für die Bestrahlung in Anwesenheit von TMZ beobachtet wurde. Die Werte der im MTT-Assay gemessenen ODs unterschieden sich bei den SLGC-Linien T1371, T1389, T1447 und T1452 unabhängig von der gewählten Strahlendosis nicht von der alleinigen TMZ-Behandlung. Nur bei T1440, T1442, T1495 und T1522 lagen die Werte der Doppelbehandlung mit Strahlendosen  $\geq 10$  Gy unter dem der alleinigen TMZ-Behandlung. Die Unterschiede zwischen den TMZ- und TMZ/Gy-Werten waren zudem mit Ausnahme von T1440 bei niedrigen Strahlendosen stets größer. Somit scheint die Wirkung der TMZ-Koapplikation bei niedrigen Strahlendosen effizienter. Bei niedrigen Strahlendosen dominierte daher der TMZ-Effekt,

der wiederum vom Methylierungsstatus des *mgmt*-Promotors abhing. In der Doppelbehandlung bei suboptimaler Strahlendosis ist daher der Methylierungsstatus des *mgmt*-Promotors der entscheidende Parameter. Verfolgt man die Annahme einiger Autoren, dass SLGCs generell eine relative Resistenz gegen TMZ aufweisen (Chen et al., 2012; Liu et al., 2006), müssten Faktoren zusätzlich zum MGMT-Status für die Effektivität von Bedeutung sein. Es wurde unter anderem nachgewiesen, dass ein Defekt in der Basenfehlpaarungsreparatur bei methyliertem *mgmt*-Promotor weder Zelltod noch einen Zellzyklusarrest auslöst und somit die Zellen ungehindert weiter proliferieren können (Friedman et al., 2000). Dies wäre eine mögliche Erklärung für den fehlenden Effekt von TMZ bei der SLGC-Linie T1338 trotz methyliertem *mgmt*-Promotor. Daneben könnten, wie oben kurz erwähnt, Mitglieder der ABC-Transporterfamilie eine Rolle spielen, von denen bekannt ist, dass sie die Fähigkeit besitzen TMZ und andere Chemotherapeutika aus Gliomzellen heraus zu schleusen (Bleau et al., 2009; Schonberg et al., 2013).

Einen wichtigen Parameter für die Doppelbehandlung stellt zudem p53 dar, welches über p21<sup>Cip1/WAF1</sup> einen Zellzyklusarrest induziert (Kreis et al., 2014). Es wurde beobachtet, dass SLGCs mit einem wtp53 sensitiver auf die TMZ-Behandlung reagierten als diejenigen mit einem mutp53 (Batista et al., 2007; Roos et al., 2007). Die Mutation von p53 könnte in einer Aktivierung des intrinsischen Signalwegs der Apoptose resultieren, der als weniger effizient als der extrinsische Weg gilt (Batista et al., 2007; Roos et al., 2007). Bezieht man die Ergebnisse des Proliferations- und Vitalitäts-reduzierenden Effektes von TMZ auf den p53-Status der untersuchten SLGC-Linien, kann diese Hypothese nicht eindeutig bestätigt oder widerlegt werden. Zwar lag bei der SLGC-Linie T1442, bei der die Proliferation durch die alleinige TMZ-Behandlung um 80% reduziert wurde, ein wtp53 vor [EC<sub>50</sub>-Proliferation 25µM TMZ], jedoch wurde bei T1389 trotz mutp53 ebenfalls die Proliferation durch TMZ um 80% reduziert (Tab. 9; Tab. 10). Im Gegensatz dazu zeigte T1440 eine 20%ige Reduktion der Proliferation, obwohl wtp53 vorlag. Auch in Bezug auf die Vitalität war kein Vorteil des wtp53 erkennbar. In Kombination mit der Bestrahlung sanken die ED<sub>50</sub>-Proliferation (TMZ) und die ED<sub>50</sub>-Vitalität (TMZ) nur bei höheren Strahlendosen und nicht bei allen SLGC-Linien, wobei der Effekt auf die Proliferation stärker ausgeprägt war (Tab. 10). Dabei könnten p53-abhängige und/oder p53-unabhängige Prozesse eine Rolle spielen.

In diesem Zusammenhang war auch die Reaktion von T1371 und T1495 interessant. Bei beiden SLGC-Linien ist p53 mutiert. Im Falle der SLGC-Linie T1371 liegt die p53-Mutation R175H vor, bei der SLGC-Linie T1495 die p53-Mutation R273H. Diese SLGC-Linien gehören, wie oben kurz erwähnt, zur Gruppe der sog. „*gain of function*“ p53-Mutanten. Solche Mutanten weisen ein erhöhtes Proliferationsvermögen, eine veränderte Zellvitalität und Therapieresistenz sowie eine gesteigerte Motilität auf (Muller und Vousden, 2014). In T1371-Kulturen ist zudem der *mgmt*-Promotor

hypomethyliert, bei T1495 liegt ein m/u-Status vor. Zu erwarten gewesen wäre ein schlechteres Ansprechen der beiden Linien sowohl auf TMZ als auch auf die Doppelbehandlung, zumal eine rezente Studie zeigte, dass mutiertes p53 die Chemoresistenz durch ein Hochregulieren der MGMT-Expression verstärken könnte (Wang et al., 2013). Dennoch konnte TMZ [T1371:  $EC_{50} \geq 200\mu\text{M}$ ; T1495:  $EC_{50} \geq 100\mu\text{M}$ ] bei diesen beiden Linien den antiproliferativen Effekt der Bestrahlung [T1371:  $ED_{50}$ : 10-20Gy; T1495:  $ED_{50}$ :  $\leq 10$  Gy] bei niedrigen Strahlendosen [ $ED_{50}$  (TMZ)  $\leq 5$  Gy] steigern (Tab. 10). Der Effekt auf die Vitalitätsreduktion war bei beiden SLGC-Linien weniger stark ausgeprägt. Um die  $EC_{50}$ -Vitalität zu erreichen, waren höhere TMZ-Konzentrationen erforderlich [T1371:  $\geq 300\mu\text{M}$ ; T1495:  $\leq 200\mu\text{M}$ ]. Die  $ED_{50}$  wurde in Bezug auf die Vitalität mit alleiniger Bestrahlung bei beiden SLGC-Linien auch mit 20 Gy nicht erreicht. Durch die Kombinationsbehandlung von  $200\mu\text{M}$  TMZ mit einer Bestrahlung von 20 Gy wurde bei T1371 eine 45%ige Reduktion der Vitalität erzielt, bei T1495 wurde die  $ED_{50}$  (TMZ) mit 10 Gy erreicht. Derzeit werden im Labor die Effekte von alleiniger Bestrahlung und Doppelbehandlung auf den Zellzyklus und DNA-Reparaturmechanismen untersucht. Es wurde beobachtet, dass sowohl in T1371- als auch in T1495-Kulturen trotz mutp53 nach der Bestrahlung Kinasen wie ATM und Chk1/Chk2 aktiviert werden. Diese Vorgänge laufen jedoch deutlich langsamer ab als in der etablierten SLGC-Linie U87, die ein wtp53 aufweist (C. Zechel, persönliche Mitteilung). Das bessere Ansprechen der SLGC-Linie T1495 auf die Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Linie T1371 ist vermutlich eher auf den m/u-MGMT-Status von T1495 als auf den Unterschied in der p53-Mutation (R175H versus R273H) zurückzuführen. Durch den geringen Methylierungsgrad des *mgmt*-Promotors in T1495-Kulturen im Vergleich zur fehlenden Methylierung des *mgmt*-Promotors in T1371-Kulturen sollte in T1495-Kulturen die MGMT-Expression niedriger sein und diese SLGC-Linie somit auf identische TMZ-Konzentrationen besser reagieren als die SLGC-Linie T1371. In der vorliegenden Arbeit erfolgten aus diesem Grunde die Behandlungen von T1371 mit  $200\mu\text{M}$  TMZ, diejenigen von T1495 dagegen mit  $100\mu\text{M}$  TMZ.

Die SLGC-Linien T1338 und T1440, die beide einen hypermethylierten *mgmt*-Promotor aufweisen, unterschieden sich hinsichtlich ihres p53-Status. Bei T1440 wäre aufgrund des wtp53 ein gutes Ansprechen auf die Doppelbehandlung zu erwarten gewesen, da hier p53-induzierte Reparaturprozesse effizient ablaufen sollten. Diese SLGC-Linie erwies sich nach alleiniger Bestrahlung als radioresistent [ $ED_{50}$ -Proliferation/Vitalität nicht erreicht]. Durch die Gabe von  $50\mu\text{M}$  TMZ zusätzlich zur Bestrahlung mit 20 Gy wurde eine geringe, aber signifikante Reduktion der Proliferation (T50/Gy20: - 35%) und der Vitalität (T50/Gy20: -40%) erzielt. Es ist aufgrund des hypermethylierten *mgmt*-Promotors davon auszugehen, dass der Effekt primär TMZ-vermittelt induziert wurde. Die SLGC-Linie T1338 wiederum erwies sich in Bezug auf die Proliferation als relativ chemo- und radiosensibel [ $EC_{50} < 25\mu\text{M}$  TMZ;  $ED_{50} < 2$  Gy], wobei erneut der Vitalitäts-reduzierende Effekt

weniger stark ausgeprägt war [ $EC_{50}$  100 $\mu$ M TMZ;  $ED_{50}$  nicht erreicht]. In der Kombinationsbehandlung von 50 $\mu$ M und einer Bestrahlung mit 20 Gy konnte hier knapp die  $ED_{50}$ -Vitalität erzielt werden (Tab. 10). Hinsichtlich der SLGC-Linie T1338 besteht die Möglichkeit einer monoallelischen Veränderung im p53-Gen in einer Subpopulation von Zellen (Bachelorarbeit C. Geisler, 2015), die durch weitere Experimente überprüft werden muss.

Die übrigen in der Doppelbehandlung untersuchten SLGC-Linien (T1442, T1447, T1452, T1495, T1522) wiesen einen m/u-MGMT-Status auf, wobei wie oben bereits erwähnt unklar ist, wie sich das Verhältnis von hyper- zu hypomethyliertem *mgmt*-Promotor darstellt. Drei dieser SLGC-Linien (T1447, T1452, T1495) wiesen ein mutp53 auf. Grundsätzlich wiesen die Doppelbehandlungen bei diesen drei SLGC-Linien im Vergleich zu den SLGC-Linien mit einem hypo- oder hypermethylierten *mgmt*-Promotor eine bessere Effektivität auf, das heißt, die Effektivität der Einzelbehandlung konnte durch TMZ bzw. die Bestrahlung deutlich gesteigert werden (Tab. 10). In Bezug auf den antiproliferativen Effekt der Doppelbehandlung fiel auf, dass bei der SLGC-Linie T1442 (m/u-Status für MGMT) die  $ED_{50}$ -Proliferation in Anwesenheit von 100  $\mu$ M TMZ bereits bei < 2 Gy erreicht wurde, bei der Linie T1495 (m/u-Status für MGMT) mit 100 $\mu$ M TMZ jedoch erst bei < 5 Gy. Dies könnte einerseits darauf zurückgeführt werden, dass sich die SLGC-Linie T1442 aufgrund ihres p53-Status bei identischer TMZ-Konzentration als weniger strahlenresistent erwies als die Linie T1495 (T1442: wtp53; T1495: p53 Mutation R273H) und daher bereits bei niedrigerer Strahlendosis ein Zellzyklusarrest induziert wurde. Da die p53 Mutation R273H zur Gruppe der „*gain of function*“-Mutationen gehört (Muller und Vousden, 2014), könnte die p53-Mutation der SLGC-Linie T1495 eine verstärkte Vitalität und Therapieresistenz verliehen haben. Andererseits könnte trotz des m/u-Status beider SLGC-Linien eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber TMZ vorliegen, die p53-abhängig oder p53-unabhängig wirken könnte. Denkbar wäre, dass in T1495-Kulturen der Anteil an methyliertem *mgmt*-Promotoren größer ist als bei T1442 und daher T1495 aufgrund einer höheren MGMT-Expression chemoresistenter als T1442 ist [T1442:  $EC_{50}$ -Proliferation 100 $\mu$ M TMZ,  $EC_{50}$ -Vitalität  $\geq$  100 $\mu$ M; T1495:  $EC_{50}$ -Proliferation  $\geq$  100 $\mu$ M TMZ,  $EC_{50}$ -Vitalität  $\leq$  200 $\mu$ M]. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die bei der Doppelbehandlung mit 100 $\mu$ M TMZ und niedrigen Strahlendosen beobachtete unterschiedliche Responsivität von T1442 und T1495 hingegen bei einer Behandlung mit 100 $\mu$ M TMZ und 10 Gy nicht mehr beobachtet wurde (Tab. 10). Insgesamt bestätigte die vergleichende Analyse von T1442 und T1495 die oben formulierte Schlussfolgerung, dass in Kombination mit TMZ bei niedrigen Strahlendosen im Gegensatz zu hohen eine effektivere Wirkung auftritt. Diese Vermutung wurde auch durch den Vergleich von T1447 und T1495 weiter erhärtet. Im Vergleich der SLGC-Linien T1447 und T1495 [T1447: mutp53; T1495: p53-Mutation R273H] stellte sich heraus, dass die Doppelbehandlung bei T1495 [ $ED_{50}$ (TMZ) <5 Gy] einen stärkeren inhibierenden Effekt auf die Proliferation als bei T1447

[ED<sub>50</sub>(TMZ) < 10 Gy] hatte. In Bezug auf den Vitalitäts-reduzierenden Effekt verhielt es sich bei diesen beiden SLGC-Linien jedoch invers [T1447: ED<sub>50</sub>(TMZ) < 2 Gy; T1495: ED<sub>50</sub>(TMZ) 10Gy]. Dies könnte ebenfalls darauf zurückgeführt werden, dass T1495 nach Bestrahlung durch die „*gain of function*“-Mutation R273H ein gesteigertes p53-Level aufwies und DNA-Reparaturmechanismen effektiv induziert wurden (C. Zechel, persönliche Mitteilung; Daten nicht publiziert). Zudem wäre es denkbar, dass bei T1495 der Anteil an hypomethyliertem *mgmt*-Promotor größer als bei T1447 und daher aufgrund einer höheren MGMT-Expression T1495 chemoresistenter als T1447 ist [T1447: EC<sub>50</sub>-Proliferation < 100µM TMZ, EC<sub>50</sub>-Vitalität 100µM; T1495: EC<sub>50</sub>-Proliferation ≥ 100µM TMZ, EC<sub>50</sub>-Vitalität ≤ 200µM]. Die SLGC-Linie T1452, die als *bona-fide* SLGC-Linie angesehen werden kann, zeigte in Bezug auf die Vitalität kein verbessertes Ansprechen auf die Bestrahlung in der Doppelbehandlung. Dabei ist unklar, ob dies eher mit den Stammzeleigenschaften, dem p53-Status oder unbekanntem Mechanismen assoziiert ist.

Die oben diskutierten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Möglichkeit, die durch die Bestrahlung erzielten Proliferations- und Vitalitäts-reduzierenden Effekte durch TMZ zu steigern, primär durch den MGMT-Status der SLGC-Linien determiniert wird. Die Bedeutung des p53- und PTEN- Status war weniger klar. Eine deutliche Verminderung der ED<sub>50</sub>-Proliferation und ED<sub>50</sub>-Vitalität schien jedoch nicht mit der Expression von PTEN zu korrelieren. So wurde die ED<sub>50</sub>-Proliferation von T1371, T1442 und T1495 [alle ED<sub>50</sub>-Proliferation ≤ 10Gy] durch TMZ bereits mit 2-5 Gy erreicht, wobei nur T1495 PTEN exprimierte. Dies würde einer kürzlich formulierten Hypothese widersprechen, dass ein PTEN-Verlust eine effektivere TMZ-Behandlung bewirkt (Carico et al., 2012).

Wie bereits für die Effekte der alleinigen Bestrahlung besprochen, kann auch im Falle der Doppelbehandlung nur mittels zusätzlicher Analysen über das Zusammenwirken der diversen Faktoren eine Aussage erfolgen. So könnte ein selektiver *knock down* von PTEN in den besonders interessanten SLGC-Linien erfolgen. Nachfolgend könnten diese mit *small molecules*, wie z.B. ISA27 [(3R,7aR)6-(4-chlorobenzyl)-1H-spiro[imidazo[1,5-c]thiazole-3,30-indoline]-20,5,7(6H,7aH)-trione] oder SM13 [5-bromo-3'-(cyclohexane carbonyl)-1-methyl-2-oxo-piro[indoline-3,2'-thiazolidine], behandelt werden, die selektiv über MDM2 (engl.: *mouse double minute 2*-Homolog) den p53-Signalweg inhibieren (Bertamino et al., 2013; Costa et al., 2013; Gomez-Monterrey et al., 2010; Sorriento et al., 2015; Zhao et al., 2015). Analog wäre die Bedeutung des Grades an Stammzeleigenschaften zu klären, indem z.B. die Responsivität einer SLGC-Linie mit einem *Sox2-knock down* mit der derjenigen der korrespondierenden Wildtyp-SCLG-Linie verglichen würde.

In jedem Fall kann geschlussfolgert werden, dass nicht „die SLGC“ existiert, sondern eine Vielzahl von SLGC-Phänotypen, die sehr unterschiedlich auf die Radiochemotherapie reagieren. Dabei

ordnen sich die beiden von GSarcs abgeleiteten SLGC-Linien, wie schon bei anderen im Labor durchgeführten Untersuchungen beobachtet (Dissertation I. Choschzick, Bachelor- und Masterarbeiten), gut in die Gruppe der SLGCs aus GBMs ein. Hinsichtlich des antiproliferativen Effektes ähnelte die GSarc-Linie T1371 der GBM-Linie T1389. Wenngleich auch die ED<sub>50</sub>-Proliferation nach alleiniger Bestrahlung differierte (T1371: ED<sub>50</sub>-Proliferation  $\leq$  10 Gy; T1389: ED<sub>50</sub>-Proliferation 20 Gy), wurde durch die Kombinationsbehandlung ein ähnlich ausgeprägter antiproliferativer Effekt erzielt [T1371: ED<sub>50</sub>(TMZ) 5 Gy; T1389: ED<sub>50</sub>(TMZ) < 5Gy]. In Bezug auf den Vitalitäts-reduzierenden Effekt erwiesen sich die beiden SLGC-Linien als ähnlich behandlungsresistent (Tab. 10). Die GSarc-Linie T1447 stellte sich zwar hinsichtlich des antiproliferativen Effektes sowohl auf die alleinige Bestrahlung als auch die Kombinationsbehandlung im Vergleich zur GSarc-Linie T1371 sowie den übrigen SLGC-Linien mit einem m/u-Status (T1442, T1495, T1522) als resistenter dar, ähnelte diesen jedoch in ihrem Ansprechen in Bezug auf den Vitalitäts-reduzierenden Effekt in der Kombinationsbehandlung (Tab. 10). Diese Ergebnisse widersprechen somit den Vermutungen der Arbeitsgruppe Han et al. (2010), die GSarcs als eine eigenständige Tumorentität ansehen.

### **5.3. Effekt der Behandlungsregime**

Der dritte Teil dieser Arbeit untersuchte die Fragestellung, ob die unmittelbare Koapplikation von ionisierender Strahlung und TMZ in Bezug auf Proliferation, Vitalität, Zelltod und Zellzyklus effizienter ist als eine zeitlich versetzte Behandlung. Dabei wurden die Effekte einer zur Bestrahlung um 24h versetzten TMZ-Gabe im Vergleich zur zeitgleichen TMZ-Behandlung untersucht. Es wurden fünf SLGC-Linien ausgewählt, die in den vorangegangenen Analysen ein gutes Ansprechen auf die einfache Bestrahlung und die Doppelbehandlung zeigten. So wiesen die SLGC-Linien T1389 und T1447 ein gutes Ansprechen auf die alleinige Bestrahlung hinsichtlich Proliferation und Vitalität auf, wobei in den Doppelbehandlungen diesbezüglich der Effekt des TMZ dominierte. Im Unterschied dazu wurde bei der SLGC-Linie T1522 bereits durch die alleinige Bestrahlung ein derart ausgeprägter Effekt auf die Proliferation und die Vitalität beobachtet, dass die Reduktion durch die zusätzliche TMZ-Behandlung nicht weiter verstärkt wurde. Somit überwog bei T1522 der Effekt der Bestrahlung. Bei T1495 wurde der Effekt der alleinigen Bestrahlung auf die Proliferation und die Vitalität durch die Doppelbehandlung eindeutig gesteigert, wenn auch ein additiver Effekt nicht erreicht wurde. Hier wurde in Bezug auf die Proliferation der stärkste Effekt bei niedrigen Strahlendosen (2 und 5 Gy) beobachtet, in Bezug auf die Vitalität dagegen bei 10 Gy.

Bei der Interpretation der durch die zeitversetzte Behandlung gewonnenen Daten ist zu berücksichtigen, dass die Messungen der beiden Behandlungsregime methodenbedingt an unterschiedli-

chen Tagen stattfinden mussten, da das Behandlungsregime B (= zeitversetzt) eine um 24 h verzögerte TMZ-Gabe vorsah. Damit die Wirkung des TMZ in Bezug auf die Proliferation und die Vitalität vergleichbar war, wurden die Messungen (BrdU-ELISA, MTT-Assay) der verschiedenen Parameter bei der um 24 h versetzten TMZ-Gabe (Regime B; Messung an Tag d5) einen Tag nach denen der zur Bestrahlung zeitgleichen TMZ-Gabe (Regime A; Messung an Tag d4) durchgeführt. Die Analysen zu Zelltod und Zellzyklus fanden ausschließlich an Tag d3 statt, da in Kulturgefäßen mit starkem Zellwachstum Zelldichte-abhängige Effekte auftreten, die die Effekte der Behandlungen in den Analysen überlagern könnten. Dabei ist primär an die unbehandelten Kontrollen zu denken, aber auch die Ansätze mit suboptimalen TMZ-Konzentrationen oder Strahlendosen könnten einen konfluenten Zellrasen bilden.

Die Wirkung der Bestrahlung war in Bezug auf den antiproliferativen Effekt bei allen vier untersuchten SLGC-Linien (T1389, T1447, T1454, T1522) bei Regime B mit 20 Gy stärker ausgeprägt. Auch in Bezug auf den Vitalitäts-reduzierenden Effekt war eine ähnliche, allerdings geringer ausgeprägte Tendenz zu Regime B zu beobachten. Lediglich bei T1447 war kein Unterschied zwischen den beiden Behandlungsregimen beobachtbar. Hinsichtlich der zeitlichen Abfolge der TMZ-Zugabe war damit kein eindeutiges Ergebnis festzustellen. Bei einer (T1454) von vier untersuchten SLGC-Linien wurde in Bezug auf den antiproliferativen Effekt ein Vorteil für die zeitgleiche Behandlung mit ionisierender Strahlung und TMZ beobachtet. Somit könnte dieses Behandlungsregime bei einer Untergruppe von SLGCs eine Bedeutung für die Responsivität haben. Bei einer weiteren SLGC-Linie (T1389) wurde beobachtet, dass ein zusätzlicher Effekt von TMZ auf eine strahleninduzierte Reduktion der Proliferation bei zeitgleicher Behandlung effizienter ist. Umgekehrt schien jedoch bei dieser SLGC-Linie der zusätzliche Effekt der Bestrahlung auf die durch TMZ-induzierte Reduktion der Proliferation bei zeitversetzter Behandlung effizienter. Bei den anderen beiden SLGC-Linien (T1447, T1495) war kein Vorteil der einen oder anderen Behandlungsstrategie erkennbar. Im Gegensatz zum BrdU-ELISA ergaben sich im MTT-Assay keine eindeutigen Hinweise darauf, dass die Behandlungsstrategie eine Rolle spielt, obwohl die Kombinationsbehandlung die Vitalität etwas stärker reduzierte als die alleinige Bestrahlung. Lediglich bei T1389 könnte, wie auch schon z.T. im BrdU-ELISA beobachtet, die zeitgleiche Behandlung tendenziell von Vorteil sein, da hier die Kombinationsbehandlung die Vitalität stärker als die alleinige Bestrahlung beeinträchtigte.

Indikatoren für die Induktion von Zelltod durch eine *in vitro*-Therapie sind sowohl eine gesteigerte Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) als auch die proteolytische Spaltung des DNA-Reparaturenzyms Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1). Die Anwesenheit der geschnittenen Form von PARP-1 (cl PARP-1) ist ein Indikator für Apoptose, da die Proteolyse von PARP-1 durch

die Effektorcaspase-3 vermittelt wird, die wiederum ein zentraler Bestandteil des apoptotischen Signalwegs ist (Galia et al., 2012; Ouyang et al., 2012). Für keine der beiden im LDH-Assay untersuchten SLGC-Linien (T1389, T1522) war ein eindeutiger Vorteil der Doppelbehandlung im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung oder Bestrahlung erkennbar, weder im zeitgleichen, noch im zeitversetzten Ansatz. Da die Untersuchung nur einmal durchgeführt wurde, ist eine Interpretation schwierig. Zudem ist zu vermuten, dass experimentelle Probleme vorlagen.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen des PARP-1-Proteins wurde insgesamt eine nur geringe Ausprägung der proteolytischen Spaltung von PARP-1 detektiert. Eine Induktion der PARP-1-Proteolyse nach TMZ-Gabe oder Bestrahlung war lediglich bei T1389 erkennbar, wobei hier eine geringfügig bessere Effektivität für die zeitgleiche Behandlungsstrategie auftrat. Bei T1495 und T1522 konnte keine verstärkte Induktion der Spaltung von PARP-1 nach der Kombinationsbehandlung beobachtet werden. Bei T1495 wurde sogar im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle eher ein Anstieg des Anteils an ungespaltenem PARP-1-Protein beobachtet. Ionisierende Strahlung induziert vor allem Doppelstrangbrüche, die in Tumorzellen zu einer Aktivierung von PARP-1 und nachfolgend zu einer DNA-Reparatur führen (Galia et al., 2012; Sabbatino et al., 2014). Dies würde den Anstieg an ungespaltenem PARP-1-Protein sowohl nach alleiniger Bestrahlung als auch nach der Kombinationsbehandlung bei T1495 erklären. Insgesamt erbrachten die Ergebnisse Hinweise darauf, dass die Doppelbehandlung bei den wenigsten Zellen effizient apoptotische Vorgänge einleitete. Literaturangaben zufolge kann die kombinierte TMZ- und Strahlenbehandlung bei einigen SLGC-Linien eher zu einer Aktivierung von PARP-1-vermittelten DNA-Reparaturmechanismen und damit zu einem Überleben der Zellen führen (Galia et al., 2012; Sabbatino et al., 2014). Die durch TMZ induzierte Apoptose ist abhängig vom MGMT- und p53-Status, der Proliferationsrate sowie der Reparatur von Doppelstrangbrüchen (Roos et al., 2007). Wie jedoch schon oben diskutiert, wurde im Rahmen dieser Arbeit keine eindeutige Korrelation zwischen dem p53-Status und der Effektivität der Behandlungsmodi erkannt. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die in den SLGC-Linien vorhandenen verschiedenen p53-Mutationen unterschiedliche Auswirkungen haben und verschiedenste zelluläre Prozesse beeinflussen können (Muller und Vousden, 2014).

Wie oben besprochen, wurde nur in sehr geringem Maße durch die Kombinationstherapie Apoptose ausgelöst. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Analysen hinsichtlich des Zellto-des mittels LDH-Assay und Western Blot zu einem frühen Zeitpunkt [48h (Regime B) bzw. 72h (Regime A)] an Tag d3 nach der Behandlung stattfanden. Da der Vorgang der Apoptose als späte Zellantwort angesehen wird, die mehr als 120 h nach der Behandlung einsetzt (Firat et al., 2011; Roos et al., 2007), wäre es sinnvoll, in einer neuen Versuchsreihe mit ansonsten gleichem experi-

mentellen Aufbau die Messungen frühestens nach 120h durchzuführen. Weiterhin sind die Parameter LDH-Freisetzung und PARP-1-Spaltung allein nur zwei Effekte eines komplexen Weges, der letztendlich zum Zelltod führt. Es wäre daher sinnvoll, im Weiteren die DNA-Fragmentierung (mittels TUNEL-Assay; engl.: *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling-Assay*) sowie die Aktivierung verschiedener Caspasen (z.B. mittels Western Blot-Analysen) zu untersuchen. Die im MTT-Assay beobachtete leichte Reduktion der Vitalität könnte aber einen zusätzlichen, wenn auch schwachen Hinweis auf eine beginnende Apoptose liefern. Die Messungen erfolgten an Tag d4 bzw. Tag d5, also nach 96 und 120h. Möglicherweise wäre eine Reduktion der Vitalität ausgeprägter, hätte man die Messungen stattdessen Tag d6 und Tag d7 durchgeführt. Dennoch sind die im Rahmen des MTT-Assays gewonnenen Daten stets kritisch zu sehen, da die Spezifität des Tests sehr gering ist (Beier et al., 2011).

Da sowohl TMZ als auch ionisierende Strahlung statt einer Apoptose einen Zellzyklusarrest auslösen können (Beier et al., 2011; Cho et al., 2013; Hirose et al., 2001a; Hirose et al., 2001b; Rich, 2007), wurden zusätzlich die Auswirkungen der Kombinationstherapie auf den Zellzyklus am Beispiel von drei SLGC-Linien (T1389, T1495, T1522) untersucht. Es stellte sich die Frage, ob die Bestrahlung oder die TMZ-Gabe die Abläufe in der Zelle derart hemmt, dass die einzelnen oder kombinierten Behandlungen sich gegenseitig verstärken oder hemmen. Eine Möglichkeit wäre die Induktion eines Zellzyklusarrests durch die Bestrahlung in einigen Zellen der untersuchten Kulturen, wodurch die weitere Induktion einer Proliferationsreduktion der übrigen Zellen durch TMZ abgeschwächt oder gehemmt würde. Ebenso wäre es umgekehrt denkbar, dass ein durch TMZ induzierter Zellzyklusarrest den antiproliferativen Effekt der Bestrahlung negativ beeinflussen könnte. Gemäß dieser Hypothese würde der Zeitpunkt der TMZ-Gabe bezogen auf die Bestrahlung eine Rolle für den Behandlungserfolg spielen, da dieser auf sich teilende Zellen angewiesen ist (Pajonk et al., 2010).

Untersucht wurde der Zellzyklus von drei SLGC-Linien (T1389, T1495, T1522) mittels durchflusszytometrischer Analysen Propidiumiodid-markierter SLGC-Linien. Zum einen wurde über den Anteil an sich im Zellzyklus befindender Zellen das Verhältnis der Lebend- zur Totfraktion bestimmt. Zum anderen wurde die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen (G0/G1, S, G2) nach alleiniger Bestrahlung sowie nach der Doppelbehandlung mit zeitgleicher und einer um 24h versetzten TMZ-Zugabe untersucht. Im Hinblick auf die Verteilung der Zellen in der Lebend- und Totfraktion ergab sich kein einheitliches Bild. Sowohl die zusätzliche Gabe von TMZ als auch der Zeitpunkt der TMZ-Zugabe wirkten sich in Bezug auf die Reduktion der Lebendfraktionen der drei untersuchten SLGC-Linien unterschiedlich aus. Ein zusätzlich reduzierender Effekt durch TMZ wurde bei T1389 nach zeitgleicher Behandlung (T200/Gy10) im Vergleich zur alleinigen Bestrah-

lung festgestellt. Die alleinige Bestrahlung führte in T1495-Kulturen zwar zu einem Rückgang der Lebendfraktion, jedoch bewirkte die zusätzliche TMZ-Gabe unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe keine weitere Reduktion des Anteils an sich im Zellzyklus befindenden, lebenden Zellen. Es war sogar unerwartet eine Vergrößerung der Lebendfraktion in der T1495-Kultur nach der Kombinationsbehandlung zu beobachten. In T1522-Kulturen war der reduzierende Effekt der Doppelbehandlung auf den Anteil der Lebendfraktion bei T100/Gy10 geringer als im Ansatz T100/Gy10(24h). Grundsätzlich wurde bei T1522 durch die Doppelbehandlung der Anteil der Lebendfraktion stärker verringert als nach alleiniger Bestrahlung.

Da bei T1522 nach der Doppelbehandlung ein sehr hoher Anteil toter Zellen vorlag, war eine Analyse der Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen nicht möglich. Im Gegensatz dazu ergab sich für T1389 und T1495 im Hinblick auf den Einfluss der alleinigen Bestrahlung und der Doppelbehandlung auf den Zellzyklus ein übereinstimmendes Ergebnis. So wurde durch die beiden Behandlungsmodi ein partieller G2-Arrest induziert. Zudem wurde eine Zunahme von Zellen mit einem DNA-Gehalt  $>4n$  beobachtet. Während die Werte der zeitversetzten TMZ-Zugabe zur Bestrahlung denen der alleinigen Bestrahlung in etwa entsprachen, wurde nach der zeitgleichen TMZ-Zugabe lediglich ein geringfügig höherer Anteil an sich in der G2-Phase befindenden Zellen und ein geringfügig niedrigerer Anteil im Bereich  $>4n$  beobachtet. Somit lässt sich hinsichtlich der Induktion eines G2-Arrests kein eindeutig erkennbarer Vorteil für eines der Behandlungsregime feststellen.

Die Induktion der Zellzyklusinhibitoren  $p21^{Cip1/WAF1}$  und  $p27^{Kip1}$  erfolgte hingegen in den drei untersuchten Linien unterschiedlich. Die Bestrahlung mit 10 Gy steigerte die  $p21^{Cip1/WAF1}$ -Level in der SLGC-Linie T1522, nicht aber in den beiden SLGC-Linien T1389 und T1495. Dagegen erhöhte 10 Gy übereinstimmend in allen drei SLGC-Linien das  $p27^{Kip1}$ -Level, wenn auch in unterschiedlich starker Ausprägung. TMZ bewirkte einen Anstieg des  $p21^{Cip1/WAF1}$ -Levels in T1495 und T1522, nicht aber in T1389. Es erhöhte jedoch in allen Analysen in Gegenwart von 10 Gy das  $p27^{Kip1}$ -Level. Die zeitgleiche *versus* zeitversetzte Behandlung mit TMZ relativ zur Bestrahlung führte wiederum zu voneinander abweichenden Ergebnissen. So war der Anstieg des Levels von  $p21^{Cip1/WAF1}$  in der T1495-Kultur stärker bei zeitgleicher Doppelbehandlung, in der T1522-Kultur jedoch stärker bei zeitversetzter Doppelbehandlung. Die Level von  $p27^{Kip1}$  waren in zwei Fällen (T1389, T1495) geringfügig höher, wenn die TMZ-Gabe um 24h verzögert erfolgte. In einem Fall (T1522) war das  $p27^{Kip1}$ -Level höher, wenn die Behandlung zeitgleich erfolgte. Die Überexpression von  $p27^{Kip1}$  verhindert eine CDK (Zyclin-abhängige Kinase)-Aktivierung und somit einen Eintritt in die S-Phase (Abukhdeir und Park, 2008), so dass bei T1522 zumindest nach zeitgleicher Behandlungsstrategie der Zellzyklusarrest nicht unwahrscheinlich ist.

Grundsätzlich sind die divergierenden Expressionslevel von  $p21^{Cip1/WAF1}$  und  $p27^{Kip1}$  unterschiedlich interpretierbar.  $p21^{Cip1/WAF1}$  weist verschiedene Wirkmechanismen auf. Es besitzt die Fähigkeit sowohl in der Funktion eines „Onkogens“ Apoptose zu inhibieren, als auch p53-abhängig oder p53-unabhängig Apoptose in der Funktion eines „Tumorsuppressors“ in bestimmten Stresssituationen zu induzieren (Kreis et al., 2014). Demnach könnte  $p21^{Cip1/WAF1}$  je nach seinem Expressionslevel sowohl Apoptose als auch einen Arrest in der G1-Phase induzieren (Abbas und Dutta, 2009). Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Daten ist bei den drei untersuchten SLGC-Linien jedoch von einem G2-Arrest mit ggf. nachfolgender Apoptose auszugehen. Bei den übrigen SLGC-Linien, die nicht auf Zellzyklus und Apoptose untersucht wurden, wäre aufgrund ihres geringen Ansprechens auf die Behandlung ein G1-Arrest denkbar, da ionisierende Strahlung insbesondere auf die Zellen einen Effekt zeigt, die sich in der M- oder G2-Phase des Zellzyklus befinden (Pajonk et al., 2010).

Als Erklärungsmöglichkeit für ein niedriges Expressionslevel von  $p27^{Kip1}$  bei T1522 nach der zeitversetzten Strategie kann neben einem experimentellen Fehler die subzelluläre Lokalisation und die damit verbundenen veränderten Eigenschaften in Betracht gezogen werden. So postulierten einige Arbeitsgruppen, dass zytoplasmatisch lokalisiertes  $p27^{Kip1}$  durch eine Hemmung von GRB2 (engl.: *growth factor receptor-bound protein 2*) die Funktion des RAS modifiziert und folglich als „Onkogen“ wirkt. Durch eine Verstärkung der Zellmigration fördert  $p27^{Kip1}$  die Metastasierung (Abukhdeir und Park, 2008; Lee und Kim, 2009). Möglicherweise könnte  $p27^{Kip1}$  bei den hier untersuchten Zellen ebenfalls zytoplasmatisch lokalisiert sein, so dass es hier nicht in der Rolle eines Zellzyklusinhibitors und Tumorsuppressors fungiert und seine Expression somit nicht gesteigert wird. Eine Analyse zur subzellulären Lokalisation von  $p21^{Cip1/WAF1}$  und  $p27^{Kip1}$  wurde nicht durchgeführt. Aufgrund des guten Ansprechens von T1522 auf die Doppelbehandlung ist bei dieser SLGC-Linie von einer Lokalisation von  $p27^{Kip1}$  im Zytoplasma jedoch nicht auszugehen.

Der  $p21^{Cip1/WAF1}$ - und  $p27^{Kip1}$ -vermittelte Zellzyklusarrest sowie die Fähigkeit von  $p21^{Cip1/WAF1}$  und  $p27^{Kip1}$  sowohl als „Tumorsuppressor“ als auch als „Onkogen“ zu wirken, könnten somit eine wichtige Ursache für die Therapieresistenz der Glioblastome darstellen. Dies wird bereits bei Brustkrebs diskutiert (Abukhdeir und Park, 2008).

## 5.4. Konklusion und Ausblick

In dieser Arbeit wurden zum einen die Auswirkungen ionisierender Strahlung auf SLGCs hinsichtlich Proliferation und Vitalität anhand von Dosiswirkungskurven untersucht. Zum anderen wurde ermittelt, ob in der Kombinationsbehandlung der Radiochemotherapie sowohl die TMZ-

Applikation die Wirkung der Bestrahlung verstärken kann als auch umgekehrt die Bestrahlung die Wirkung der TMZ-Behandlung. Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit der Zeitpunkt der TMZ-Zugabe im Verhältnis zur Bestrahlung eine Rolle spielt.

Die Auswirkungen der alleinigen Bestrahlung waren dosisabhängig. Dosen unter 10 Gy zeigten nur bei zwei von acht SLGC-Linien einen hemmenden Effekt auf die Proliferation und führten bei keiner Linie zu einer Induktion von Apoptose. Die  $ED_{50}$  lag hinsichtlich der Proliferation bei zwei der untersuchten SLGC-Linien bei 2 bzw. 5 Gy, bei drei Linien wurde sie mit 10 Gy, bei zwei Linien mit 20 Gy erreicht. Bei einer Linie wurde die  $ED_{50}$  auch mit 20 Gy nicht erreicht. Hinsichtlich der Vitalität wurde die  $ED_{50}$  bei keiner der SLGC-Linien mit 20 Gy erreicht. Grundsätzlich war die Hemmung der Proliferation ausgeprägter als die Reduktion der Vitalität und die Induktion von Zelltod. In Kombination mit der Bestrahlung zeigte TMZ nur bei niedrigen Strahlendosen einen zusätzlichen Proliferations- und Vitalitäts-reduzierenden Effekt, der bei den untersuchten SLGC-Linien unterschiedlich stark ausgeprägt war. Umgekehrt verstärkte die Bestrahlung die Wirkung von TMZ in der Mehrheit der SLGC-Linien nur bei hohen Strahlendosen, wenn die Effektivkonzentration ( $EC_{50}$ ) eingesetzt wurde. Die zeitgleiche TMZ-Gabe und Bestrahlung zeigte im Vergleich zur um 24h verzögerten TMZ-Applikation keine signifikanten Unterschiede. Insgesamt sind die Ergebnisse dahingehend zu interpretieren, dass TMZ bei suboptimaler Bestrahlung die Gliomtherapie verbessert, sofern die  $ED_{50}$  für die SLGCs erreicht wird.

Es ergaben sich Hinweise darauf, dass sowohl die Bestrahlung allein als auch die Kombinationsbehandlung bei einigen wenigen SLGC-Linien nicht nur die Proliferation beeinträchtigt, sondern neben einem Zellzyklusarrest möglicherweise auch Zelltod auslöst. Hinweise für einen eindeutigen Vorteil einer zeitgleichen *versus* einer zeitversetzten Behandlungsstrategie ergab die Auswertung jedoch nicht. Daher kann vermutet werden, dass der in der Klinik häufig verwendete 5 Tage *on*- 2 Tage *off*- Rhythmus der Bestrahlung (Stupp et al., 2005) keine gravierende Auswirkung auf das Ergebnis der Therapie hat. Allerdings sind die Daten mit drei SLGC-Linien über einen limitierten Zeitraum zu vorläufig, um zu einer gültigen Aussage zu kommen.

Um diese Ergebnisse verifizieren zu können, müsste einerseits eine größere Anzahl an SLGC-Linien untersucht, andererseits sollte auch der Versuchsaufbau optimiert werden. Die Messungen in Bezug auf Proliferation, Vitalität und Zelltod fanden an zwei unterschiedlichen Tagen statt. Damit ist beim Vergleich der Ergebnisse der zeitgleichen TMZ-Gabe *versus* der um 24h zeitversetzten TMZ-Gabe zu beachten, dass die Kulturen des um 24h zeitversetzten Ansatzes einen Tag länger proliferieren konnten, als die des zeitgleichen Ansatzes. Im Zuge dessen wäre es sinnvoll, den Zeitpunkt der Messungen zu standardisieren, möglicherweise auf den Tag d4. Darüber hinaus müssten sowohl die Western Blot-Analyse als auch die Durchflusszytometrie zur Verifizierung der

Ergebnisse mehrfach wiederholt werden. Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit nur einmalig durchgeführt, so dass die Diskussion auf jeweils einem Ergebnis beruht und die Aussagekraft dieser Daten daher gering ist. Zudem müsste vor dem Hintergrund der Induktion einer späten Apoptose ein späterer Messzeitpunkt erwogen werden (siehe auch Kapitel 5.3).

Bezüglich eines möglichen Zellzyklusarrests wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits die Zellzyklusinhibitoren p21<sup>Cip1/WAF1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> untersucht, sowie durchflusszytometrische Analysen Propidiumiodid-markierter SLGC-Linien durchgeführt. Um die gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren könnten Analysen hinsichtlich der Checkpoint-Kinasen Chk1 und Chk2 erfolgen. Sowohl ein Immunoblot zum Nachweis von Chk1 und Chk2 als auch ein Aktivitäts-Assay wären denkbar. Ferner wäre es möglich PTEN und die AKT-Kinase mittels Western Blot vor und nach der Behandlung zu untersuchen, um eine behandlungsinduzierte Beeinträchtigung des EGFR/PI3K/AKT/mTOR-Signalweges zu detektieren.

Die Untersuchungen hinsichtlich der Induktion von Apoptose ergaben lediglich Hinweise auf ein geringes Ansprechen auf die Behandlung. Um diese Ergebnisse zu erhärten, müssten weiterführende Tests (Western Blot, Durchflusszytometrie) hinsichtlich des Apoptosesignalweges z.B. über die Expression der Effektorcaspase-3 bestimmt werden oder über die Expression des tumorspezifischen Proteins Survivin. Survivin hemmt u.a. die Apoptose und hat einen proliferationssteigernden Effekt (Ryan et al., 2009). Des Weiteren wären DNA-Analysen mittels Elektrophorese oder der TUNEL-Assay (engl.: *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling-Assay*) zum Nachweis von DNA-Fragmentierung als Apoptose-Nachweis denkbar (siehe auch Kapitel 5.3).

Darüber hinaus wäre es in Erwägung zu ziehen, die zeitliche Abfolge der TMZ-Zugabe in Bezug zur Bestrahlung weiter zu modifizieren. Bereits 2009 wurden Vorteile einer der Bestrahlung um drei Tage vorgezogenen TMZ-Gabe beobachtet (Chalmers et al., 2009). TMZ könnte somit möglicherweise die Radiosensitivität der Zellen weiter steigern. Um der in vivo-Situation etwas näher zu kommen, könnte die Simulation einer fraktionierten Bestrahlung erfolgsversprechend sein und weitere Aufschlüsse in Bezug auf Zelltod und Zellzyklusarrest bringen. Es wurde bereits in vitro gezeigt, dass die fraktionierte Bestrahlung als Hauptstimulus für die Induktion von Zelltod fungiert (Rubner et al., 2014).

## 6. Literaturverzeichnis

Abbas T, Dutta A. *p21 in cancer: intricate networks and multiple activities*. Nat Rev Cancer. 2009;9:400-414.

Abukhdeir AM, Park BH. *P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance*. Expert Rev Mol Med. 2008;10:e19.

Afshar G, Jelluma N, Yang X, Basila D, Arvold ND, Karlsson A, Yount GL, Dansen TB, Koller E, Haas-Kogan DA. *Radiation-induced caspase-8 mediates p53-independent apoptosis in glioma cells*. Cancer Res. 2006;66:4223-4232.

Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, Rubio A, Liu D, Cortes-Santiago N, Urquiza L, Jauregi P, Lopez de Munain A, Sampron N, Aramburu A, Tejada-Solis S, Vicente C, Odero MD, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Idoate MA, Lang FF, Fueyo J, Gomez-Manzano C. *Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas*. PLoS One. 2011;6:e26740.

Ammirati M, Chotai S, Newton H, Lamki T, Wei L, Grecula J. *Hypofractionated intensity modulated radiotherapy with temozolomide in newly diagnosed glioblastoma multiforme*. J Clin Neurosci. 2014;21:633-637.

Ang C, Guiot MC, Ramanakumar AV, Roberge D, Kavan P. *Clinical significance of molecular biomarkers in glioblastoma*. Can J Neurol Sci. 2010;37:625-630.

Bankiewicz KS, Eberling JL, Kohutnicka M, Jagust W, Pivrotto P, Bringas J, Cunningham J, Budinger TF, Harvey-White J. *Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach*. Exp Neurol. 2000;164:2-14.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. Nature. 2006a;444:756-760.

Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, Shi Q, McLendon RE, Bigner DD, Rich JN. *Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor*. Cancer Res. 2006b;66:7843-7848.

Bartek J, Lukas J, Bartkova J. *DNA damage response as an anti-cancer barrier: damage threshold and the concept of 'conditional haploinsufficiency'*. Cell Cycle. 2007;6:2344-2347.

Batista LF, Roos WP, Christmann M, Menck CF, Kaina B. *Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks*. Cancer Res. 2007;67:11886-11895.

Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP. *CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles*. Cancer Res. 2007;67:4010-4015.

- Beier D, Rohrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Trampe-Kieslich A, Giebel B, Wischhusen J, Reifenberger G, Hau P, Beier CP. *Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma*. *Cancer Res*. 2008;68:5706-5715.
- Beier D, Schulz JB, Beier CP. *Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected*. *Mol Cancer*. 2011;10:128.
- Bertamino A, Soprano M, Musella S, Rusciano MR, Sala M, Vernieri E, Di Sarno V, Limatola A, Carotenuto A, Cosconati S, Grieco P, Novellino E, Illario M, Campiglia P, Gomez-Monterrey I. *Synthesis, in vitro, and in cell studies of a new series of [indoline-3,2'-thiazolidine]-based p53 modulators*. *J Med Chem*. 2013;56:5407-5421.
- Bexell D, Gunnarsson S, Siesjo P, Bengzon J, Darabi A. *CD133+ and nestin+ tumor-initiating cells dominate in N29 and N32 experimental gliomas*. *Int J Cancer*. 2009;125:15-22.
- Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. *Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression*. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:359-370.
- Biswas A, Kumar N, Kumar P, Vasishta RK, Gupta K, Sharma SC, Patel F, Mathuriya SN. *Primary gliosarcoma--clinical experience from a regional cancer centre in north India*. *Br J Neurosurg*. 2011;25:723-729.
- Bleau AM, Hambarzumyan D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, Holland EC. *PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells*. *Cell Stem Cell*. 2009;4:226-235.
- Blough MD, Westgate MR, Beauchamp D, Kelly JJ, Stechishin O, Ramirez AL, Weiss S, Cairncross JG. *Sensitivity to temozolomide in brain tumor initiating cells*. *Neuro Oncol*. 2010;12:756-760.
- Bock HC, Puchner MJ, Lohmann F, Schutze M, Koll S, Ketter R, Buchalla R, Rainov N, Kantelhardt SR, Rohde V, Giese A. *First-line treatment of malignant glioma with carmustine implants followed by concomitant radiochemotherapy: a multicenter experience*. *Neurosurg Rev*. 2010;33:441-449.
- Brat DJ, Van Meir EG. *Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma*. *Lab Invest*. 2004;84:397-405.
- Brenner DJ, Hlatky LR, Hahnfeldt PJ, Huang Y, Sachs RK. *The linear-quadratic model and most other common radiobiological models result in similar predictions of time-dose relationships*. *Radiat Res*. 1998;150:83-91.
- Burd JF, Usategui-Gomez M. *A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase*. *Clin Chim Acta*. 1973;46:223-227.
- Carico C, Nuno M, Mukherjee D, Elramsisy A, Dantis J, Hu J, Rudnick J, Yu JS, Black KL, Bannykh SI, Patil CG. *Loss of PTEN is not associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma patients of the temozolomide era*. *PLoS One*. 2012;7:e33684.
- Chalmers AJ, Ruff EM, Martindale C, Lovegrove N, Short SC. *Cytotoxic effects of temozolomide and radiation are additive- and schedule-dependent*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009;75:1511-1519.

- Chambers I, Tomlinson SR. *The transcriptional foundation of pluripotency*. Development. 2009;136:2311-2322.
- Chan FK, Moriwaki K, De Rosa MJ. *Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity*. Methods Mol Biol. 2013;979:65-70.
- Chang SM, Parney IF, Huang W, Anderson FA, Jr., Asher AL, Bernstein M, Lillehei KO, Brem H, Berger MS, Laws ER. *Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma*. JAMA. 2005;293:557-564.
- Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF. *A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy*. Nature. 2012;488:522-526.
- Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS, Modrusan Z, Nacu S, Guerrero S, Edgar KA, Wallin JJ, Lamszus K, Westphal M, Heim S, James CD, VandenBerg SR, Costello JF, Moorefield S, Cowdrey CJ, Prados M, Phillips HS. *A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma*. Cancer Cell. 2010;17:362-375.
- Cho DY, Lin SZ, Yang WK, Lee HC, Hsu DM, Lin HL, Chen CC, Liu CL, Lee WY, Ho LH. *Targeting cancer stem cells for treatment of glioblastoma multiforme*. Cell Transplant. 2013;22:731-739.
- Choschick I. Die Differenzierungskapazität von Stammzell-ähnlichen Zellen aus humanen Glioblastomen. Naturwissenschaftliche Dissertation. Lübeck, 2015.
- Choschick I, Hirsland E, Cramer H, Schultz S, Leppert J, Tronnier V, Zechel C. *Responsiveness of stem-like human glioma cells to all-trans retinoic acid and requirement of retinoic acid receptor isoforms alpha, beta and gamma*. Neuroscience. 2014;279:44-64.
- Choudhury A, Cuddihy A, Bristow RG. *Radiation and new molecular agents part I: targeting ATM-ATR checkpoints, DNA repair, and the proteasome*. Semin Radiat Oncol. 2006;16:51-58.
- Clark AS, Deans B, Stevens MF, Tisdale MJ, Wheelhouse RT, Denny BJ, Hartley JA. *Antitumor imidazotetrazines. 32. Synthesis of novel imidazotetrazinones and related bicyclic heterocycles to probe the mode of action of the antitumor drug temozolomide*. J Med Chem. 1995;38:1493-1504.
- Costa B, Bendinelli S, Gabelloni P, Da Pozzo E, Daniele S, Scatena F, Vanacore R, Campiglia P, Bertamino A, Gomez-Monterrey I, Sorriento D, Del Giudice C, Iaccarino G, Novellino E, Martini C. *Human glioblastoma multiforme: p53 reactivation by a novel MDM2 inhibitor*. PLoS One. 2013;8:e72281.
- Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U. *Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments*. J Cell Sci. 1992;103 ( Pt 2):589-597.
- Dirks PB. *Brain tumor stem cells: the cancer stem cell hypothesis writ large*. Mol Oncol. 2010;4:420-430.
- Ehrmann J, Kolar Z, Mokry J. *Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours*. J Clin Pathol. 2005;58:222-223.

- Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B. *An acidic protein isolated from fibrous astrocytes*. Brain Res. 1971;28:351-354.
- Episkopou V. *SOX2 functions in adult neural stem cells*. Trends Neurosci. 2005;28:219-221.
- Firat E, Gaedicke S, Tsurumi C, Esser N, Weyerbrock A, Niedermann G. *Delayed cell death associated with mitotic catastrophe in gamma-irradiated stem-like glioma cells*. Radiat Oncol. 2011;6:71.
- Friedman HS, Kerby T, Calvert H. *Temozolomide and treatment of malignant glioma*. Clin Cancer Res. 2000;6:2585-2597.
- Galia A, Calogero AE, Condorelli R, Frassetto F, La Corte A, Ridolfo F, Bosco P, Castiglione R, Salemi M. *PARP-1 protein expression in glioblastoma multiforme*. Eur J Histochem. 2012;56:e9.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. *Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma*. Cancer Res. 2004;64:7011-7021.
- Gerson SL. *Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer*. J Clin Oncol. 2002;20:2388-2399.
- Givan AL. *Flow cytometry: an introduction*. Methods Mol Biol. 2011;699:1-29.
- Gomez-Monterrey I, Bertamino A, Porta A, Carotenuto A, Musella S, Aquino C, Granata I, Sala M, Brancaccio D, Picone D, Ercole C, Stiuso P, Campiglia P, Grieco P, Ianelli P, Maresca B, Novellino E. *Identification of the spiro(oxindole-3,3'-thiazolidine)-based derivatives as potential p53 activity modulators*. J Med Chem. 2010;53:8319-8329.
- Gregorian C, Nakashima J, Le Belle J, Ohab J, Kim R, Liu A, Smith KB, Groszer M, Garcia AD, Sofroniew MV, Carmichael ST, Kornblum HI, Liu X, Wu H. *Pten deletion in adult neural stem/progenitor cells enhances constitutive neurogenesis*. J Neurosci. 2009;29:1874-1886.
- Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K. *Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria*. Oncogene. 2008;27:2897-2909.
- Guo Y, Liu S, Wang P, Zhao S, Wang F, Bing L, Zhang Y, Ling EA, Gao J, Hao A. *Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas*. Histopathology. 2011;59:763-775.
- Hadaczek P, Kohutnicka M, Krauze MT, Bringas J, Pivrotto P, Cunningham J, Bankiewicz K. *Convection-enhanced delivery of adeno-associated virus type 2 (AAV2) into the striatum and transport of AAV2 within monkey brain*. Hum Gene Ther. 2006;17:291-302.
- Hadjipanayis CG, Van Meir EG. *Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy*. J Mol Med (Berl). 2009;87:363-374.

Hagerstrand D, He X, Bradic Lindh M, Hoefs S, Hesselager G, Ostman A, Nister M. *Identification of a SOX2-dependent subset of tumor- and sphere-forming glioblastoma cells with a distinct tyrosine kinase inhibitor sensitivity profile.* Neuro Oncol. 2011;13:1178-1191.

Han SJ, Yang I, Ahn BJ, Otero JJ, Tihan T, McDermott MW, Berger MS, Prados MD, Parsa AT. *Clinical characteristics and outcomes for a modern series of primary gliosarcoma patients.* Cancer. 2010;116:1358-1366.

Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR. *Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity.* J Clin Oncol. 2008;26:4189-4199.

Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. *Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells.* Cancer Res. 2001a;61:5843-5849.

Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. *p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells.* Cancer Res. 2001b;61:1957-1963.

Hirota Y, Masunaga S, Kondo N, Kawabata S, Hirakawa H, Yajima H, Fujimori A, Ono K, Kuroiwa T, Miyatake S. *High linear-energy-transfer radiation can overcome radioresistance of glioma stem-like cells to low linear-energy-transfer radiation.* J Radiat Res. 2014;55:75-83.

Hoffmann I, Clarke PR, Marcote MJ, Karsenti E, Draetta G. *Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis.* EMBO J. 1993;12:53-63.

Hu X, Pandolfi PP, Li Y, Koutcher JA, Rosenblum M, Holland EC. *mTOR promotes survival and astrocytic characteristics induced by Pten/AKT signaling in glioblastoma.* Neoplasia. 2005;7:356-368.

Huse JT, Holland EC. *Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma.* Nat Rev Cancer. 2010;10:319-331.

Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. *Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro.* Glia. 2002;39:193-206.

Jastaniyah N, Murtha A, Pervez N, Le D, Roa W, Patel S, Mackenzie M, Fulton D, Field C, Ghosh S, Fallone G, Abdulkarim B. *Phase I study of hypofractionated intensity modulated radiation therapy with concurrent and adjuvant temozolomide in patients with glioblastoma multiforme.* Radiat Oncol. 2013;8:38.

Jiang Y, Uhrbom L. *On the origin of glioma.* Ups J Med Sci. 2012;117:113-121.

Jun GJ, Zhong GG, Ming ZS. *miR-218 inhibits the proliferation of glioma U87 cells through the inactivation of the CDK6/cyclin D1/p21 pathway.* Oncol Lett. 2015;9:2743-2749.

Kim Y, Kim KH, Lee J, Lee YA, Kim M, Lee SJ, Park K, Yang H, Jin J, Joo KM, Nam DH. *Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance.* Lab Invest. 2012;92:466-473.

- Kozak KR, Mahadevan A, Moody JS. *Adult gliosarcoma: epidemiology, natural history, and factors associated with outcome*. Neuro Oncol. 2009;11:183-191.
- Krauze MT, Vandenberg SR, Yamashita Y, Saito R, Forsayeth J, Noble C, Park J, Bankiewicz KS. *Safety of real-time convection-enhanced delivery of liposomes to primate brain: a long-term retrospective*. Exp Neurol. 2008;210:638-644.
- Kreis NN, Sanhaji M, Rieger MA, Louwen F, Yuan J. *p21Waf1/Cip1 deficiency causes multiple mitotic defects in tumor cells*. Oncogene. 2014;33:5716-5728.
- Lathia JD, Heddleston JM, Venere M, Rich JN. *Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment*. Cell Stem Cell. 2011;8:482-485.
- Lee J, Kim SS. *The function of p27 KIP1 during tumor development*. Exp Mol Med. 2009;41:765-771.
- Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA. *Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines*. Cancer Cell. 2006;9:391-403.
- Lee YY, Yang YP, Huang MC, Wang ML, Yen SH, Huang PI, Chen YW, Chiou SH, Lan YT, Ma HI, Shih YH, Chen MT. *MicroRNA142-3p promotes tumor-initiating and radioresistant properties in malignant pediatric brain tumors*. Cell Transplant. 2014;23:669-690.
- Lefranc F, Facchini V, Kiss R. *Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas*. Oncologist. 2007;12:1395-1403.
- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. *Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma*. Mol Cancer. 2006;5:67.
- Liu S, Yin F, Zhang J, Wicha MS, Chang AE, Fan W, Chen L, Fan M, Li Q. *Regulatory roles of miRNA in the human neural stem cell transformation to glioma stem cells*. J Cell Biochem. 2014;115:1368-1380.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol. 2007;114:97-109.
- Luo JW, Wang X, Yang Y, Mao Q. *Role of micro-RNA (miRNA) in pathogenesis of glioblastoma*. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2015;19:1630-1639.
- Lutterbach J, Guttenberger R, Pagenstecher A. *Gliosarcoma: a clinical study*. Radiother Oncol. 2001;61:57-64.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor; 1989.

- Matsuoka J, Yashiro M, Sakurai K, Kubo N, Tanaka H, Muguruma K, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K. *Role of the stemness factors sox2, oct3/4, and nanog in gastric carcinoma*. J Surg Res. 2012;174:130-135.
- McCord AM, Jamal M, Williams ES, Camphausen K, Tofilon PJ. *CD133+ glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines*. Clin Cancer Res. 2009;15:5145-5153.
- Monjazeb AM, Ayala D, Jensen C, Case LD, Bourland JD, Ellis TL, McMullen KP, Chan MD, Tatter SB, Lesser GJ, Shaw EG. *A phase I dose escalation study of hypofractionated IMRT field-in-field boost for newly diagnosed glioblastoma multiforme*. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012;82:743-748.
- Morshead CM, van der Kooy D. *Disguising adult neural stem cells*. Curr Opin Neurobiol. 2004;14:125-131.
- Muller PA, Vousden KH. *Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities*. Cancer Cell. 2014;25:304-317.
- Mut M, Sherman JH, Shaffrey ME, Schiff D. *Cintredekin besudotox in treatment of malignant glioma*. Expert Opin Biol Ther. 2008;8:805-812.
- Network TCGAR. *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature. 2008;455:1061-1068.
- Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. *Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease*. Circ Res. 2008;103:343-351.
- Norden AD, Wen PY. *Glioma therapy in adults*. Neurologist. 2006;12:279-292.
- Ochs K, Kaina B. *Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent*. Cancer Res. 2000;60:5815-5824.
- Ohgaki H, Kleihues P. *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol. 2005;64:479-489.
- Ohgaki H, Kleihues P. *Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas*. Cancer Sci. 2009;100:2235-2241.
- Ohka F, Natsume A, Wakabayashi T. *Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme*. Neurol Res Int. 2012;2012:878425.
- Ostermann S, Csajka C, Buclin T, Leyvraz S, Lejeune F, Decosterd LA, Stupp R. *Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients*. Clin Cancer Res. 2004;10:3728-3736.
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. *Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*. Cell Prolif. 2012;45:487-498.
- Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. *Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited*. Stem Cells. 2010;28:639-648.

- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science. 2008;321:1807-1812.
- Persano L, Rampazzo E, Della Puppa A, Pistollato F, Basso G. *The three-layer concentric model of glioblastoma: cancer stem cells, microenvironmental regulation, and therapeutic implications*. ScientificWorldJournal. 2011;11:1829-1841.
- Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. *Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation*. Cytotechnology. 2012;64:109-130.
- Porter AG, Janicke RU. *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*. Cell Death Differ. 1999;6:99-104.
- Portnow J, Badie B, Chen M, Liu A, Blanchard S, Synold TW. *The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation*. Clin Cancer Res. 2009;15:7092-7098.
- Preusser M, Haberler C, Hainfellner JA. *Malignant glioma: neuropathology and neurobiology*. Wien Med Wochenschr. 2006;156:332-337.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature. 2001;414:105-111.
- Riccardi C, Nicoletti I. *Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. Nat Protoc. 2006;1:1458-1461.
- Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R. *Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells*. Nature. 2010;468:824-828.
- Ricci MS, Zong WX. *Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways*. Oncologist. 2006;11:342-357.
- Rich JN. *Cancer stem cells in radiation resistance*. Cancer Res. 2007;67:8980-8984.
- Romero-Rojas AE, Diaz-Perez JA, Ariza-Serrano LM, Amaro D, Lozano-Castillo A. *Primary gliosarcoma of the brain: radiologic and histopathologic features*. Neuroradiol J. 2013;26:639-648.
- Roos WP, Batista LF, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CF, Kaina B. *Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine*. Oncogene. 2007;26:186-197.
- Rosen JM, Jordan CT. *The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm*. Science. 2009;324:1670-1673.
- Rubner Y, Muth C, Strnad A, Derer A, Sieber R, Buslei R, Frey B, Fietkau R, Gaipl US. *Fractionated radiotherapy is the main stimulus for the induction of cell death and of Hsp70 release of p53 mutated glioblastoma cell lines*. Radiat Oncol. 2014;9:89.

Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. *Survivin: a new target for anti-cancer therapy*. *Cancer Treat Rev*. 2009;35:553-562.

Rycaj K, Tang DG. *Cancer stem cells and radioresistance*. *Int J Radiat Biol*. 2014;90:615-621.

Ryu S, Buatti JM, Morris A, Kalkanis SN, Ryken TC, Olson JJ. *The role of radiotherapy in the management of progressive glioblastoma : a systematic review and evidence-based clinical practice guideline*. *J Neurooncol*. 2014;118:489-499.

Sabbatino F, Fuscillo C, Somma D, Pacelli R, Poudel R, Pepin D, Leonardi A, Carlomagno C, Della Vittoria Scarpati G, Ferrone S, Pepe S. *Effect of p53 activity on the sensitivity of human glioblastoma cells to PARP-1 inhibitor in combination with topoisomerase i inhibitor or radiation*. *Cytometry A*. 2014.

Salazar OM, Rubin P. *The spread of glioblastoma multiforme as a determining factor in the radiation treated volume*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1976;1:627-637.

Schonberg DL, Lubelski D, Miller TE, Rich JN. *Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy*. *Mol Aspects Med*. 2013.

Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. *Cancer stem cells in nervous system tumors*. *Oncogene*. 2004;23:7267-7273.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. *Cancer Res*. 2003;63:5821-5828.

Sizoo EM, Braam L, Postma TJ, Pasmán HR, Heimans JJ, Klein M, Reijneveld JC, Taphoorn MJ. *Symptoms and problems in the end-of-life phase of high-grade glioma patients*. *Neuro Oncol*. 2010;12:1162-1166.

Sorriente D, Del Giudice C, Bertamino A, Ciccarelli M, Gomez-Monterrey I, Campiglia P, Novellino E, Illario M, Trimarco B, De Luca N, Iaccarino G. *New small molecules, ISA27 and SM13, inhibit tumour growth inducing mitochondrial effects of p53*. *Br J Cancer*. 2015;112:77-85.

Stupp R, Hegi ME. *Targeting brain-tumor stem cells*. *Nat Biotechnol*. 2007;25:193-194.

Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. *Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions*. *J Clin Oncol*. 2007;25:4127-4136.

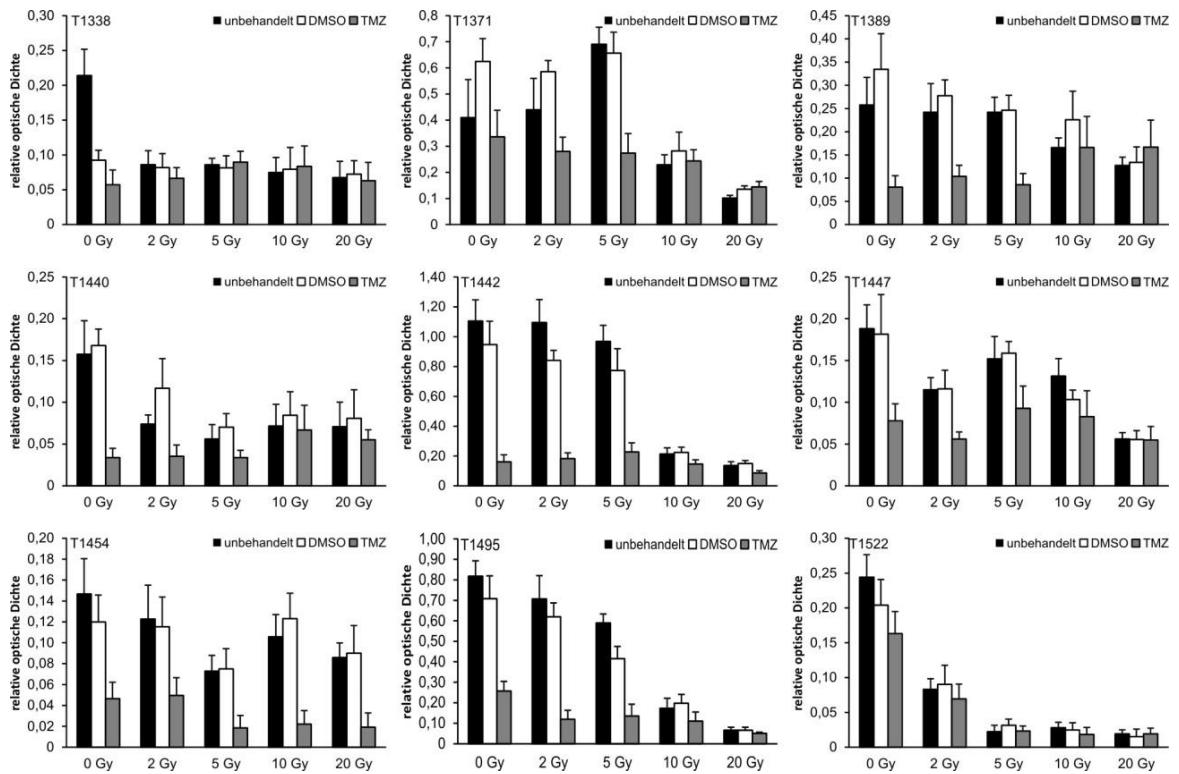
Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO. *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. *Lancet Oncol*. 2009;10:459-466.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. *N Engl J Med*. 2005;352:987-996.

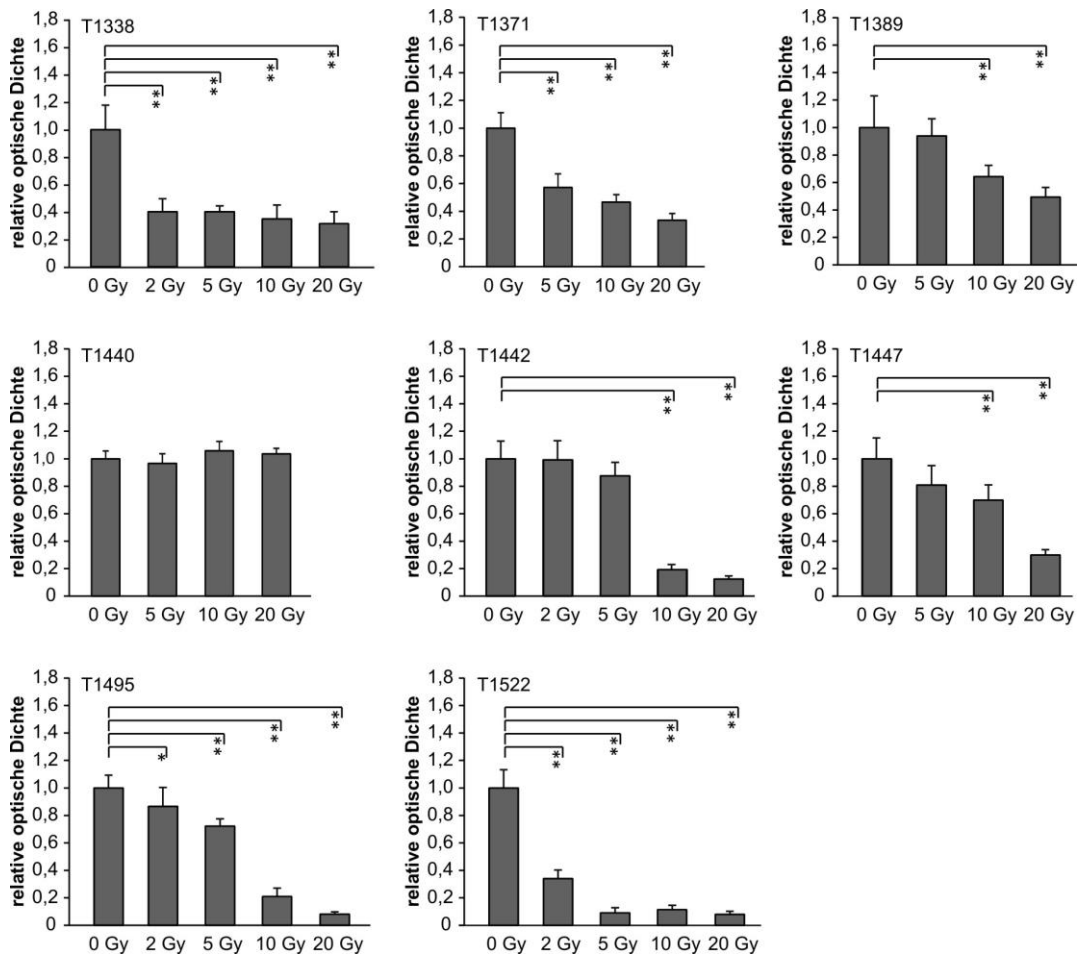
- Sun Y, Peng ZL. *Programmed cell death and cancer*. Postgrad Med J. 2009;85:134-140.
- Sutter R, Yadirgi G, Marino S. *Neural stem cells, tumour stem cells and brain tumours: dangerous relationships?* Biochim Biophys Acta. 2007;1776:125-137.
- Tentori L, Portarena I, Torino F, Scerrati M, Navarra P, Graziani G. *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor increases growth inhibition and reduces G(2)/M cell accumulation induced by temozolomide in malignant glioma cells*. Glia. 2002;40:44-54.
- Trivedi RN, Almeida KH, Fornsgaglio JL, Schamus S, Sobol RW. *The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death*. Cancer Res. 2005;65:6394-6400.
- Twentyman PR, Luscombe M. *A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity*. Br J Cancer. 1987;56:279-285.
- Vallieres L. *Trabedersen, a TGFbeta2-specific antisense oligonucleotide for the treatment of malignant gliomas and other tumors overexpressing TGFbeta2*. IDrugs. 2009;12:445-453.
- Valtonen S, Timonen U, Toivanen P, Kalimo H, Kivipelto L, Heiskanen O, Unsgaard G, Kuurne T. *Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high-grade gliomas: a randomized double-blind study*. Neurosurgery. 1997;41:44-48; discussion 48-49.
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. *Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma*. CA Cancer J Clin. 2010;60:166-193.
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN. *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. Cancer Cell. 2010;17:98-110.
- Veselska R, Kuglik P, Cejpek P, Svachova H, Neradil J, Loja T, Relichova J. *Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme*. BMC Cancer. 2006;6:32.
- Vyas V, Palmer L, Mudge R, Jiang R, Fleck A, Schaly B, Osei E, Charland P. *On bolus for megavoltage photon and electron radiation therapy*. Med Dosim. 2013;38:268-273.
- Walbert T, Khan M. *End-of-life symptoms and care in patients with primary malignant brain tumors: a systematic literature review*. J Neurooncol. 2014;117:217-224.
- Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Boe SO, Svendsen A, Prestegarden L, Rosland G, Thorsen F, Stuhr L, Molven A, Bjerkvig R, Enger PO. *CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells*. Int J Cancer. 2008;122:761-768.
- Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V. *Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium*. Nature. 2010;468:829-833.

- Wang X, Chen JX, Liu YH, You C, Mao Q. *Mutant TP53 enhances the resistance of glioblastoma cells to temozolomide by up-regulating O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase*. *Neurol Sci*. 2013;34:1421-1428.
- Westphal M, Ram Z, Riddle V, Hilt D, Bortey E. *Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial*. *Acta Neurochir (Wien)*. 2006;148:269-275; discussion 275.
- Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM. *Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells?* *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:2510-2522.
- Xie Z, Chin LS. *Molecular and cell biology of brain tumor stem cells: lessons from neural progenitor/stem cells*. *Neurosurg Focus*. 2008;24:E25.
- Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschsmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS. *Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme*. *Oncogene*. 2004;23:9392-9400.
- Zaidi HA, Kosztowski T, DiMeco F, Quinones-Hinojosa A. *Origins and clinical implications of the brain tumor stem cell hypothesis*. *J Neurooncol*. 2009;93:49-60.
- Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, Lichter P, Unterberg A, Radlwimmer B, Herold-Mende CC. *Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients*. *Clin Cancer Res*. 2008;14:123-129.
- Zhang M, Song T, Yang L, Chen R, Wu L, Yang Z, Fang J. *Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients*. *J Exp Clin Cancer Res*. 2008;27:85.
- Zhao Y, Aguilar A, Bernard D, Wang S. *Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction (MDM2 Inhibitors) in clinical trials for cancer treatment*. *J Med Chem*. 2015;58:1038-1052.
- Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen AJ, Perry SR, Tonon G, Chu GC, Ding Z, Stommel JM, Dunn KL, Wiedemeyer R, You MJ, Brennan C, Wang YA, Ligon KL, Wong WH, Chin L, dePinho RA. *Pten and p53 converge on c-Myc to control differentiation, self-renewal, and transformation of normal and neoplastic stem cells in glioblastoma*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2008;73:427-437.

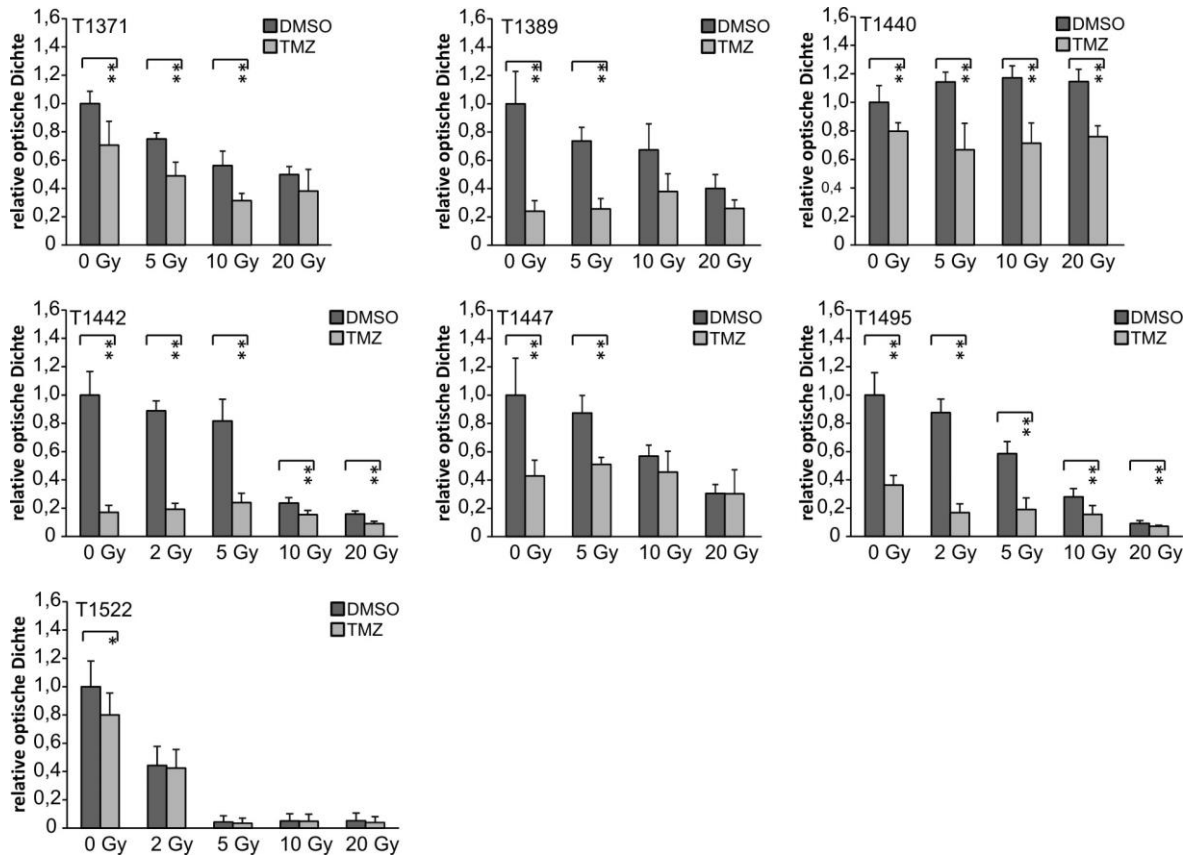
## 7. Anhang



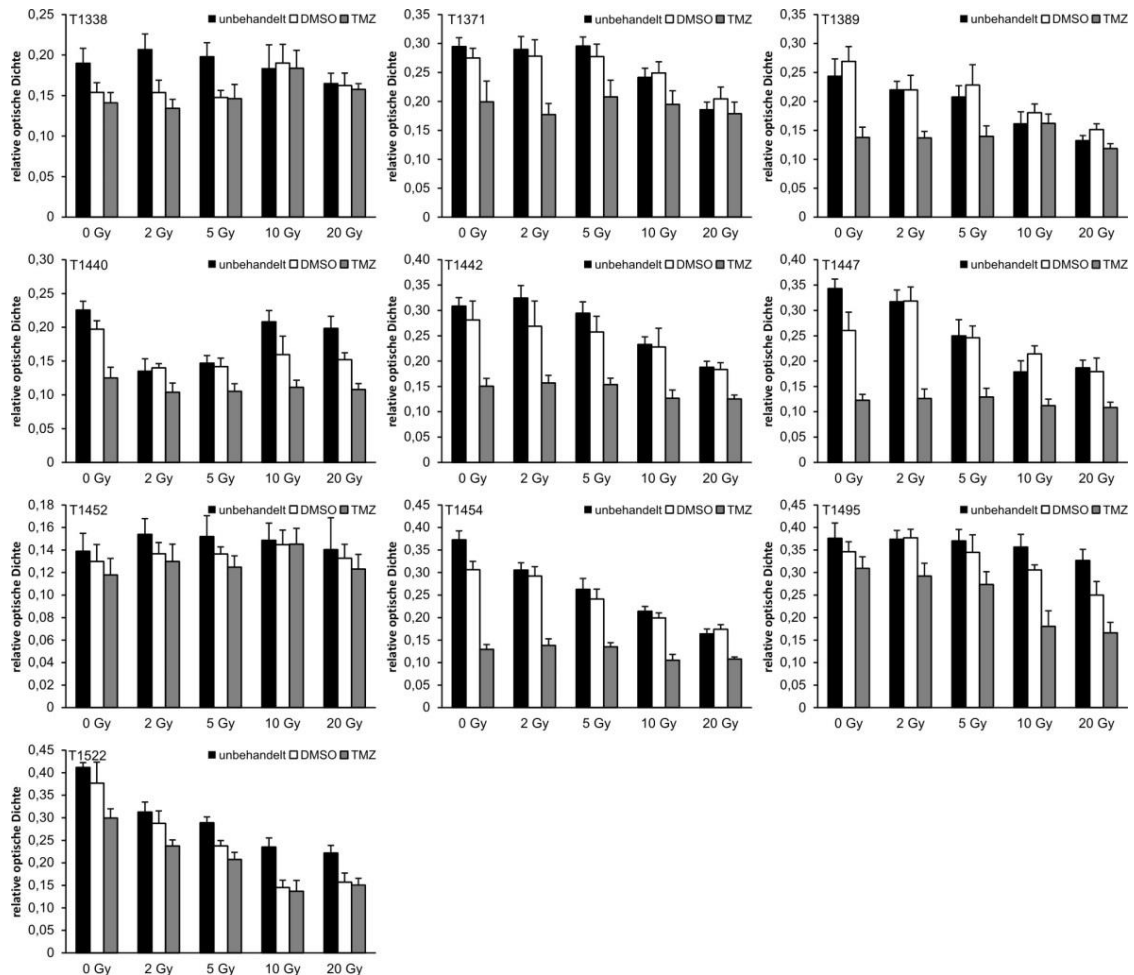
**Abb. 17: Effekt der Bestrahlung mit gesteigerten Dosen in An- und Abwesenheit von Temozolomid (TMZ) auf den Einbau von BrdU in die DNA. - BrdU-ELISA.** DMSO diente als Lösungsmittel für die hydrophobe Substanz TMZ. Die Dosis der Bestrahlung wurde in parallelen Ansätzen von 2 auf 5, 10 und 20 Gray (Gy) gesteigert. Die eingesetzten TMZ-Konzentrationen betragen 50µM TMZ (T1338, T1440), 100µM (T1442, T1447, T1495, T1522), 200µM (T1371, T1389, T1454). BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; ELISA: enzymgekoppelter Immunsorptionsstest (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*); DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; TMZ: Temozolomid; T: Tumor.



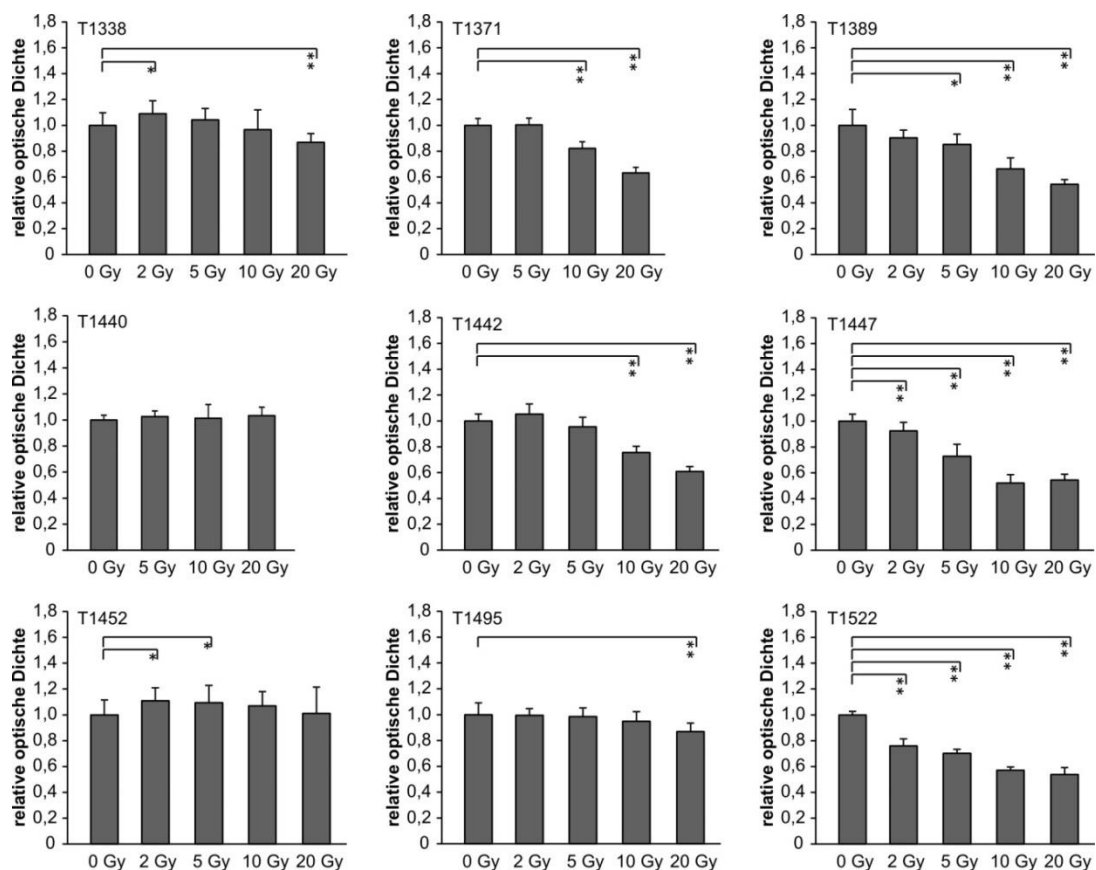
**Abb. 18: Effekt ansteigender Strahlendosen auf den Einbau von BrdU in die DNA proliferierender SLGC-Linien.** - BrdU-ELISA. Die Bestrahlung erfolgte in parallelen Ansätzen (96-Lochplatten) mit 2, 5, 10 und 20 Gray (Gy). Eine 96-Lochplatte wurde nicht bestrahlt (0 Gy). Die Werte der unbestrahlten Kontrollproben wurden als 1 definiert und alle übrigen Werte wurden relativ dazu dargestellt. Der Einbau des Basenanalogons BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) in die DNA proliferierender Zellen wurde am Tag d5 mittels ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*; Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 parallel untersuchten Proben und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des t-Tests in Relation zur unbestrahlten Kontrolle (0 Gy) bestimmt. \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,005$ . BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; ELISA: enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*); Gy: Gray; T: Tumor



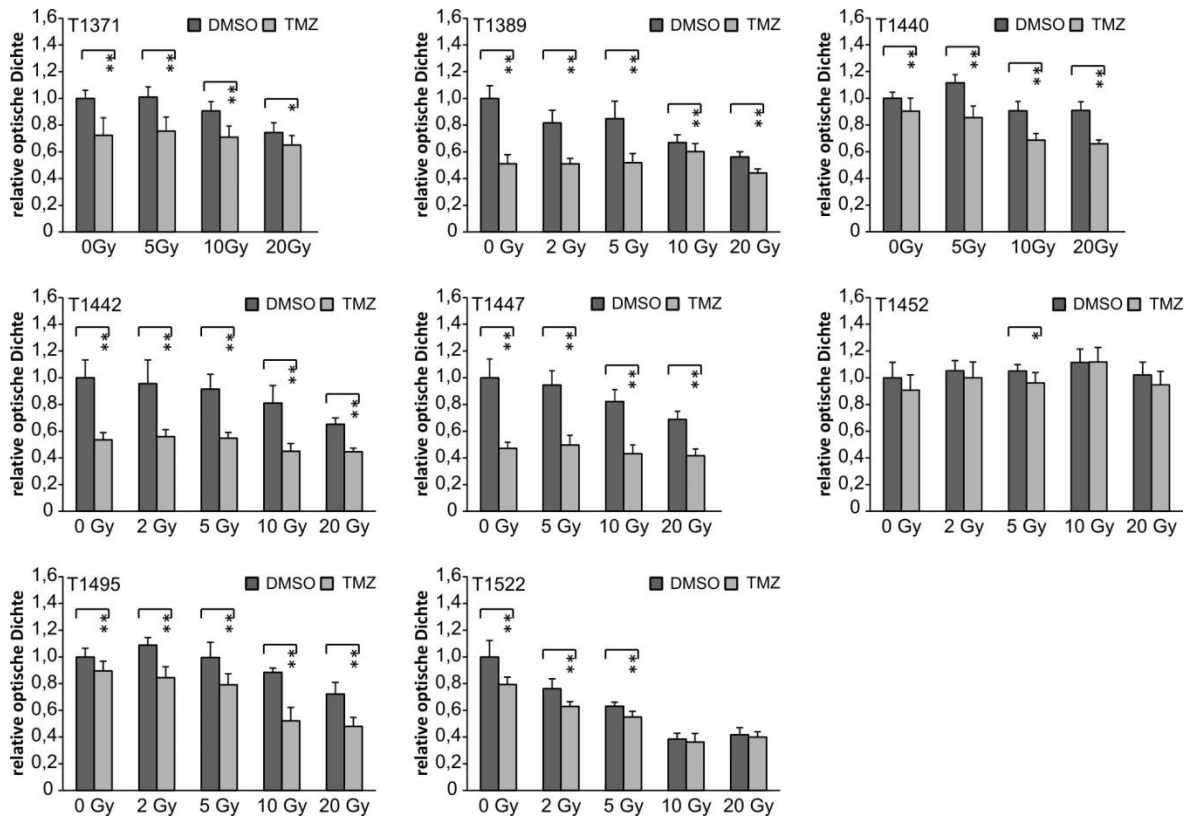
**Abb. 19: Effekt steigender Strahlendosen in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). Analyse der Proliferation von SLGC-Linien.** - BrdU-ELISA. DMSO diente als Lösungsmittel für die hydrophobe Substanz TMZ. Die relative optische Dichte in der unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert. Die Dosis der Bestrahlung wurde in parallelen Ansätzen von 2 auf 5, 10 und 20 Gray gesteigert. Die eingesetzten TMZ-Konzentrationen betragen 50µM (T1440), 100µM (T1442, T1447, T1495, T1522), 200µM (T1371, T1389). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des t-Tests zwischen identisch bestrahlten Proben in An- und Abwesenheit von TMZ ermittelt und mit \*( $p < 0,05$ ) und \*\*( $p < 0,005$ ) gekennzeichnet. BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; ELISA: enzymgekoppelter Immunsorptionsstest (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*); DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; TMZ: Temozolomid; T: Tumor.



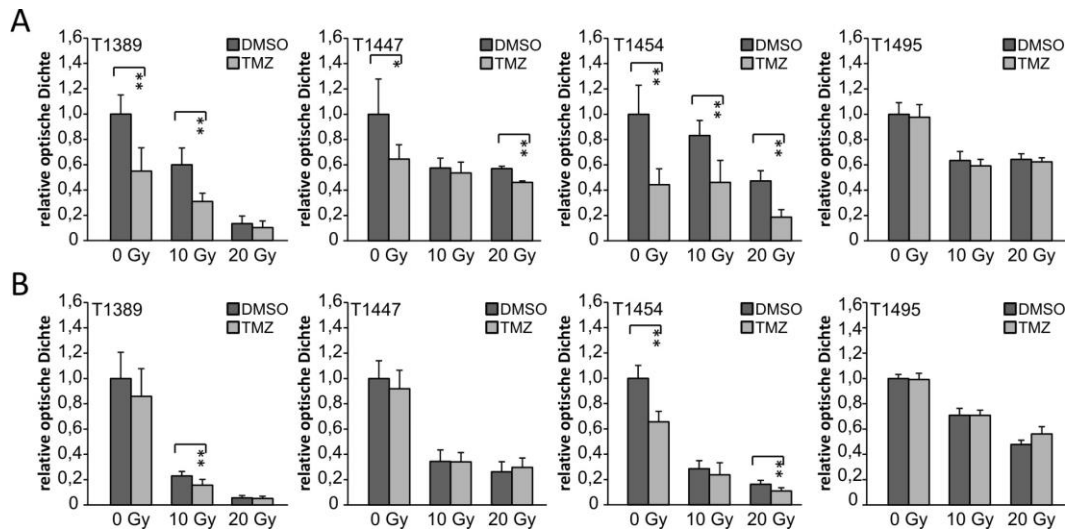
**Abb. 20: Effekt der Bestrahlung mit gesteigerten Dosen in An- und Abwesenheit von Temozolomid (TMZ) auf die Vitalität von Gliomzellen.** - MTT-Assay. DMSO diente als Lösungsmittel für die hydrophobe Substanz TMZ. Die Dosis der Bestrahlung wurde in parallelen Ansätzen von 2 auf 5, 10 und 20 Gray (Gy) gesteigert. Die eingesetzten TMZ-Konzentrationen betragen 50µM (T1338, T1440), 100µM (T1442, T1447, T1495, T1522), 200µM (T1371, T1389, T1454). MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; TMZ: Temozolomid; T: Tumor.



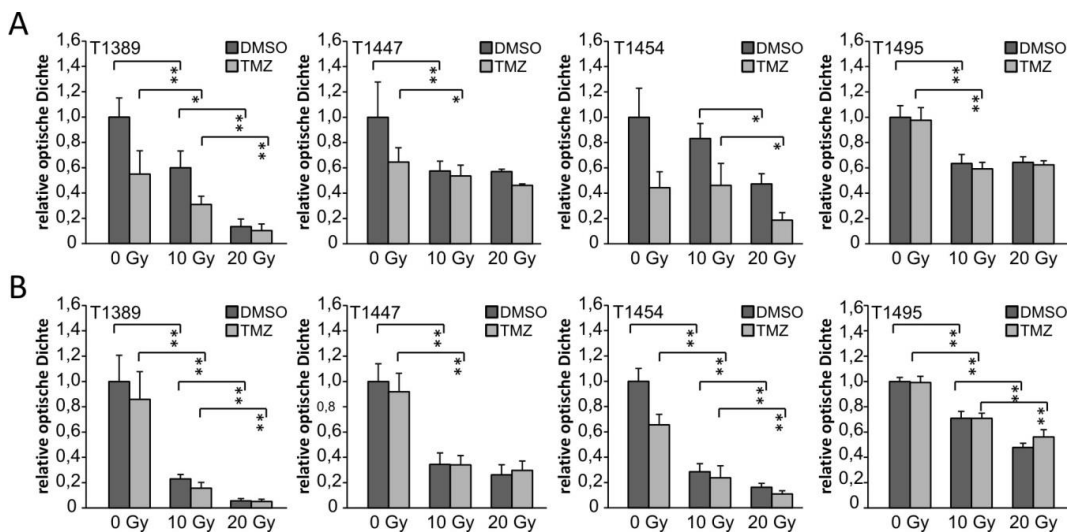
**Abb. 21: Effekt ansteigender Strahlendosen auf die Vitalität von SLGC-Linien.** - MTT-Assay. Die Bestrahlung erfolgte in parallelen Ansätzen (96-Lochplatten) mit 2, 5, 10 und 20 Gray (Gy). Eine 96-Lochplatte wurde nicht bestrahlt (0 Gy). Die Werte der unbehandelten Kontrollproben wurden als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Die Umwandlung des Farbstoffes MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] in ein blauviolettes Formazan wurde am Tag d5 mittels des MTT-Assays bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 parallel untersuchten Proben und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des t-Tests in Relation zur unbestrahlten Probe (0 Gy) bestimmt: \* für  $p < 0,05$ ; \*\* für  $p < 0,005$ . Gy: Gray; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; T: Tumor.



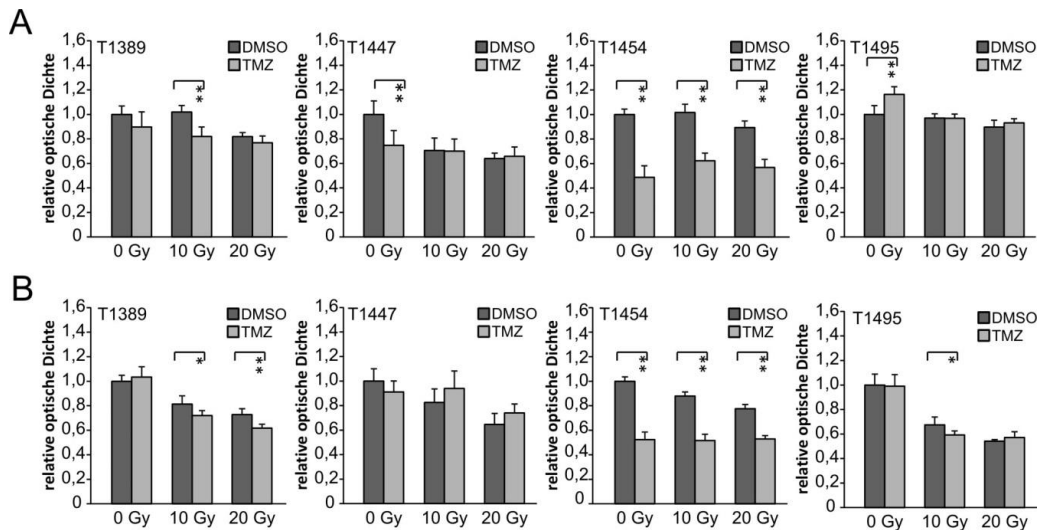
**Abb. 22: Effekt steigender Strahlendosen in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). Analyse der Vitalität von SLGC-Linien.- MTT-Assay.** DMSO diente als Lösungsmittel für die hydrophobe Substanz TMZ. Die relative optische Dichte in der unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert. Die Dosis der Bestrahlung wurde in parallelen Ansätzen von 2 auf 5, 10 und 20 Gray (Gy) gesteigert. Die eingesetzten TMZ-Konzentrationen betragen 50µM (T1440), 100µM (T1442, T1447, T1495, T1522), 200µM (T1371, T1389). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des t-Tests zwischen den bestrahlten Proben in An- und Abwesenheit von TMZ ermittelt und mit \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,005$ ) gekennzeichnet. MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid; DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; TMZ: Temozolomid; T: Tumor.



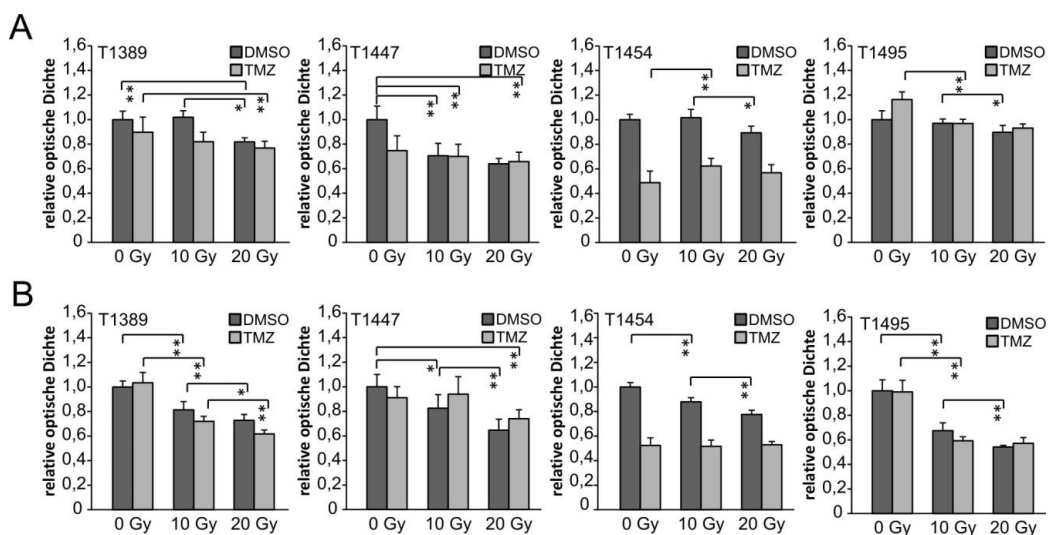
**Abb. 23: Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Proliferation von SLGC-Linien (I).** – BrdU-ELISA. (A): Zeitgleiche Behandlung mit ionisierender Strahlung und TMZ. (B): Zugabe von TMZ 24h nach der Bestrahlung. DMSO diente als Lösungsmittel für die hydrophobe Substanz TMZ. Die optische Dichte des BrdU-Einbaus in der unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert. Die TMZ-Konzentrationen betragen 50µM (T1495), 100µM (T1447) und 200µM (T1389, T1454). Signifikante Unterschiede (t-Test) wurden zwischen den bestrahlten Proben in An- und Abwesenheit von TMZ mit \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,005$ ) gekennzeichnet. BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; ELISA: enzymgekoppelter Immunsorptionsstest (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*); DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; TMZ: Temozolomid; T: Tumor.



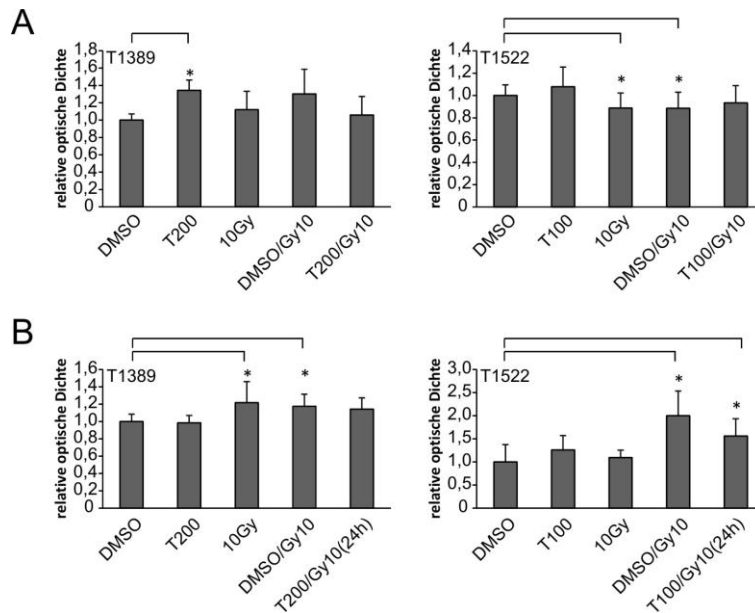
**Abb. 24: Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Proliferation von SLGC-Linien (II).** – BrdU-ELISA. (A): Zeitgleiche Behandlung mit ionisierender Strahlung und TMZ. (B): Zugabe von TMZ 24h nach der Bestrahlung. DMSO diente als Lösungsmittel für die hydrophobe Substanz TMZ. Die optische Dichte des BrdU-Einbaus in der unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert. Die TMZ-Konzentrationen betragen 50µM (T1495), 100µM (T1447) und 200µM (T1389, T1454). Signifikante Unterschiede (t-Test) wurden zwischen den unbestrahlten und den mit 10 Gy bestrahlten Proben sowie zwischen den mit 10 Gy und mit 20 Gy bestrahlten Proben in An- und Abwesenheit von TMZ mit \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,005$ ) gekennzeichnet. BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*); DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; TMZ: Temozolomid; T: Tumor.



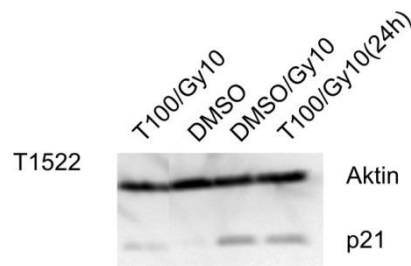
**Abb. 25: Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Vitalität von Gliomzellen (I).** – MTT-Assay. (A): Direkt aufeinanderfolgende zeitgleiche Behandlung mit ionisierender Strahlung und TMZ. (B): Zugabe von TMZ 24h nach der Bestrahlung. DMSO diente als Lösungsmittel für die hydrophobe Substanz TMZ. Die relative optische Dichte in der unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert. Die TMZ-Konzentrationen betragen 50 $\mu$ M (T1495), 100 $\mu$ M (T1447) und 200 $\mu$ M (T1389, T1454). Signifikante Unterschiede (t-Test) wurden zwischen den bestrahlten Proben in An- und Abwesenheit von TMZ mit \*( $p < 0,05$ ) und \*\*( $p < 0,005$ ) gekennzeichnet. DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; TMZ: Temozolomid; T: Tumor.



**Abb. 26: Einfluss der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Vitalität von Gliomzellen (II).** – MTT-Assay. (A): Direkt aufeinanderfolgende zeitgleiche Behandlung mit ionisierender Strahlung und TMZ. (B): Zugabe von TMZ 24h nach der Bestrahlung. DMSO diente als Lösungsmittel für die hydrophobe Substanz TMZ. Die optische Dichte in der unbestrahlten DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert. Die TMZ-Konzentration betragen 50 $\mu$ M (T1495), 100 $\mu$ M (T1447) und 200 $\mu$ M (T1389, T1454). Signifikante Unterschiede (t-Test) wurden zwischen den unbestrahlten und den mit 10 Gy bestrahlten Proben sowie zwischen den mit 10 Gy und mit 20 Gy bestrahlten Proben in An- und Abwesenheit von TMZ mit \*( $p < 0,05$ ) und \*\*( $p < 0,005$ ) gekennzeichnet. DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid; TMZ: Temozolomid; T: Tumor.



**Abb. 27: Auswirkungen der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und TMZ-Applikation auf die Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH).** – LDH-Assay. (A): zeitgleiche Behandlung mit Bestrahlung und TMZ (T/Gy10). (B): Zugabe des TMZ 24h nach der Bestrahlung [T/Gy10(24h)]. Die Bestrahlung erfolgte jeweils mit 10 Gray. TMZ wurde in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben (T1389: 200µM; T1522: 100µM). Für jede Behandlung wurde der Mittelwert aus 8 Proben berechnet und die Standardabweichung angegeben. Es wurde jeweils mit Hilfe des t-Tests die Signifikanz auf DMSO bezogen bestimmt. \* für  $p < 0,05$ . DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; LDH: Lactatdehydrogenase; TMZ: Temozolomid; T: Tumor.



**Abb. 28: Expression des Zellzyklusinhibitors p21<sup>Cip1/WAF1</sup> in der behandelten und unbehandelten SLGC-Linie T1522.** – Western Blot-Analyse. Dargestellt ist das Beispiel einer Western Blot-Analyse der Expression des Zellzyklusinhibitors p21<sup>WAF1</sup> in der SLGC-Linie T1522. Gemessen wurde die Expression nach alleiniger Bestrahlung (DMSO/Gy10) sowie nach zeitgleicher (T100/Gy10) und zeitversetzter [T100/Gy10(24h)] Doppelbehandlung. DMSO diente als Lösungsmittel für TMZ und wurde daher als Kontrolle mitgeführt. Für die Normalisierung der Expression wurde Aktin genutzt. DMSO: Dimethylsulfoxid; Gy: Gray; T: Temozolomid.

## 8. Erklärung

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines größeren Projektes an dem mehrere Doktoranden und Mitarbeiter beteiligt sind. Die in dieser Arbeit dargestellten Daten wurden mit nachfolgender Einschränkung ausschließlich von mir gewonnen:

Bei der Analyse der Lactatdehydrogenase sowie der Western Blot-Analyse wurde ich von der technischen Assistentin Frau E. Pawlak unterstützt. Diese Arbeiten beinhalteten primär Zuarbeiten wie das Expandieren und Plattieren von Zellen und die Behandlung der Zellkulturen. Des Weiteren unterstützte mich Frau Pawlak bei den Messungen des Lactatdehydrogenase-Assays sowie der Durchführung des Western Blots.

In der Diskussion nehme ich Bezug auf die Eigenschaften der untersuchten SLGC-Linien. Diese wurden von mehreren Mitarbeitern des Labores gewonnen.

Während meiner Dissertation wurde mir von Herrn Prof. Dr. med. V. Tronnier und Frau PD Dr. rer. nat. C. Zechel die Teilnahme an folgendem Kongress ermöglicht:

- Fraunhofer Life Science Symposium Leipzig 2012

Poster:

- Influence of the sequential arrangement of radio- and concomitant chemotherapy on growth and survival of glioma stem cells

Publikation:

- **Temozolomide improves the responsiveness of stem-like glioma cells to irradiation at suboptimal radiation doses.**  
Anna Maria Dorenberg, Eileen Hirseland, Markus Dahlke, Sina Schultz, Anja Kerstein, Volker Tronnier, Dirk Rades, Christina Zechel  
(Journal of Neuro-Oncology; in Revision)

Lüneburg, den 09.12.2015

## 9. Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Volker Tronnier, Direktor der Klinik für Neurochirurgie, dass er mir die Durchführung der Doktorarbeit im Labor für Neuroonkologie und Molekularbiologie ermöglichte. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Christina Zechel für die Bereitstellung des Themas, die Planung des gesamten Projektes und die Betreuung während der gesamten Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dirk Rades, Chefarzt der Klinik für Strahlentherapie, für die Unterstützung bei der Planung der Bestrahlung der Gliomzelllinien und die Bereitstellung des Linearbeschleunigers bedanken sowie bei Herrn Markus Dahlke (Klinik für Strahlentherapie) für seinen unermüdlichen Einsatz bei der Bestrahlung der SLGC-Linien. Ein weiterer Dank gilt dem Institut für systemische Entzündungsforschung für die Bereitstellung des Durchflusszytometers und insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Tillman Vollbrandt für die Unterstützung bei der Durchführung der durchflusszytometrischen Messungen.

Ferner bedanke ich mich bei der Werner und Klara Kreitz-Stiftung für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Zudem möchte ich mich ganz besonders bei den technischen Assistentinnen des Labors Frau Edith Pawlak und Frau Susanne Behling bedanken, ohne die die Durchführung der Experimente parallel zu meinem Medizinstudium sicherlich nicht so erfolgreich möglich gewesen wäre. Weiterhin möchte ich mich bei den übrigen Kollegen des Labors für die Bereitstellung ihrer Daten bedanken, durch die eine weiterführende Interpretation der von mir gewonnenen Ergebnisse erst möglich wurde. Bei allen Mitarbeitern des Labors möchte ich mich ganz besonders für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Frau Dr. rer. nat. Isabel Choschick, die mir sowohl während der experimentellen Phase im Labor als auch in der Phase des Schreibens stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Überdies hinaus möchte ich mich herzlichst bei meinen Freunden bedanken, die mich mit ihren technischen Fähigkeiten während des Anfertigens der Arbeit und in Fragen des Layouts tatkräftig unterstützten.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern Theodor und Jutta Dorenberg bedanken, die immer für mich da sind und mich nicht nur während der Erstellung meiner Doktorarbeit sondern auch das gesamte Medizinstudium hindurch nach all ihren Kräften hin unterstützten und förderten.

## **10. Lebenslauf**

Dieser Abschnitt enthält persönliche Daten, die nicht Teil der Online-Veröffentlichung sind.