Aus der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck Direktor: Prof. Dr. Volker Tronnier

"Zelluläre und molekulare Heterogenität stammzellähnlicher Gliomzellen und Bedeutung für die Therapiesensibilität"

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Eileen Hirseland

aus Wriezen

Lübeck 2017

1. Berichterstatter/ Berichterstatterin: PD Dr. rer. nat. Christina Zechel

2. Berichterstatter/ Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Rohwedel

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.07.2017

<u>Inhaltsverzeichnis</u>

Zusammenfassung	6
Abstract	7
1. Einleitung	
1.1. Gliome	
1.2. GBM-Subtypen	
1.3. Deregulierte Signalwege	9
Deregulierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Verlust von PTEN	9
Mutation des Tumorsuppressors p53	
Deregulierung im Signalweg des Tumorsuppressors Retinoblastom-Protein	
1.4. Therapie und Therapieresistenzen	
1.5. Stammzellähnliche Gliomzellen	
1.6. Marker für stammzellähnliche Gliomzellen	
1.7. Therapieresistenz stammzellähnlicher Gliomzellen	
2. Fragestellung	
3. Material und Methoden	
3.1. Zelllinien	
3.2. Zellkultur	
3.3. Klonale Expansion	
3.4. Bestrahlung und Behandlung mit Temozolomid	
3.5. Vitalitätstest	
3.6. Immunzytochemische Analyse	
3.7. Zellsortierung	
Durchflusszytometrie Antikörper-markierter Zellen	
Durchflusszytometrie Propidiumiodid-markierter Zellen	
Durchflusszytometrie TUNEL-markierter Zellen	
FACS (fluorescence-activated cell sorting)	
3.8. Analyse der Proteinexpression mittels Western blot	
3.9. Quantitative Analyse der RNA-Expression	
3.10. Analyse der Promotormethylierung	
3.11. In vivo-Analysen	
3.12. Statistik	
4. Ergebnisse	
4.1. Zelluläre und molekulare Heterogenität	
4.1.1. Sox2-Expression	
	3

Fazit – Sox2 in Klonen	41
Fazit – Veränderung von Sox2 in Klonen	45
4.1.2. Transkriptionsfaktoren Oct3/4 und Nanog	45
Fazit – oct3/4 und nanog in Klonen	47
4.1.3. Weitere stammzellassoziierte Faktoren	47
Fazit – FABP7, Musashi, PAX6 in Klonen	51
Fazit – Veränderung von FABP7, Musashi und PAX6 in Klonen	53
4.1.4. Potenzielle SLGC-Marker	53
Fazit – CD44 und Integrin $lpha$ 6 in SLGC-Linien, Klonen und weiter differenzierten Kulturen	55
4.1.5. CD133	55
Fazit – CD133 in SLGC-Linien, Klonen und sortierten T1522-Kulturen	58
4.1.6. Differenzierungsassoziierte Faktoren	59
Fazit – GFAP und Tau in Klonen	62
Fazit – Veränderung von GFAP und Tau in Klonen	66
Fazit – CD31 in Klonen	68
4.1.8. EGFR-, PDGFR $lpha$ -, PDGFR eta - und PTEN-Expression	68
Fazit – EGFR, PDGFR $lpha$, PDGFR eta und PTEN in Klonen	73
4.2. Radio- und Chemosensitivität stammzellähnlicher Gliomzellen	75
4.2.1. Phosphorylierung in ATM, Chk1, Chk2 und γH2AX sowie Expression von p53 und p21 ^{Cip1} nach Bestrahlung mit 10, 20 bzw. 25 Gray	/waf1 75
4.2.2. Phosphorylierung in ATM, Chk1, Chk2 und γ H2AX sowie Expression von p53 und p21 ^{Cip1} nach Bestrahlung mit 5 Gy, 100 μ M Temozolomid oder deren kombinierter Behandlung	/WAF1
Phosphorylierung in ATM, Chk1, Chk2 und γ H2AX sowie Expression von p53 und p21 ^{Cip1} nach Bestrahlung mit 5 Gy	/WAF1 82
Vergleich des Proteinphosphorylierungsgrads bzw. der Proteinexpression nach Bestrahlun 5 Gy oder der ED50-Dosis	g mit 88
Phosphorylierung in ATM, Chk1, Chk2 und γ H2AX sowie Expression von p53 und p21 Cip1 nach Behandlung mit 100 μ M Temozolomid	/waf1 90
Phosphorylierung in ATM, Chk1, Chk2 und γ H2AX sowie Expression von p53 und p21 Cip1 nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid	/waf1 97
Vergleich des Proteinphosphorylierungsgrads bzw. der Proteinexpression nach Einfach- Doppelbehandlung	und . 103
Fazit – Einfach- und Doppelbehandlung in SLGC-Linien	. 111
4.2.3. Untersuchung der γH2AX-Induktion auf Einzelzellniveau	. 111
4.2.4. Untersuchung der γ H2AX-Induktion auf Einzelzellniveau in SLGC-Klonen	. 120
Fazit – γH2AX in Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung	. 130
4.2.5. Auswirkung der Radio- und Chemotherapie auf die Zellvitalität und die Apoptose	. 130

Fazit – Vitalität und Apoptose in SLGC-Linien, Klonen und U87MG nach Einfach- und Doppelbehandlung133
4.2.6. Auswirkung der Radio- und Chemotherapie auf den Zellzyklus
Fazit – Proliferation in SLGC-Linien und Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung 135
4.2.7. Auswirkung der Radio- und Chemotherapie auf den Anteil CD133-positiver Zellen 135
Fazit – Anteil CD133-positiver Zellen in SLGC-Linien und Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung
4.2.8. Auswirkung der Radio- und Chemotherapie auf die Sox2-Expression
Fazit – Sox2 in SLGC-Linien und Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung
4.2.9. Auswirkung der Radio- und Chemotherapie auf die Anzahl Nestin-positiver Zellen 145
Fazit – Sox2- und Nestin-positive Zellen in SLGC-Linien und Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung
4.2.10. Charakterisierung überlebender SLGCs nach Behandlung mit Temozolomid oder Bestrahlung
Fazit – Stammzellcharakter überlebender SLGCs151
5. Diskussion
5.1. Zelluläre Hierarchie von SLGC-Mutterkulturen und Klonen
5.2. Deregulierte Signalkaskaden in SLGC-Mutterkulturen und Klonen
5.3. Proliferation und Vitalität von SLGC-Mutterkulturen und Klonen nach Bestrahlung und/oder Temozolomid-Behandlung
5.4. DNA-Schadensantwort in SLGC-Mutterkulturen und Klonen nach Bestrahlung und/oder Temozolomid-Behandlung
5.5. Stammzellgrad in SLGC-Mutterkulturen und Klonen nach Bestrahlung und/oder Temozolomid- Behandlung
5.6. Schlussfolgerungen
Literaturverzeichnis
Abkürzungsverzeichnis
Abbildungsverzeichnis
Tabellenverzeichnis
Anhang
Danksagung
Lebenslauf 210

Zusammenfassung

Das Glioblastom (GBM), ein primärer Gehirntumor, weist trotz chirurgischer Resektion sowie adjuvanter Radio- und Chemotherapie eine sehr schlechte Prognose auf. Für die Therapieresistenz wird eine Subpopulation von stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs) verantwortlich gemacht, wobei die Gründe für die Resistenz bestenfalls in Ansätzen geklärt sind.

In dieser Arbeit wurden phänotypisch verschiedene, primäre SLGC-Linien, die in serumfreiem Medium kultiviert wurden, klonal expandiert sowie bereits vorhandene Klonlinien verwendet und mittels Western blot, quantitativer Real-Time PCR sowie immunzytologischen Färbungen hinsichtlich ihres Stammzellcharakters analysiert. Zudem wurde die Proteinexpression der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen EGFR, PDGFR α und PDGFR β sowie des Tumorsuppressors PTEN bestimmt. Zusätzlich wurden mittels Western blot- und immunzytologischer Analyse Proteine der DNA-Schadenserkennung und Signaltransduktion nach Bestrahlung und/oder Behandlung mit Temozolomid in SLGC-Linien mit unterschiedlichem p53-, PTEN-, MGMT- und Stammzellstatus untersucht.

In allen SLGC-Kulturen waren Zellpopulationen mit einem unterschiedlichen Stammzellcharakter zu finden, die eine hierarchische Organisation aufwiesen. Dabei zeigten die SLGC-Linien, die sich von GBMs verschiedener Patienten ableiten, entweder eine eher flache (T1338, T1440) oder breite Hierarchie (T1452, T1464, T1495). Gleichzeitig war die Expression von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und/oder PTEN in Klonen, die sich von einer SLGC-Mutterkultur ableiten, unabhängig vom Stammzellcharakter zum Teil stark verschieden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass genetisch und epigenetisch verschiedene SLGC-Populationen in ein und demselben Tumor auftraten.

Die Responsivität gegenüber Bestrahlung und/oder Behandlung mit Temozolomid schien vor allem durch den genetischen Hintergrund (p53-, PTEN-, MGMT-Status) beeinflusst zu sein. So variierte die behandlungsinduzierte Phosphorylierung von H2AX und ATM sowohl zwischen den p53-Wildtyp- als auch im Vergleich zu den p53-Mutationslinien. In PTEN-positiven SLGC-Linien war die Effizienz der behandlungsinduzierten Phosphorylierung von Chk1 und Chk2 höher als in PTEN-negativen Linien. Zudem kam es in den MGMT-negativen SLGC-Linien zu einer Temozolomid-induzierten Reduktion des p21^{Cip1/WAF1}-Levels. Da die Klone einer SLGC-Mutterkultur eine unterschiedliche Therapieantwort aufwiesen, scheint die behandlungsspezifische Responsivität durch die Deregulation molekularer Signalwege und die Ausprägung der Stammzelleigenschaften in individuellen SLGCs bedingt zu sein.

<u>Abstract</u>

The glioblastoma (GBM), a primary brain tumor, shows a very poor prognosis despite of surgical resection and adjuvant radio- and chemotherapy. A subpopulation of stem-like glioma cells (SLGCs) may be responsible for the therapeutic resistance. The reasons for the resistance are largely unknown.

In the present work, phenotypically different primary SLGC lines, which were cultured in serum-free medium, were clonally expanded. These and already existing clone lines were analyzed by western blot, quantitative real-time PCR and immunocytological staining in order to investigate their stem cell characteristics. Moreover, expression of the receptor tyrosine kinases EGFR, PDGFR α and PDGFR β as well as the tumorsuppressor PTEN were examined. In addition, proteins involved in DNA damage responses or signal transduction in response to irradiation and/or treatment with Temozolomide were analyzed in SLGC lines with distinct p53-, PTEN- and MGMT-status and distinct stem cell characteristics.

All SLGC cultures encompassed subpopulations of cells with different stem cell characteristics, which established a hierarchical organization. SLGC lines derived from GBMs of different patients showed either a flat (T1338, T1440) or a broad hierarchy (T1452, T1464, T1495). The expression of receptor tyrosine kinases and/or PTEN in the clones derived from the same SLGC mother culture differed to a high extent, which appeared independent from the stem cell characteristic. Consequently, it could be concluded that genetically and epigenetically different SLGC subpopulations are present in the same tumor.

The responsiveness to radiation and/or Temozolomide seemed to be primarily influenced by the genetic background (status of p53, PTEN, MGMT). For example, the treatment-induced phosphorylation of H2AX and ATM varied between SLGC lines with a wildtype p53 and those with a mutated p53, respectively. The efficacy of treatment-induced phosphorylation of Chk1 and Chk2 was higher in PTEN-positive SLGC lines as compared to PTEN-negative lines. Moreover, Temozolomide-induced reduction of p21^{Cip1/WAF1} levels was observed in MGMT-negative SLGC lines. Since the clones derived from one SLGC mother culture showed different treatment responses, the treatment-specific responsiveness seemed to be determined by the deregulation of molecular signaling pathways and the degree of stemness of the individual SLGCs.

1. Einleitung

<u>1.1. Gliome</u>

Gliome sind Tumore des zentralen Nervensystems, die aus Gliazellen und glialen Vorläuferzellen hervorgehen (Schlegel et al., 2009). Zu den Gliomen gehören die Astrozytome, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome und Ependymome. Diese werden von der WHO (*World Health Organisation*) den Graden I bis IV zugeordnet. Das Glioblastom (GBM) gehört zu der Gruppe der Astrozytome und wird nach der WHO-Klassifizierung dem Grad IV zugeordnet (Schlegel et al., 2003). Es ist vor allem durch ein diffus infiltrierendes Wachstum, eine hohe Vaskularisierung sowie nekrotische Areale gekennzeichnet (Louis et al., 2007). In 90% der Fälle tritt das GBM *de novo* auf und wird somit als primäres GBM bezeichnet. 10% der GBMs treten sekundär auf, also als Rezidive niedergradiger Astrozytome (Schlegel et al., 2003; Van Meir et al., 2010).

Das GBM ist der zweithäufigste, primäre Tumor des zentralen Nervensystems und weist eine sehr schlechte Prognose auf (Ostrom et al., 2014; Stupp et al., 2005). Die Standardtherapie des GBMs besteht aus einer möglichst kompletten Resektion der Tumormasse, gefolgt von einer adjuvanten Radio- und Chemotherapie mit Temozolomid. Die Behandlung mit Temozolomid wird nach Ende der Bestrahlung fortgesetzt (Nakada et al., 2012). Dennoch beträgt die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung 14,6 Monate (Stupp et al., 2005). Das Gliosarkom (GSarc) wird von der WHO den GBMs zugeordnet, tritt jedoch sehr viel seltener auf. Etwa 2% der GBMs werden als GSarc klassifiziert. Das GSarc besteht aus einem gliomatösen und einem sarkomatösen Anteil (Kozak et al., 2009). Die GSarcs können *de novo* entstehen (primäres GSarc) oder als Rezidiv eines GBMs (sekundäres GSarc) auftreten (Cachia et al., 2015). Für die Behandlung des GSarcs gelten die gleichen Richtlinien wie für das GBM (Adeberg et al., 2016). Dennoch ist die Prognose für Patienten mit einem GSarc verglichen zu Patienten mit einem GBM noch schlechter. Hierbei liegt die mediane Überlebenszeit trotz Therapie bei 10 Monaten (Kozak et al., 2009; Romero-Rojas et al., 2013). Sowohl beim GBM als auch beim GSarc kommt es ausnahmslos zur Rezidivbildung. 80% bis 90% der Rezidive treten innerhalb eines 2 – 3 cm Radius um die originale Resektionshöhle auf (Schonberg et al., 2014).

1.2. GBM-Subtypen

Auf Grundlage von Genexpressionsanalysen wurden die GBMs in drei bzw. vier verschiedene Subtypen unterteilt: proliferativ/klassisch, mesenchymal, proneural und neural (Phillips et al., 2006; Van Meir et al., 2010). Der klassische GBM-Subtyp, den Van Meir et al. (2010) definierten, weist eine ähnliche Genexpression wie der von Phillips et al. (2006) beschriebene, proliferative GBM-Subtyp auf. Dieser Subtyp exprimiert überwiegend neurale Stammzellmarker und ist durch eine hohe CD133-Expression, eine Amplifikation oder Überexpression des EGFR- (*epidermal growth factor receptor-*) Gens und in fast allen Fällen durch einen Verlust des PTEN- (*phosphatase and tensin homolog-*) Gens gekennzeichnet (Phillips et al., 2006; Van Meir et al., 2010). Im klassischen Subtyp tritt eine Mutation des p53- (Tumorsuppressor p53-) Gens selten auf (Van Meir et al., 2010). Im mesenchymalen Subtyp sind neurale Stammzellmarker und mesenchymale Marker sowie CD44 (Hyaluronsäurerezeptor) überexprimiert (Phillips et al., 2006; Van Meir et al., 2010). Häufig weist der mesenchymale Subtyp eine Amplifikation des EGFR-Gens auf (Phillips et al., 2006). In etwa einem Drittel der mesenchymalen GBMs ist eine Inaktivierung des p53-Gens sowie ein Verlust des PTEN-Gens zu verzeichnen (Van Meir et al., 2010). Der proneurale Subtyp ist vor allem durch eine Überexpression von Marker der

neuronalen Linie und Faktoren des Notch-Signalwegs gekennzeichnet, die für die Neurogenese bedeutend sind (Phillips et al., 2006; Van Meir et al., 2010). Zudem ist eine Überexpression bzw. eine Amplifikation des PDGFRA- (*platelet-derived growth factor receptor* α -) Gens zu beobachten. In mehr als der Hälfte der proneuralen GBMs ist eine Mutation des p53-Gens, eine Amplifikation des EGFR-Gens und ein Verlust des PTEN-Gens zu detektieren (Van Meir et al., 2010). Der vierte Subtyp ist der neurale Subtyp, in dem vor allem Gene exprimiert sind, die im normalen Gehirngewebe zu finden sind. Zudem zeigt der neurale Subtyp eine Überexpression bzw. Amplifikation des EGFR-Gens (Van Meir et al., 2010). Unabhängig vom Subtyp weisen alle GBMs entweder eine Inaktivierung der Tumorsuppressoren p53 oder Retinoblastom-Protein (Rb) oder eine Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Signalwege auf (Van Meir et al., 2010). Im GSarc ist in der Regel keine Amplifikation des EGFR-Gens zu beobachten, jedoch häufig eine Mutation des p53-Gens (Cachia et al., 2015; Oh et al., 2016). Bisher hat die Klassifizierung der GBMs in die verschiedenen Subtypen keine Auswirkungen auf die Therapie.

Die unterschiedlichen Expressionsmuster der GBM-Subtypen könnten auf die Ausgangszelle der neoplastischen Transformation hinweisen. Es besteht die Möglichkeit, dass neurale Stammzellen sowie Progenitorzellen neoplastisch transformiert werden oder differenzierte Astrozyten oder Oligodendrozyten als Resultat verschiedener Mutationen dedifferenzieren und somit die Grundlage für die Tumorgenese bilden (Van Meir et al., 2010).

1.3. Deregulierte Signalwege

Deregulierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Verlust von PTEN

Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind an der Signaltransduktion von Wachstumsfaktorsignalen beteiligt, die unter anderem die Proliferation der Zellen regulieren (Casaletto und McClatchey, 2012). In 88% der GBMs treten Mutationen im Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Signalweg auf (Abb. 1 A). Hierbei sind die häufigsten Veränderungen die Überexpression bzw. Amplifikation des EGFR-Gens sowie der Verlust des PTEN-Gens (Van Meir et al., 2010). Die Hälfte der GBMs mit einer Überexpression an EGFR weist eine EGFR-Variante (EGFR_{VIII}) auf, die konstitutiv aktiv ist, das heißt es kommt bereits in Abwesenheit des Liganden zu einer Aktivierung der Signalkaskade (Van Meir et al., 2010). PTEN ist in der Lage die aktivierte Signaltransduktion zu inhibieren, indem es PIP₃ (Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat) dephosphoryliert, welches somit für die Signaltransduktion nicht weiter zur Verfügung steht (Stiles et al., 2004). Bereits eine Haploinsuffizienz von PTEN ist ausreichend um den Phänotyp zu verändern und kann zur Tumorgenese beitragen (Chu und Tarnawski, 2004; Leslie und Downes, 2004). In 81% der Fälle inhibiert die Mutation die Phosphataseaktivität von PTEN und in weiteren 10% wird die Stabilität oder die Zielerkennung beeinflusst, wodurch es zu einem partiellen Funktionsverlust kommen kann (Leslie und Downes, 2004).



Abb. 1: Häufigkeit der genetischen Veränderungen in drei Signalwegen im Glioblastom. Schematische Darstellung des Rezeptor-Tyrosin-Kinase- (A), p53- (B) und Rb- (C) Signalwegs im Glioblastom mit der prozentualen Verteilung der Mutationen an unterschiedlichen Stellen der Signalkaskade. – RTK, Rezeptor-Tyrosin-Kinase; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; PI3K, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-Kinase; PDGFRA, *platelet-derived growth factor receptor* α; MET, mesenchymaler-epithelialer Transitionsfaktor; NF-1, Neurofibromin 1; PTEN, *phosphatase and tensin homolog*; FOXO, *forkhead box protein*; CDKN2A/B/C, *cyclin-dependent kinase inhibitor* 2A/B/C; MDM2/4, *mouse double minute* 2/4 *homolog*; TP53, Tumorsuppressorprotein p53; CDK4/6, *cyclindependent kinase* 4/6; CCND2, G1/S-spezifisches Cyclin-D2; G1, *gap* 1-Phase des Zellzyklus; S, Synthesephase des Zellzyklus; Rb, Tumorsuppressor Retinoblastom-Protein. Quelle: Van Meir et al. (2010)

Mutation des Tumorsuppressors p53

Der Tumorsuppressor p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation zahlreicher, zellulärer Funktionen beteiligt ist. Unter anderem reguliert p53 den Zellzyklus, die Seneszenz, die Apoptose und die DNA-Reparatur (Nicolai et al., 2015; Song et al., 2007). In der Regel wird ständig p53-Protein produziert, welches jedoch von MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*) poly-ubiquitinyliert wird. Die Poly-Ubiquitinylierung führt zur proteasomalen Degradierung des p53-Proteins, sodass das zelluläre p53-Level gering bleibt (Abraham, 2001). Der p53-Signalweg ist in GBMs am zweithäufigsten verändert (Abb. 1 B). Hierbei treten die meisten Mutationen im CDKN2A-Gen und im p53-Gen auf (Van Meir et al., 2010). Bei den Veränderungen im p53-Gen handelt es sich in den meisten Fällen um *missense*-Mutationen (Muller und Vousden, 2014). Diese führen in der Mehrheit zu einer stabilen Proteinexpression und nur in einigen Fällen zu einem Verlust der p53-Proteinexpression (Muller und Vousden, 2013, 2014). Das mutierte p53-Protein kann eine *loss-of-function* (LOF) oder *gain-of-function* (GOF) aufweisen. Die LOF-Mutationen führen dazu, dass Standard-p53-*response elements* nicht

erkannt werden und p53 somit seine Funktion als Tumorsuppressor nicht mehr ausführen kann (Muller und Vousden, 2013; van Oijen und Slootweg, 2000). GOF-Mutationen im p53 können dazu führen, dass neue DNA-Bindungsstellen erkannt werden oder neue Interaktionen zwischen p53 und anderen Proteinen auftreten, die in der Regel nicht vorkommen. Die GOF-Mutationen können zu einem erhöhten, invasiven Wachstum, einer erhöhten Chemoresistenz und einer genomischen Instabilität beitragen. Der regulatorische *feedback loop* zwischen MDM2 und p53 ist in Tumorzellen häufig gestört, sodass p53 in den Zellen akkumuliert (Muller und Vousden, 2013).

Deregulierung im Signalweg des Tumorsuppressors Retinoblastom-Protein

Das Retinoblastom-Protein (Rb) ist ein Tumorsuppressor, der an der Regulation des G1-Kontrollpunkts beteiligt ist (Sage, 2012). In Abbildung 1 C ist zu erkennen, dass es in 77% der GBMs zu einer Mutation im Rb-Signalweg kommt. Allerdings tritt die Mutation hierbei eher selten im Rb-Gen auf. Viel häufiger sind die CDKN2A- und CDKN2B-Genloci von einer Mutation betroffen (Van Meir et al., 2010). Kommt es durch die Mutation in Gen zu einem Verlust des Proteins oder der Proteinfunktion, können diese Regulatoren die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 sowie das G1/S-spezifische Cyclin-D2 nicht inhibieren (Van Meir et al., 2010). Dies wiederum kann zu einem ungehinderten Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus führen.

1.4. Therapie und Therapieresistenzen

Wie bereits erwähnt, besteht die Standardtherapie des GBMs und des GSarcs aus der chirurgischen Resektion des Tumors mit anschließender Radio- und Chemotherapie (Nakada et al., 2012). Für die Bestrahlung werden in der Regel hochenergetische Photonen verwendet, welche direkt und indirekt Schäden hervorrufen können (Hall et al., 2016). Die Strahlung kann beispielsweise die DNA direkt schädigen. Hierbei werden durch die hohe Energie Basen geschädigt, Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie DNA-DNA- oder DNA-Protein-*crosslinks* induziert (Hall et al., 2016). Pro Gray (Gy) werden etwa 1000 Einzelstrangbrüche, 40 Doppelstrangbrüche sowie 3000 Basenschäden hervorgerufen (Hall et al., 2016). Zu den indirekten Schäden zählt die Bildung freier Radikale, welche wiederum weitere Radikale induzieren und mit allen Makromolekülen der Zelle reagieren können (Kiefer, 2013). Etwa zwei Drittel der strahleninduzierten Schäden entstehen indirekt (Hall et al., 2016). Von den strahleninduzierten Schäden sind vor allem die Doppelstrangbrüche lethal (Bohgaki et al., 2010). Obwohl zwei Reparaturwege existieren, werden viele DNA-Doppelstrangbrüche nicht oder falsch repariert, was in der Regel zum Zelltod führt (Hall et al., 2016).

Bevor es zur Reparatur der strahleninduzierten Doppelstrangbrüche kommt, wird als erste Reaktion der Zellen auf Bestrahlung der Zellzyklusarrest über die Aktivierung der Zellzyklus-Checkpunkte eingeleitet (Wang et al., 2005). Initial kommt es unter anderem zur Aktivierung der Serin-Threonin-Kinasen ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) (Li et al., 2012). Die Aktivierung dieser Kinasen führt zur Phosphorylierung von *downstream* Faktoren. Beispielsweise wird innerhalb weniger Minuten das Histon H2AX am Serylrest 139 (γH2AX) phosphoryliert und dient als *scaffold* für weitere Faktoren der DNA-Schadensantwort (Ivashkevich et al., 2012; Li et al., 2012). Die weiteren *downstream* Faktoren sind für die Kinasen ATM und ATR zum Teil verschieden (Abb. 2).



Abb. 2: Strahleninduzierter Zellzyklusarrest. Schematische Darstellung der strahleninduzierten Signaltransduktion, die als erste Antwort auf die Bestrahlung zu einem Zellzyklusarrest führt. OH-, Hydroxylradikal; DSB, Doppelstrangbruch; ssDNA, einzelsträngige DNA; P, Phosphorylierung; ATM, *Ataxia telangiectasia mutated*; ATR, *Ataxia telangiectasia and Rad3 related*; p53, Tumorsuppressorprotein p53; CHK2, *checkpoint kinase* 2; CHK1, *checkpoint kinase* 1; p21, Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1/WAF1}; CDC25A/B/C, *cell* division *cycle* 25 A/B/C; CDK1/2/4/6, *cyclin-dependent kinase* 1/2/4/6; G1/G2 arrest, Zellzyklusarrest in *gap* 1-/*gap* 2-Phase. Quelle: Maier et al. (2016)

Auch wenn sowohl ATM als auch ATR durch strahleninduzierte Doppelstrangbrüche aktiviert werden können, kommt es hauptsächlich zur Aktivierung der ATM. Die Kinase ATM liegt in Zellen als inaktives Homodimer vor und wird durch strahleninduzierte Doppelstrangbrüche aktiviert (Kastan und Bartek, 2004). Die Doppelstrangbrüche werden von dem MRN- (Mre11, Rad50, NBS1) Komplex detektiert (Annovazzi et al., 2015). Daraufhin bindet der MRN-Komplex an der geschädigten Stelle und rekrutiert das ATM-Homodimer zum Doppelstrangbruch (Annovazzi et al., 2015; Bohgaki et al., 2010). Anschließend kommt es zur Aktivierung von ATM (Annovazzi et al., 2015). Bei der Aktivierung von ATM kommt es zu einer Konformationsänderung im Homodimer sowie zur Autophosphorylierung am Serylrest 1981 (Bohgaki et al., 2010; Kastan und Bartek, 2004). Diese Phosphorylierung führt zur Dissoziation des ATM-Homodimers (Kastan und Bartek, 2004).

Die folgenden Schritte der Signaltransduktion sind in Abbildung 2 schematisch zusammengefasst. Die aktivierte ATM ist in der Lage p53 direkt am Serylrest 15 zu phosphorylieren (Kastan und Bartek, 2004). Diese Phosphorylierung reicht allerdings nicht aus um die p53-MDM2-Interaktion zu unterbrechen (Abraham, 2001). Neben p53 wird vor allem die *checkpoint kinase* 2 (Chk2) durch die aktivierte ATM phosphoryliert (Kastan und Bartek, 2004). Hierbei wird die Chk2 am Threonylrest 68 sowie an weiteren Aminosäureresten (z.B. am Serylrest 19) phosphoryliert und dadurch aktiviert (Abraham, 2001; Ropolo et al., 2009). Die aktivierte Chk2 wiederum ist in der Lage p53 am Serylrest 20 zu phosphorylieren. Diese Phosphorylierung im p53 stört die p53-MDM2-Bindung, sodass das p53 nicht ubiquitinyliert und anschließend degradiert wird, sondern akkumulieren kann (Abraham, 2001). Die Anreicherung von p53

in der Zelle führt dazu, dass p53-Zielgene transkribiert werden. Dabei bindet p53 mit unterschiedlicher Affinität die response elements der Zielgene. Gene, die im Zellzyklusarrest involviert sind (z.B. p21^{Cip1/WAF1} (Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs)), werden von p53 mit einer hohen Affinität gebunden, wohingegen Gene, die für die Apoptose bedeutend sind (z.B. BAX), mit einer geringen Affinität gebunden werden (Joerger und Fersht, 2007; Jordan et al., 2010). Nach der Aktivierung der DNA-Schadensantwort wird vor allem die p21^{Cip1/WAF1}-Genexpression, durch p53 transkriptionell aktiviert (Abraham, 2001; Kastan und Bartek, 2004). Die erhöhte Expression von p21^{Cip1/WAF1} führt durch die Inhibition von Cyclin E/CDK2 zu einem G1-Arrest (Kastan und Bartek, 2004). Darüber hinaus gibt es einen p53-unabhängigen G1-Arrest (Kastan und Bartek, 2004). Hierbei wird die Phosphatase Cdc25A durch die aktivierte Chk2 phosphoryliert (Kastan und Bartek, 2004). Diese Phosphorylierung gibt das Signal zur Ubiquitinylierung, was zu einem Ubiquitin-abhängigen, proteasomalen Abbau von Cdc25A führt (Kastan und Bartek, 2004). Da die Menge an Cdc25A sinkt, kann der Cyclin E/CDK2-Komplex nicht dephosphoryliert werden und es kommt zu einem G1-Arrest (Kastan und Bartek, 2004). Dieser G1-Arrest wird schneller induziert als der p53-abhängige, jedoch ist p53 notwendig um den G1-Arrest für eine längere Zeit aufrecht zu erhalten (Kastan und Bartek, 2004). Befinden sich die Zellen während des DNA-Schadens in der S- oder G2-Phase, kommt es zur Aktivierung des G2-Checkpunkts (Kastan und Bartek, 2004). Die Aktivierung von ATM führt downstream zur Phosphorylierung von Cdc25C, entweder direkt durch die aktivierte ATM oder durch die aktivierte Chk2 (Kastan und Bartek, 2004). Die phosphorylierte Phosphatase Cdc25C wird entweder degradiert oder sequestriert (Kastan und Bartek, 2004). Somit steht Cdc25C für die Dephosphorylierung des Cyclin B/CDK1-Komplexes nicht zur Verfügung und es kommt zu einem G2-Arrest (Kastan und Bartek, 2004). Der G2-Arrest ist stets p53-unabhängig (Kastan und Bartek, 2004).

Im Vergleich zur Kinase ATM, welche vor allem durch strahleninduzierte Doppelstrangbrüche aktiviert wird, reagiert die Kinase ATR auf jede Art von genotoxischen Veränderungen (z.B. Schäden an der DNA, die durch Chemotherapeutika oder UV-Licht induziert werden) oder auf einen Replikationsstopp (Abraham, 2001; Kastan und Bartek, 2004). Anders als die ATM benötigt die ATR keine Phosphorylierung um aktiviert zu werden (Kastan und Bartek, 2004). Nach der Detektion eines DNA-Schadens wird die Lokalisation der ATR im Zellkern verändert (Abraham, 2001). Hierbei kommt es zu einer lokalen Anreicherung von ATR an der Stelle des DNA-Schadens (Abraham, 2001; Kastan und Bartek, 2004). Anschließend phosphoryliert die ATR das p53 am Serylrest 15 (Abraham, 2001). Neben p53 wird die *checkpoint kinase* 1 (Chk1) am Serylrest 345 sowie an weiteren Aminosäuren (z.B. am Serylrest 317) phosphoryliert (Leung-Pineda et al., 2006; Ropolo et al., 2009). Die aktivierte Chk1 ist ebenso wie die aktivierte Chk2 in der Lage sowohl p53 am Serylrest 20 als auch die Phosphatasen Cdc25A und Cdc25C zu phosphorylieren (Abraham, 2001; Kastan und Bartek, 2004). Diese Phosphorylierungen führen, wie bereits oben beschrieben, zu einem G1- bzw. G2-Arrest. Neben dieser "klassischen" Signaltransduktion ist zusätzlich ein Crosstalk zwischen ATM und Chk1 bekannt (Kastan und Bartek, 2004).

Nachdem der Zellzyklusarrest eingeleitet wurde, beginnt die DNA-Reparatur. In Säugetierzellen gibt es zwei Wege Doppelstrangbrüche zu reparieren, die homologe Rekombination (HR) und das *non-homologous end joining* (NHEJ) (Bohgaki et al., 2010). Welcher Weg eingeschlagen wird, ist abhängig von der Zellzyklusphase (Lim et al., 2012). Das NHEJ findet vor allem in der GO/G1-Phase statt, die HR ausschließlich in der späten S- sowie G2-Phase (Lim et al., 2012). Beim NHEJ werden die freien DNA-Enden durch Ku-Proteine erkannt (Abb. 3, rechts). Daraufhin wird die Serin-Threonin-Kinase DNA-PKcs (DNA-abhängige Proteinkinase *catalytic subunit*) zum Doppelstrangbruch rekrutiert und aktiviert

(Kinner et al., 2008). Die aktivierte DNA-PKcs phosphoryliert die Nuklease Artemis (Nicolai et al., 2015). Die freien DNA-Enden werden von Artemis prozessiert und anschließend durch den DNA-Ligase IV/XRCC4/XLF-Komplex ligiert (Nicolai et al., 2015). Da beim NHEJ Teile der freien DNA-Enden prozessiert werden und keine homologe Sequenz zur Reparatur verwendet wird, können hierbei spontane Mutationen auftreten (Lim et al., 2012).

Da bei der HR die homologen Schwesterchromatiden als Schablone zur Reparatur benutzt werden, ist die HR im Vergleich zum NHEJ eine fehlerfreie Methode (Lim et al., 2012). Wie bereits oben beschrieben bindet der MRN-Komplex am Doppelstrangbruch (Abb. 3, links). Das Protein Mre11 im MRN-Komplex besitzt eine Nukleaseaktivität und ist dadurch in der Lage die DNA zu prozessieren und einzelsträngige DNA mit 3'-Überhängen zu generieren (Kinner et al., 2008). An den einzelsträngigen DNA-Überhängen bindet das Replikationsprotein A (RPA), welches dann durch Rad51 ersetzt wird (Kinner et al., 2008). Anschließend werden weitere Faktoren, wie BRCA1, BRCA2 und Rad52, gebunden und formen zusammen mit der DNA das Nukleoproteinfilament (Nicolai et al., 2015). Anschließend sucht das Nukleoproteinfilament in dem DNA-Strang des Schwesterchromatids nach der homologen Sequenz und hybridisiert mit dem komplementären DNA-Strang (Kinner et al., 2008). Es entsteht eine sogenannte *"holliday junction"* (Kinner et al., 2008). Sobald die homologe Sequenz gefunden ist, wird das freie 3'-Ende durch eine DNA-Polymerase verlängert (Kinner et al., 2008). Abschließend kommt es zur Auflösung der *"holliday junction"* (Kinner et al., 2008). Trotz der DNA-Reparaturmechanismen kann es dazu kommen, dass die DNA-Schäden zu umfangreich sind und/oder nicht repariert werden können. In diesem Fall kann es zur Apoptose kommen (Annovazzi et al., 2015).



Abb. 3: Doppelstrangbruch-Reparatur in Säugetierzellen. Schematische Darstellung der homologen Rekombination (HR; **links**) und des *non-homologous end joining* (NHEJ; **rechts**) nach Doppelstrangbrüchen in Säugetierzellen. DSB, Doppelstrangbruch; ssDNA, einzelsträngige DNA; MRN complex, Mre11-Rad50-NBS1-Komplex; RPA, Replikationsprotein A; BRCA1/2, *breast cancer* 1/2; DNA-PK, DNA-abhängige Proteinkinase; Lig IV-XRCC4/XLF, Ligase IV/XRCC4/XLF-Komplex. Quelle: Abbildung nach Nicolai et al. (2015)

In der Standardtherapie des GBMs und GSarcs wird die Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) durchgeführt (Nakada et al., 2012). TMZ ist ein alkylierendes Chemotherapeutikum, welches oral eingenommen wird und ein vergleichsweise günstiges Toxizitätsprofil aufweist (Van Meir et al., 2010). Unter physiologischen Bedingungen wird das TMZ schnell und nicht-enzymatisch zu dem reaktiven MTIC (3-methyl-(triazen-1-yl) Imidazol-4-carboxamid) konvertiert (Beier et al., 2011). MTIC reagiert weiter zu 5-Aminoimidazol-4-carboxamid (AIC) und einem hoch reaktiven Methyldiazoniumion, welches eine Methylgruppe auf verschiedene Stellen der DNA überträgt (Zhang et al., 2012). Das Haupttarget ist die N7-Position des Guanins (>70%) (Nakada et al., 2012). Darüber hinaus treten Methylierungen an der N3-Position des Adenins (9%) und an der O6-Position des Guanins (5%) auf (Nakada et al., 2012). Die Methylierung des N7-Methylguanins und des N3-Methyladenins wird durch die Basenexzisionsreparatur entfernt (Nakada et al., 2012). Das O6-Methylguanin ist das eigentliche, zytotoxische Produkt. Bei der DNA-Replikation paart das O6-Methylguanin mit Thymin, was durch die DNA-Mismatch-Reparatur erkannt wird (Kohsaka und Tanak, 2013). Daraufhin kommt es zur Exzision des Thymins und dem erneuten Einbau eines Thymins durch die DNA-Polymerase. Dieses führt wiederum zu einer DNA-Mismatch-Reparatur, die wiederum erfolglos bleibt. Schließlich kommt es zu einem DNA-Doppelstrangbruch, der zytotoxisch ist und zur Apoptose führen kann (Kohsaka und Tanak, 2013).

Allerdings werden die meisten O6-Methylierungen des Guanins durch MGMT (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) repariert (Nakada et al., 2012). Hierbei entfernt die Transferase die Methylgruppe vom Guanin und überträgt sie auf einen Cysteinylrest im eigenen, aktiven Zentrum (Mullapudi et al., 2000). Dadurch wird die Transferase inaktiv und Ubiquitin-abhängig proteasomal abgebaut (Mullapudi et al., 2000). Aus diesem Grund ist anhand der Expression von MGMT eine Vorhersage für das Ansprechen auf TMZ möglich (Nakada et al., 2012). Mehr als 50% der GBMs zeigen in der Tat eine MGMT-Expression, was die Wirkung des TMZs beschränkt (Van Meir et al., 2010). In den anderen Fällen kommt es zu einer Methylierung des MGMT-Promotors, was zu einer verminderten MGMT-Expression und somit zu einer verbesserten Therapieantwort sowie einer besseren Prognose führt (Hegi et al., 2005). Neuere Analysen zeigen allerdings, dass die MGMT-Promotormethylierung nur im Fall des klassischen GBM-Subtyps zur Vorhersage dient und nicht mit der Prognose anderer GBM-Subtypen korreliert (Brennan et al., 2013). Auch im GSarc ist das Patientenüberleben unabhängig von der MGMT-Promotormethylierung (Adeberg et al., 2016). Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass es Tumore und daraus abgeleitete Zelllinien gibt, die einen methylierten oder einen unmethylierten MGMT-Promotor aufweisen und solche mit einem intermediären Methylierungsgrad. Darüber hinaus korrelierte die Expression von MGMT nicht in jedem Fall mit der Sensitivität gegenüber TMZ (C. Zechel, persönliche Mitteilung). Somit muss es noch weitere Mechanismen geben, die zu einer Therapieresistenz beitragen. Beispielsweise lassen sich ABC-(ATP-binding cassette) Transporter nachweisen, die das Chemotherapeutikum aus den Zellen transportieren können. Zu den beschriebenen Transportern gehören ABCG2 und MDR1 (ABCB1) (Bleau et al., 2009; Schaich et al., 2008). Zudem ist die biologische Verfügbarkeit des TMZs am Tumor möglicherweise zu gering um effizient zytotoxisch zu wirken. In der zerebrospinalen Flüssigkeit konnte eine TMZ-Konzentration von 5 μM festgestellt werden (Ostermann, 2004). Allerdings sind etwa 50 μM notwendig um Tumorzellen ohne MGMT-Expression zu eliminieren, eine Konzentration die ausschließlich im Plasma erreicht wird und nur im Fall einer zerstörten Blut-Hirn-Schranke in dieser Konzentration bis zum Tumor vordringen könnte (Beier et al., 2008).

Aufgrund fehlender Therapieerfolge mit den bisherigen Behandlungsmodalitäten, wird zunehmend nach neuen Therapieoptionen geforscht. In der Regel zielen die neuen Therapieansätze auf bestimmte Zielproteine ab, wie beispielsweise die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen EGFR und PDGFR α (Van Meir et al., 2010). Klinische Studien bezüglich der Verabreichung eines EGFR-Inhibitors blieben ohne signifikanten Erfolg (Van Meir et al., 2010). Ähnliches gilt für die Verwendung von Inhibitoren gegen den PDGFR α (Van Meir et al., 2010). Auch Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs zeigten klinisch keine signifikanten Effekte (Van Meir et al., 2010). Es kann vielfältige Erklärungen für das Fehlschlagen dieser Inhibitoren in klinischen Studien geben. Zum einen wurde keine Vorselektion der Patienten vorgenommen, die von der Therapie aufgrund bestimmter, deregulierter Signalwege profitieren könnten (Ohka et al., 2012). Zum anderen ist bei vielen GBM-Patienten die Blut-Hirn-Schranke größtenteils intakt, sodass große Moleküle (>500 Da) nicht zum Tumor gelangen können (Ohka et al., 2012). Weiterhin sind häufig multiple Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Signalwege koaktiviert, was zum Versagen der Monotherapien führt (Ohka et al., 2012). Darüber hinaus gab es Ansätze, die die Vaskularisation des GBMs hemmen sollten. Die Gabe von Bevacizumab (Antikörper gegen VEGF (vascular endothelial growth factor)) führte zwar zu einer längeren, progressionsfreien Zeit, jedoch wurde die Überlebenszeit der Patienten nicht verlängert (de Groot et al., 2010). Zusätzlich zeigte sich, dass die Zellen häufig infiltrierender wuchsen (de Groot et al., 2010). Neben der zunehmenden Infiltration könnte "vascular mimicry" ein Grund für das Therapieversagen sein. Hierbei bilden die Tumorzellen VEGF-unabhängig eigene, funktionelle Kanäle, die der Vaskularisation dienen und Blutperfusion erlauben (Francescone et al., 2012). Aufgrund des hohen Selektionsdrucks kommt es ununterbrochen zu einer Anpassung der Tumorzellen. Neben den genannten Strategien der Tumore die Therapien zu umgehen werden in den letzten Jahren zunehmend Tumorstammzellen (im Gliom unter anderem als stammzellähnliche Gliomzellen bezeichnet) für die Rezidivbildung und die hohe Therapieresistenz verantwortlich gemacht.

1.5. Stammzellähnliche Gliomzellen

Das Tumorstammzellkonzept besagt, dass es im Tumor eine zelluläre Hierarchie gibt, in der die Tumorstammzelle die Spitze bildet und weiter differenzierte Zellen die Basis. Dennoch sind alle Tumorzellen genetisch identisch und unterscheiden sich ausschließlich transkriptionell und/oder epigenetisch, was zu einer Heterogenität innerhalb des Tumors führt (Beck und Blanpain, 2013). Es werden hierbei Parallelen zu den "normalen", adulten Stammzellen gezogen. Somit wäre der Tumor ein aberrantes Organ, welches aus heterogenen Zellen unterschiedlichen Phänotyps und Proliferationspotentials zusammengesetzt ist (Reya et al., 2001). Tumorstammzellen sind in der Lage im Xenotransplantationsmodel Tumore zu erzeugen, die dem Ursprungstumor gleichen (Shackleton et al., 2009). Außerdem wurden Tumorstammzellen anhand ihrer Eigenschaften sich selbst zu erneuern und differenzierte, nicht-tumorigene Tumorzellen hervorzubringen, welche die Heterogenität im Ursprungstumor widerspiegeln, definiert (Prestegarden und Enger, 2010). Im Gegensatz dazu steht das klonale Evolutionsmodel, in welchem die Heterogenität der Tumore durch interklonale, genetische und epigenetische Variationen bedingt ist und die meisten Zellen das Potenzial aufweisen das Tumorwachstum zu unterstützen (Adams und Strasser, 2008).

Die erste Beschreibung von Tumorstammzellen erfolgte im hämatopoetischen System (Bonnet und Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Anschließende Analysen an soliden Tumoren ergaben ebenfalls Hinweise auf Tumorstammzellen im Mammakarzinom (Al-Hajj et al., 2003), Kolonkarzinom (O'Brien et al., 2007), Pankreaskarzinom (Li et al., 2007) sowie Lungenkarzinom (Eramo et al., 2008). Für

Gehirntumore wurden analoge Untersuchungen durchgeführt und auch hier konnten Tumorstammzellen nachgewiesen werden (Galli et al., 2004; Singh et al., 2003). Singh et al. (2003) waren die ersten, die mithilfe des Markers CD133 (Prominin 1) Tumorstammzellen aus Gehirntumoren isolierten. Die isolierten Zellen wuchsen als Neurosphären, exprimierten neurale Marker (z.B. Nestin), zeigten das Potenzial zur Selbsterneuerung und hatten die Kapazität in vitro in Zellen zu differenzieren, die den Zellen des Tumors glichen (Singh et al., 2003). Es zeigte sich, dass bereits 100 CD133-positive Zellen in der Lage waren im Xenotransplantationsmodel in NOD-SCID- (non-obese diabetic, severe combined immunodeficient-) Mäusen Tumore zu bilden, wohingegen 10⁶ CD133-negative Zellen keinen Tumor erzeugten (Singh et al., 2004). Spätere Analysen zeigten jedoch, dass auch CD133negative Zellen in der Lage sind Tumor zu erzeugen (Beier et al., 2007; Chen et al., 2010; Clément et al., 2009; Wang et al., 2008). Besonders die Analysen von Chen et al. (2010) brachten neue Erkenntnisse hinsichtlich der Tumorigenität und den Eigenschaften von Gliomstammzellen. Die Untersuchungen führten zu einem Modell der linearen Hierarchie. Chen et al. (2010) identifizierten drei verschiedene Zelltypen, die stammzellähnliche Eigenschaften aufweisen, auseinander hervorgehen und jeweils eine zelluläre Hierarchie aufbauen (Abb. 4). Hierbei sind die Zellen des Typ I die eigentlichen Tumorstammzellen und stehen an der Spitze der Hierarchie. Sie sind CD133-negativ und in der Lage sich selbst zu erneuern sowie CD133-positive weiter differenzierte Zellen hervorzubringen. Zudem weisen die Typ I – Zellen stammzellassoziierte Marker wie Sox2, Nestin und FABP7 (fatty acid binding protein 7) auf und sind hoch tumorigen. Die Typ II – Zellen sind im Vergleich zu den Typ I – Zellen weiter differenziert. Zudem sind die Typ II – Zellen CD133-positiv, können sich selbst erneuern und CD133-negative Zellen sowie weiter differenzierte Zellen hervorbringen. Die Typ II – Zellen sind ebenfalls stark tumorigen und exprimieren ebenfalls viel FABP7, jedoch im Durchschnitt weniger Nestin und Sox2. Die Typ III – Zellen sind CD133-negativ, können sich selbst erneuern sowie weiter differenzierte Zellen hervorbringen. Im Vergleich zu den Typ II – Zellen sind die Typ III – Zellen weiter differenziert. Die Typ III - Zellen exprimieren unter anderem Marker intermediärer, neuraler Progenitoren, z.B. DLX2 (distal-less homeobox protein 2) und TBR2 (T-box brain protein 2), sowie weniger FABP7 und Nestin als die Typ II-Zellen. Auch die Typ III – Zellen waren in der Lage Tumore zu erzeugen, allerdings erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt und in geringerem Maße.

Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die aus Gliomen abgeleiteten Zelllinien Anteile von Zellen verschiedener Differenzierungsstadien enthalten. Hierbei ist sowohl die Ausprägung der hierarchischen Organisation als auch die Verteilung der Zellen zwischen den Primärzelllinien verschieden. Da es bei den *in vitro*-Analysen nicht möglich ist die verschiedenen Zelltypen zu trennen, wird der Begriff stammzellähnliche Gliomzellen (*stem-like glioma cells*, SLGCs) verwendet.



Abb. 4: Lineare Hierarchie stammzellähnlicher Gliomzellen. Dargestellt sind die Zelltypen innerhalb eines Primärtumors, dessen Markerexpression, Selbsterneuerung, Tumorigenität im Mausmodel sowie dessen Wachstumsverhalten. – CD133, Prominin-1; FABP7, *fatty acid binding protein* 7; DLX2, *distal-less homeobox protein* 2; TBR2, *T-box brain* protein 2. Quelle: Chen et al. (2010)

1.6. Marker für stammzellähnliche Gliomzellen

Bisher ist kein universeller Marker für Gliomstammzellen bekannt. Allerdings gibt es zahlreiche Kandidaten. Um Gliomstammzellen zu identifizieren, lief der Nachweis zu Beginn vor allem über die funktionellen Eigenschaften dieser Zellen. Neben dem Potenzial zur Selbsterneuerung und dem Potenzial in verschiedene Zellen des Tumors zu differenzieren, wurde das Wachstumsverhalten der aus dem Tumor isolierten Zellen betrachtet (Singh et al., 2003). In Analogie zu Arbeiten von Reynolds und Weiss (1992) an neuralen Stammzellen entdeckten mehrere Forschergruppen, dass ein Teil der Gliomzellen in der Lage ist im serumfreien Medium als Neurosphären zu wachsen (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004). Die Zellen der Neurosphären waren in der Lage sich selbst zu erneuern und somit neue Neurosphären zu bilden, in verschiedene Zellen des Ursprungstumors zu differenzieren und wiesen eine Expression neuraler Marker (z.B. Nestin) auf (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004). Zusätzlich zu diesen Nachweisen in vitro wurde die Tumorigenität der Gliomstammzellen in vivo im Mausmodell überprüft. Hierfür wurden die Gliomstammzellen entweder subkutan oder intrakraniell in immundefiziente Mäuse injiziert (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004). Die Mäuse wurden über mehrere Wochen beobachtet, dann geopfert und schließlich histologisch untersucht (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004). Arbeiten von Pollard et al. (2009) wiesen darauf hin, dass das Neurosphären-Assay nicht alle Gliomstammzellen erfasst. Sie zeigten, dass auch adhärente Gliomzellen Stammzelleigenschaften aufweisen und tumorigen sind. Ebenso zeigten die Analysen unseres Labor, dass die aus verschiedenen Tumoren abgeleiteten Zelllinien ein unterschiedliches Wachstumsverhalten und dennoch Stammzelleigenschaften aufweisen sowie in der Lage sind im Mausmodell Tumore zu erzeugen (Choschzick et al., 2014).

Seit der Entdeckung der Gliomstammzellen ist CD133 (Prominin 1) ein häufig verwendeter Marker für die Isolierung und Charakterisierung dieser Zellen. Allerdings ist CD133 kein universeller Marker und

seine Nützlichkeit als Marker für SLGCs umstritten, da CD133 nicht von der Gliomstammzelle, sondern eher von einer SLGC-Subpopulation, einer Art früher Progenitor, exprimiert wird (Typ II – Zellen in Abb. 4) (Chen et al., 2010; Clément et al., 2009). Außerdem wiesen auch CD133-negative Gliomzellen ein tumorigenes Potenzial auf (Beier et al., 2007; Chen et al., 2010; Clément et al., 2009; Joo et al., 2008; Wang et al., 2008). Die Funktion von CD133, ein 5-transmembranäres Glycoprotein, ist bisher nicht bekannt.

Weitere potenzielle Marker für SLGCs sind CD44, Integrin α 6, Musashi und Nestin (Schonberg et al., 2014). CD44, ein Hyaluronsäurerezeptor, ist als Marker für Tumorstammzellen verschiedener Tumorentitäten (z.B. Mammakarzinom, Magenkarzinom) beschrieben (Horimoto et al., 2016; Takaishi et al., 2009; Toole, 2009). Nach der Bindung von Hyaluronsäure an den Rezeptor werden verschiedene Signalwege aktiviert, die zur Tumorzellproliferation, zum invasiven Wachstum sowie zur Chemoresistenz beitragen (Toole, 2009). Integrin α 6 bildet zusammen mit Integrin β 1 oder β 4 ein Heterodimer und fungiert so als Laminin-Rezeptor, der in der Lage ist das Wachstum neuraler Stammzellen zu regulieren (Lathia et al., 2010). Musashi ist ein RNA-bindendes Protein, welches an der asymmetrischen Zellteilung beteiligt ist und somit die Aufrechterhaltung des Stammzellpools sowie die Differenzierung von Stammzellen reguliert (Wang et al., 2014). Musashi ist in den meisten, aggressiven, soliden Tumoren hoch exprimiert und unterstützt die Selbsterneuerung (Minuesa et al., 2014). Nestin ist ein Intermediärfilament, welches in neuralen Stamm- und Progenitorzellen exprimiert wird und während der Differenzierung durch andere Intermediärfilamente ersetzt wird (Veselska et al., 2006). In Gliompatienten ist eine Nestin/CD133-Koexpression mit einer geringeren Überlebensrate korreliert (Zhang et al., 2008). Die Analysen von Chen et al. (2010) zeigten, dass die Expression von FABP7 mit einem geringen Differenzierungsgrad in SLGCs assoziiert ist. FABP7, ein fettsäurebindendes Protein, ist in neuralen Stammzellen exprimiert und ist am Fettsäuretransport, am Zellwachstum und an der Selbsterneuerung beteiligt (De Rosa et al., 2012; Morihiro et al., 2013). Im GBM ist eine hohe FABP7-Expression mit einem invasiven Wachstum und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Morihiro et al., 2013). Wie die Expression von FABP7 und Musashi wird auch die Expression von PAX6 mit Gliomzellen in Verbindung gebracht (Dahlrot et al., 2013; Zhou et al., 2005). PAX6, ein Transkriptionsfaktor, ist ein Zellschicksalsentscheider und beeinflusst vor allem durch sein zeitlich und räumlich differenziertes Expressionsmuster die Neurogenese (Arai et al., 2005; Duan et al., 2013). Es wird beschrieben, dass PAX6 die Expression von FABP7 in Gliomen regulieren kann (Liu et al., 2012). Auch die Transkriptionsfaktoren Sox2 (sex determining region Y-box 2), Oct3/4 (octamer-binding

ranscription factor 3/4) und Nanog wurden als Marker für SLGCs vorgeschlagen (Guo et al., 2011). Seymour et al. (2015) haben beschrieben, dass die von ihnen analysierten SLGCs eine hohe Expression von Sox2, Oct3/4 und Nanog aufwiesen und die drei Transkriptionsfaktoren für die Regulation der Proliferation und der Selbsterneuerung der SLGCs essenziell waren. Für die SLGCs spielt vor allem Sox2 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters und der Tumorigenität (Alonso et al., 2011; Gangemi et al., 2009). Sox2 liegt in allen GBMs überexprimiert vor (Alonso et al., 2011). Die Sox2-Überexpression ist durch eine Hypomethylierung des Sox2-Promotors und in fast 12% der Fälle durch eine Sox2-Amplifikation bedingt (Alonso et al., 2011). Die Daten aus unserem Labor zeigten ebenfalls eine Sox2-Expression in SLGC-Linien. Jedoch war zu erkennen, dass die Sox2-Proteinexpression zwischen den SLGC-Linien variierte (Choschzick et al., 2014). Diese Variation war durch Unterschiede in der Methylierung des Sox2-Promotors und im *sox2*-mRNA-Level bedingt (Choschzick et al., 2014). Zudem zeigten die von uns untersuchten Gliome und die daraus abgeleiteten Zellkulturen eine Koexpression von Sox2 und Nestin (Raju et al., 2015). Zbinden et al. (2010) schlussfolgerten aus ihren Beobachtungen, dass Nanog für GBMs essenziell ist. Untersuchungen unseres Labor konnten ebenfalls *nanog*-Transkripte in allen SLGC-Linien nachweisen (Choschzick et al., 2014). Nanog könnte sowohl die Tumorigenität als auch den Stammzellstatus der Zellen im GBM regulieren (Zbinden et al., 2010). Ebenso wurde von einer Arbeitsgruppe beschrieben, dass Oct3/4 für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters und der Tumorigenität von SLGCs essenziell ist (Ikushima et al., 2011). Allerdings zeigten Analysen unseres Labors, dass der Oct3/4-Promotor in SLGCs hypermethyliert vorliegt. Dennoch sind *oct3/4*-Transkripte des nukleären Oct3/4 in den SLGC-Linien zu detektieren (Choschzick et al., 2014).

1.7. Therapieresistenz stammzellähnlicher Gliomzellen

Um die Therapiesensitivität von Gliomzellen zu untersuchen, gibt es zwei methodisch verschiedene Ansätze. Zum einen werden die aus dem Tumor isolierten Gliomzellen mittels FACS (*fluorescenceactivated cell sorting*) in CD133-positive und CD133-negative Zellen sortiert und anschließend untersucht oder *in vitro* kultiviert (Dirks, 2010). Hierbei werden die CD133-positiven Zellen als Gliomstammzellen bezeichnet (Bao et al., 2006; Galli et al., 2004; Liu et al., 2006; Singh et al., 2004). Bei der anderen Methode werden die aus dem Tumor isolierten Gliomzellen durch die Kultivierung in serumfreiem Medium auf Zellen mit Stammzelleigenschaften selektiert (Dirks, 2010). Hierbei kommt es zu einer Anreicherung von Gliomstammzellen (Beier et al., 2008; Dirks, 2010; Lim et al., 2012). Neben den Gliomstammzellen sind allerdings stets Zellen verschiedener Differenzierungsstadien in der Kultur vorhanden. Dies betrifft zwar beide Methode, ist jedoch im Fall der Mediumselektion ausgeprägter (Chen et al., 2010).

Analysen bezüglich der Sensitivität von Gliomstammzellen auf die Behandlung mit TMZ zeigten eine relative Resistenz der Gliomstammzellen gegenüber TMZ (Chen et al., 2012; Liu et al., 2006; Nakai et al., 2009). Zum einen wurde die Expression von Effluxtransportern wie ABCG2 und MDR1 auf CD133positiven Zellen mit der hohen Resistenz gegenüber TMZ korreliert (Liu et al., 2006; Nakai et al., 2009). Zum anderen wiesen CD133-positive Zellen verglichen mit CD133-negativen Zellen eine höhere Expression von mgmt-mRNA und von Transkripten anti-apoptotischer Proteine auf (Liu et al., 2006). Arbeiten von Beier et al. (2008) zeigten, dass sowohl CD133-positive als auch CD133-negative Gliomstammzellen keinen TMZ-induzierten Zelltod aufwiesen. Allerdings war TMZ in der Lage die Zellproliferation, die Nestinexpression und das klonogene Wachstum CD133-positiver und -negativer Zelllinien zu reduzieren (Beier et al., 2008). MGMT wurde bei diesen Analysen sowohl in CD133positiven als auch CD133-negativen Gliomstammzelllinien detektiert, war jedoch nicht in jeder Zelllinie vorhanden (Beier et al., 2008). Der MGMT-Status, MGMT-positiv oder -negativ, war entscheidend für die TMZ-Konzentration, die notwendig war um die beobachteten Effekte hervorzurufen (Beier et al., 2008). Für die bisherigen Analysen wurden in der Regel Zelllinien verwendet, die nur zu einen gewissen Anteil CD133-positiver Zellen aufwiesen. Somit stellt sich die Frage, welchen Anteil die CD133positiven Zellen dieser Kulturen an der TMZ-induzierten Antwort haben und welchen die CD133negativen Zellen. Zudem wiesen die Analysen von Chen et al. (2010) darauf hin, dass die eigentliche Gliomstammzelle CD133-negativ ist.

Analysen zur Strahlensensitivität von Gliomstammzellen wiesen auf eine hohe Strahlenresistenz in CD133-positiven Zellen hin (Bao et al., 2006; Lomonaco et al., 2009). Arbeiten von Bao et al. (2006) zeigten, dass es nach der Bestrahlung in CD133-positiven Zellen zu einer höheren Aktivierung von ATM, Chk1 und Chk2 verglichen zu CD133-negativen Zellen kam. Bereits in unbehandelten, CD133-positiven Zellen waren Chk1 und Chk2 stärker phosphoryliert als in CD133-negativen Zellen (Bao et al., 2006).

Zudem war eine schnellere Reparatur von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in CD133-positiven Zellen zu erkennen (Bao et al., 2006). Die Induktion von γ H2AX-Foci durch Bestrahlung verlief allerdings in CD133-positiven und -negativen Zellen identisch (Bao et al., 2006). Ropolo et al. (2009) detektierten zwar auch eine erhöhte Aktivierung von Chk1 und Chk2 in unbehandelten sowie bestrahlten, CD133-positiven Zellen, einen verlängerten Zellzyklus, jedoch keinen Unterschied in der Reparatur der DNA-Schäden. Bei Analysen von Lomonaco et al. (2009) überlebte ein höherer, prozentualer Anteil in der CD133-positiven Kultur nach der Bestrahlung. Insgesamt waren CD133-positive Zellen immer strahlenresistenter als CD133-negative. Im Vergleich zu etablierten Gliomzelllinien waren CD133-positive Zellen sowie SLGC-Linien trotz Bestrahlung in die Synthese-Phase des Zellzyklus eintraten (Lim et al., 2012; McCord et al., 2009). Der G2-Checkpunkt schien in CD133-positiven Zellen sowie in SLGC-Linien intakt (Lim et al., 2012; McCord et al., 2009). Im Vergleich zu nicht-tumorigenen, neuralen Progenitorzellen (*neural progenitor cells*, NPCs) waren SLGCs strahlenresistenter, wiesen aber keine erhöhte, basale Aktivierung von Chk1 oder Chk2 auf (Lim et al., 2012).

Die verschiedenen Ansatzpunkte geben einen unterschiedlichen Blickwinkel auf die Strahlenresistenz von Gliomstammzellen. Da nach den Erkenntnissen von Chen et al. (2010) die eigentliche Gliomstammzelle CD133-negativ ist, stellt sich die Frage, welchen Einfluss der Stammzellcharakter auf die Strahlenresistenz hat. Zudem waren widersprüchliche Aussagen bezüglich der Chk1- und Chk2-Phosphorylierung in unbehandelten Zellen und der DNA-Reparatur vorhanden. Die Anzahl der untersuchten SLGC-Linien war gering. Somit stellt sich die Frage, ob es Unterschiede zwischen Gliomzelllinien verschiedener Patienten gibt. Außerdem wurde nicht untersucht, welchen Einfluss TMZ auf die Aktivierung der DNA-Reparatur nimmt und ob es einen Unterschied zwischen MGMT-positiven und -negativen SLGC-Linien gibt. Auch die Auswirkungen der Doppelbehandlung von Bestrahlung und TMZ, die in der Klinik Routine ist, auf SLGC-Linien wurde bisher *in vitro* nicht betrachtet.

2. Fragestellung

In unserer Arbeitsgruppe sind SLGC-Linien, abgeleitet aus verschiedenen Gliomen, vorhanden. Es wurde festgestellt, dass sich die Zellen sowohl zwischen den Linien als auch innerhalb einer Linie phänotypisch unterscheiden. Dieses deutet darauf hin, dass es nicht nur die eine Gliomstammzelle gibt, sondern verschiedene Gliomstammzellen existieren. In den bisherigen Analysen verwendeten die meisten Forschergruppen CD133-Antikörper zur Isolierung von Gliomstammzellen. Ausgehend vom Modell zur linearen Hierarchie von Chen et al. (2010) lässt die Verwendung von CD133 als Marker für Gliomstammzellen außer Acht, dass die eigentliche Gliomstammzelle CD133-negativ ist und nur eine Subpopulation von Progenitoren eine CD133-Expression aufweist. Hinsichtlich der Responsivität von Gliomstammzellen gegenüber Bestrahlung und der Behandlung mit TMZ gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben. Es ist nicht klar, ob die Gliomstammzellen eine höhere Resistenz als die Nicht-Gliomstammzellen aufweisen. Ebenso widersprüchlich sind die möglichen Gründe für eine höhere Resistenz. Es bleibt ungeklärt, ob die Gliomstammzellen bereits ohne Behandlung eine Aktivierung der checkpoint kinases Chk1 und Chk2 aufweisen und ob sie eine effizientere DNA-Reparatur besitzen. Bei all diesen Analysen an primären Gliomzelllinien wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass die Gliome verschiedener Patienten unterschiedliche Mutationen aufweisen. Die deregulierten Signalwege könnten einen Einfluss auf die Responsivität gegenüber der Behandlung haben. Hierbei steht besonders p53 im Fokus als Regulator vielfältiger Signalwege, die unter anderem das Überleben und die Apoptose regulieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit habe ich den Grund für den phänotypischen Unterschied der SLGC-Linien, die sich von GBMs ableiteten, untersucht. Alle untersuchten SLGC-Linien wurden in unserem Labor etabliert und wuchsen in serumfreiem Medium (Choschzick et al., 2014). Die beobachteten Unterschiede könnten auf einen unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Zellen zurückzuführen sein. Um diese Hypothese zu untersuchten, habe ich klonal expandierte SLGC-Linien hinsichtlich ihres Stammzellstatus charakterisiert. Hierbei habe ich sowohl die Expression von Proteinen als auch von Transkripten untersucht, die für Stammzellen, neural differenzierte Zellen sowie Gliomzellen charakteristisch sind. Darüber hinaus könnten Unterschiede im Phänotyp genetisch bedingt sein. Aus diesem Grund habe ich die Klonlinien bezüglich der Expression von Proteinen häufig deregulierter Signalwege untersucht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit lag mein Fokus auf der Responsivität der SLGC-Linien gegenüber Bestrahlung und der Behandlung mit TMZ. Es stellte sich die Frage, (i) ob die Aktivierung der DNA-Schadenserkennung und die Signaltransduktion nach den Behandlungen in den SLGC-Linien identisch verläuft und (ii) welchen Einfluss der Stammzellcharakter und der p53-Status auf diesen Verlauf haben. Es wurden SLGC-Linien untersucht, die einen unterschiedlichen Stammzellcharakter und verschiedene p53-Mutationen aufwiesen. Ich habe die Expression von Proteinen bestimmt, die an der DNA-Schadenserkennung und der Signaltransduktion beteiligt sind. Zusätzlich stellte sich die Frage, ob die Induktion der DNA-Doppelstrangbrüche zwischen den Zelllinien und zwischen Klonen einer Linie identisch verläuft. Hierzu habe ich die Expression von γ H2AX untersucht. Schließlich stellte sich die Frage, ob es unter der Behandlung zu einer Selektion bestimmter Phänotypen kommt. Hierfür habe ich die Expression stammzellassoziierter Proteine über mehrere Tage nach der Behandlung untersucht sowie überlebende Zellen analysiert.

3. Material und Methoden

3.1. Zelllinien

Bei den in dieser Arbeit verwendeten, stammzellähnlichen Gliomzellen (*stem-like glioma cells*, SLGCs) handelt es sich um im Labor angelegte Primärkulturen, die sich von einem Glioblastom oder einem Gliosarkom ableiten. Die Zelllinien wurden aus Tumorproben angelegt, die aus routinemäßigen Operationen der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (Direktor Prof. Dr. med. V. Tronnier), stammten. Es liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vor (Votum 08-070, 27.06.2008). Die Patienten gaben schriftlich ihr Einverständnis zur Verwendung des Tumorgewebes in der Forschung. Die Klassifizierung der Tumore wurde nach WHO-Kriterien von einem Pathologen durchgeführt. Alle Experimente mit humanem Probenmaterial erfolgten gemäß den Helsinki-Richtlinien sowie den nationalen Leitlinien.

In dieser Arbeit wird der Begriff "SLGC-Linie" verwendet, da es bei der *in vitro*-Kultivierung nicht möglich ist Stamm- und Progenitorzellen voneinander getrennt zu expandieren (für Details siehe Einleitung). Die aus dem Glioblastom oder Gliosarkom abgeleiteten SLGC-Linien sind mit "T" für Tumorlinie und einer fortlaufenden Nummer kodiert. Die verwendeten SLGC-Linien T1338, T1371, T1440, T1447, T1452, T1464 und T1495 sind in den Publikationen von Choschzick et al. (2014) und Raju et al. (2015) charakterisiert. Die SLGC-Linien T1442 und T1522 wurden bisher nicht publiziert. Als Kontrollzelllinien für die Behandlungsversuche wurde die etablierte Gliomzelllinie U87MG (Xie et al., 2015) verwendet, die uns von der Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf zur Verfügung gestellt wurde (Direktor Prof. Dr. M. Westphal). Als Positivkontrolle für die durchflusszytometrischen Analysen diente die etablierte Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 (Djelloul et al., 1997), gestellt von Prof. Dr. Dr. J. Habermann (Leiter der Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie und Biomaterialbanken am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck), da diese Zelllinie >90% CD133-positive Zellen enthält.

Zelllinie	Tumorart	p53-Status	Analysierte Klonkulturen
T1338	GBM	WT	+
T1371	GSarc	mut. (R175H)	+
T1440	GBM	WT	+
T1442	GBM	mut. (N239D)	+
T1447	GSarc	mut. (R248W)	+
T1452	GBM	mut. (3'-spl)	+
T1464	GBM	WT	+
T1495	GBM	mut. (R273H)	+
T1522	GBM	WT	+
U87MG	GBM	WT *	
CaCo-2	Kolonkarzinom	mut. (stop 204) #	

Tab. 1: SLGC- und Kontrolllinien sowie deren p53-Status.

GBM, Glioblastom; GSarc, Gliosarkom; p53, Tumorsuppressorprotein p53; WT, Wildtyp; mut., mutiert; R175H, Arginin 175 durch Histidin ersetzt; R273H, Arginin 273 durch Histidin ersetzt; R248W, Arginin 248 durch Tryptophan ersetzt; N239D, Asparagin 239 durch Aspartat ersetzt; 3'-spl, Verlust der 3'-*splice*-Stelle im Intron zwischen Exon 6 und Exon 7; +, zutreffend; * [Quelle: Wang et al. (2013)]; stop 204, Stoppcodon an der Position 204; # [Quelle: Djelloul et al. (1997)]. Quelle: C. Zechel, persönliche Mitteilung.

3.2. Zellkultur

Die Kultivierung der Tumorstammzellen erfolgte in serumfreiem Medium (N-Medium) bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre. Das N-Medium setzt sich aus DMEM/Häm's F12 (Biochrom, Berlin, Deutschland), 20% BIT Admixture 100 (PeloBiotech, Planegg, Deutschland), 2% 200 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Amphoterizin (jeweils von Biochrom, Berlin, Deutschland) sowie je 20 ng/ml der humanen, rekombinanten Wachstumsfaktoren EGF (*epidermal growth factor*) und bFGF (*basic fibroblast growth factor*; jeweils von Promocell, Heidelberg, Deutschland) zusammen. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert.

Die Tumorstammzellen wuchsen entweder adhärent, semi-adhärent oder als Sphäroide. Zur Dissoziation der Zellen wurde das Medium entfernt, mit 1x PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und mit 0,05% 1x Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch serumhaltiges Medium [DMEM/Häm's F12, 2% 200 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Amphotericin B, 10% hitzeinaktiviertes FCS (*fetal calf serum*; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)] inhibiert. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 250 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1x PBS resuspendiert.

Die U87MG- und die CaCo-2-Linie wurden in serumhaltigem Medium [DMEM, 10% (für U87MG) bzw. 20% (für CaCo-2) hitzeinaktiviertes FCS, 1% Penicillin/Streptomycin] kultiviert. Die Dissoziation der Zellen erfolgte analog zu den Tumorstammzellen.

Die weiter differenzierten Gliomtumorzellen (F-Linien) wurden in serumhaltigem Medium [DMEM, 10% hitzeinaktiviertes FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Amphoterizin] kultiviert. Die Dissoziation der Zellen erfolgte ebenfalls analog zu den Tumorstammzellen.

Zur Cryokonservierung der Tumorstammzellen wurden die Kulturen wie oben beschrieben dissoziiert und anschließend in Einfriermedium [DMEM/Häm's F12, 20% BIT Admixture 100, 10% DMSO, 2% 200 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Amphoterizin] zunächst für eine Stunde bei -20°C langsam eingefroren bevor die Zellen bei -150°C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

3.3. Klonale Expansion

Zur Analyse der hierarchischen Organisation sowie der Segregation bestimmter Genotypen wurden die SLGC-Kulturen mit der *limited dilution*-Methode klonal expandiert (S. Roth, Masterarbeit, 2010; E. Hirseland, Masterarbeit, 2012; E. Pawlak, MTA). Dafür wurden die Zellen wie oben beschrieben vereinzelt, in einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau gezählt und in einer vorher festgelegten Zellzahl ausplattiert. Dabei wurde berücksichtigt, dass nicht jede Zelle das Potenzial besitzt sich selbst zu erneuern und somit Klone zu generieren. In der Regel wurden zwischen fünf und zehn Zellen in einer Vertiefung einer 96 Lochplatte ausplattiert. Die Vertiefungen wurden zweimal wöchentlich begutachtet. War das Wachstum eines Zellklons eindeutig zu erkennen, wurde dieser in eine neue Vertiefung einer 96 Lochplatte transferiert, das Wachstum beobachtet und die Zellen expandiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die früher etablierten Klone (Roth & Hirseland) aus Cryostocks rekultiviert bzw. die von Frau E. Pawlak isolierten Klone (T1442, T1522) analysiert. Alle Klone sind mit dem Namen der SLGC-Linie, von der sie sich ableiten, sowie der Bezeichnung "cl" und einer Nummer gekennzeichnet.

3.4. Bestrahlung und Behandlung mit Temozolomid

Die Bestrahlung der Zellen wurde von Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (Direktor Prof. Dr. J. Dunst) durchgeführt. Dabei erfolgte eine Einzeitbestrahlung am Linearbeschleuniger DHX2100 der Firma Varian Medical Systems (Palo Alto, Kalifornien, USA) unter Verwendung von 6 MeV Photonenstrahlung. Die Dosisrate betrug 3 Gy [Gray] /min. Aus physikalischen Gründen wurden 1,5 cm dicke, wasseräquivalente Kunststoffplatten auf und 2 cm dicke Platten unter die Zellkulturgefäße platziert. Sowohl die Wahl der Bestrahlungsdosis als auch der Temozolomid- (TMZ-; MSD, Haar, Deutschland) Konzentration orientierte sich an den im Labor erstellten Dosiswirkungskurven. Dabei wurden die Werte der Proliferationsanalysen zu Grunde gelegt, bei denen die Hälfte der Zellen eine Inhibition der Proliferation aufwies [ED₅₀/EC₅₀]. Für die TMZ-Stammlösung [5 mM] wird eine TMZ-Kapsel von 5 mg aufgebrochen und das Pulver in DMSO gelöst. Entsprechend diente eine mit dem Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) behandelte Probe als Kontrolle.

Die zeitliche Abfolge der Behandlung mit Photonenstrahlung und TMZ variierte je nach Fragestellung. Wurden die Frühphasen nach der Behandlung untersucht, so wurden die Zellen zuerst plattiert und am Folgetag nacheinander mit 100 μ M TMZ behandelt und 30 bis 60 min später mit 5 Gy bestrahlt. Anschließend erfolgte die immunzytologische Färbung zur Bestimmung des Anteils yH2AX-positiver Zellen 1, 2, 4, 8 bzw. 24 h nach der Bestrahlung. Die Untersuchung der DNA-Schadensantwort von SLGC-Linien verliefen analog, wobei die Messungen nach 6 h sowie an den Tagen d1 bis d5 durchgeführt wurden. Für die Schadensantwort von SLGC-Linien auf eine hohe Strahlendosis wurden die Zellen entsprechend ihrer Strahlensensibilität, bestimmt anhand der im Labor erstellten Dosiswirkungskurven, mit 10 Gy (T1522), 20 Gy (T1371, T1442, T1447 cl4, T1495) bzw. 25 Gy (T1440) bestrahlt. Für die Analysen des Effekts der Behandlungen auf die Vitalität, Apoptose, Proliferation und den Anteil CD133-positiver Zellen, die parallel zu den Inokulationen behandelter Zellen in SCID-Mäuse stattfanden, wurden die Zellen zuerst mit 5 Gy bestrahlt, am Folgetag ausplattiert bzw. inokuliert und am darauf folgenden Tag gegebenenfalls mit TMZ [EC₅₀] behandelt. Die Analysen fanden vier bzw. fünf Tage nach der TMZ-Behandlung statt. Für die immunzytologischen Analysen zur Bestimmung des Anteils an YH2AX-, Sox2- und Nestin-positiven Zellen wurden die Zellen analog behandelt und täglich (von Tag d1 bis Tag d5) gefärbt.

3.5. Vitalitätstest

Die Vitalität erfolgte mittels MTT-(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Analyse der diphenyltetrazoliumbromid) Assay. Hierfür wurden die Zellen am Tag nach der Bestrahlung mit 5 Gy in einer Dichte von 1x10⁴ Zellen pro cm² in einer 96-Lochplatte ausplattiert. Wiederum einen Tag später erfolgte die TMZ-Behandlung [EC₅₀]. Das MTT-Assay erfolgt vier bzw. fünf Tage nach der TMZ-Behandlung. Hierfür wurde pro Vertiefung 10 µl MTT-Lösung [5 mg pro ml 1x PBS] hinzugegeben und für 4 h bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Die entstandenen Formazankristalle wurden anschließend mit 100 µl einer Stopplösung [10% SDS, 50% N,N-Dimethylformamid in Aqua dest.] gelöst. Anschließend wurde die Absorption bei λ = 570 nm im Mikrotiterplattenlesegerät (UVM 340, Asys Hi-Tech GmbH / LKB Biochrom Berlin, Deutschland) unter Verwendung der Software MicroWin2000 (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland) gemessen (Referenzwellenlänge λ = 655 nm). Da der Umsatz des Tetrazoliumsalzes (MTT) zu Formazan auf einer Redoxreaktion beruht, die v.a. von den Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH und metabolisch aktiven Enzymen abhängig ist (Berridge et al., 1996; Mosmann, 1983), kann das Assay Auskunft über die Vitalität von Zellpopulationen geben.

3.6. Immunzytochemische Analyse

Die Immunzytochemie (ICC) diente zur Analyse der zellulären Zusammensetzung der SLGC-Kulturen. Einerseits wurde die Expression und Verteilung der GFAP-Expression bestimmt, andererseits wurde überprüft, ob sich der Anteil γH2AX-, Sox2- und Nestin-positiver Zellen nach der Behandlung mit TMZ und/oder Photonenstrahlung verändert. Für die ICC wurden die Zellen auf mit Fibronektin- (je nach Zelllinie 1:100 bzw. 1:1000 in 1x PBS; 1 mg/ml, Promocell, Heidelberg, Deutschland) beschichteten Deckgläsern in einer 24-Lochplatte oder in ebenfalls Fibronektin-beschichteten chamber slides (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) ausplattiert. Für die Analysen der Frühphasen nach der Behandlung wurden 2x10⁴ Zellen pro cm² ausplattiert, im Fall der Untersuchungen über die Tage (d1 bis d5) und zur Charakterisierung der SLGC-Kulturen 1x10⁴ Zellen pro cm². Die Behandlung der Zellen erfolge in Abhängigkeit von der Fragestellung (für Details siehe Kapitel 3.4.). Die Zellen wurden entweder nach 1, 2, 4, 8 bzw. 24 h oder an den Tagen d1 bis d5 fixiert. Dafür wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit Ethanol/Eisessig [95% v/v, 5% v/v] für 7 min bei -20°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen einmal kurz und zweimal für 10 min mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 25 μl/Vertiefung in den *chamber slides* bzw. 40 μl/Deckglas primärer Antikörperlösung [1x PBS, 10% FCS, 0,04% Natriumazid + Antikörper] überschichtet und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit 1x PBS für 10 min gewaschen und anschließend mit dem sekundären, Fluorochrom-gekoppelten Antikörper (Zusammensetzung analog zur primären Antikörperlösung) für 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde ebenfalls dreimal gewaschen. Im Fall der Färbung zytoplasmatischer Proteine erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, 0,25 μg pro μl 1x PBS; Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln, gefolgt von dreimaligem Waschen. Abschließend wurden die Zellen mit Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, USA) eingedeckt, mit Nagellack versiegelt und bis zur mikroskopischen Analyse bei -20°C gelagert. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Die mikroskopischen Analysen wurden am Fluoreszenzmikroskop Biozero BZ-8000 von Keyence (Neu-Isenburg, Deutschland) unter Verwendung der Software BZ Viewer 9000 (Keyence) durchgeführt. Für die Analysen wurde ein 20x Objektiv verwendet.

Antikörper	Quelle	Hersteller; Bestellnummer	Verdünnung
α Nestin	Maus	Merck Millipore; MAB5326	1:100
αGFAP	Kaninchen	Merck Millipore; AB5804	1:250
αSox2	Kaninchen	Cell Signaling; #3579	1:100
α-γΗ2ΑΧ	Kaninchen	Cell Signaling; #9718	1:200
α Maus DyLight®	Ziege	Thermo Fisher Scientific; 35502	1:400
α Kaninchen Cy3	Ziege	Jackson ImmunoResearch; 111-165-003	1:300

Tab. 2: Antikörper der immunzytochemischen Analyse.

 α , Symbol für Antikörper; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Sox2, sex determining region Ybox 2; γ H2AX, am Serylrest S139 phosphoryliertes Histon H2AX; Cy3, Cyanin 3; Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland; Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA.

3.7. Zellsortierung

Zur Charakterisierung der SLGC-Linien hinsichtlich des Anteils CD133-, CD44-, CD31- und Integrin α 6positiver Zellen sowie zur Analyse der behandlungsspezifischen Effekte auf den Anteil CD133-positiver Zellen, den Zellzyklus und die Apoptose wurden die Zelllinien durchflusszytometrisch untersucht. Um den Einfluss der Behandlungen auf die SLGC-Linien zu untersuchen, wurden diese zunächst mit 5 Gy bestrahlt, am Folgetag in einer Dichte von $1x10^4$ Zellen pro cm² in einer Zellkulturflasche (25 cm²) ausplattiert und wiederum einen Tag später mit TMZ [EC₅₀] behandelt. Die Messung fand vier bzw. fünf Tage nach der TMZ-Behandlung statt.

Durchflusszytometrie Antikörper-markierter Zellen

Zur durchflusszytometrischen Analyse spezifischer Oberflächenantigene wurden die Zellen mit 0,05% 1x Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) enzymatisch geerntet und dissoziiert. Die Einzelzellsuspension wurde einmal mit 1x PBS gewaschen und in der Zentrifuge für 5 min bei 250 x g und Raumtemperatur pelletiert. Die Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert und für parallele Färbeansätze aufgeteilt, sodass die Proben und die Kontrollen aus der gleichen Zellsuspension stammten. Die Zellsuspension wurde für 1 min bei 16000 x g (Eppendorf Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und Raumtemperatur pelletiert und die Zellen in 80 μ l FACS-Puffer [1x PBS, 0,5% FCS, 2 mM EDTA] resuspendiert. Pro Probe wurden 20 μ l FcR-Block-Reagenz (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) sowie 5 μ l (IgG2a, κ -BV421, Integrin α 6-BV421) bzw. 10 μ l spezifischer Antikörper oder Isotyp-Kontrolle (siehe Tab. 3) pipettiert und für mindestens 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in 1 ml FACS-Puffer gewaschen, für 5 min bei 1300 x g und Raumtemperatur pelletiert und anschließend in 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert.

Die Messung fand am Durchflusszytometer BD LSRII der Cell Analysis Core Facility (CAnaCore) Lübeck (Zentrum für Infektiologie und Entzündungsforschung der Universität zu Lübeck; Direktor Prof. Dr. J. Köhl) unter Verwendung der BD FACS Diva Software Version 6.1 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) statt. Zur Datenanalyse wurde die *Overlay*-Funktion der Software Summit (Version 4.3, Dako, Colorado, USA) verwendet. Im Fall der CD133-Analysen wurde zur Kontrolle der Färbeeffizienz stets die CaCo-2-Zelllinie gegen CD133 mitgefärbt, da ihr Anteil an CD133-positiven Zellen über 90% liegt.

Antikörper	Klon	Hersteller	Verdünnung
lgG2b-PE	IS6-	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	1:11
	11E5.11		
CD133/2-PE	293C3	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	1:11
CD44-PE	DB105	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	1:11
CD31-PE	AC128	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	1:11
lgG2a,κ-BV421	R35-95	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	1:21
Integrin α 6-BV421	GoH3	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	1:21

Tab. 3: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse.

IgG, Immunglobulin G; CD, *cluster of differentiation*; CD133, Prominin 1; CD44, Hyaluronsäurerezeptor; CD31, PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule* 1); PE, Phycoerythrin; BV421, Brilliant Violet[™] 421.

Durchflusszytometrie Propidiumiodid-markierter Zellen

Zur Analyse der Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen GO/G1, S und G2 wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet, mit 3,7% PBS-gepuffertem Formaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und pelletiert (5 min bei 1300 x g und Raumtemperatur). Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Cytonin[™] (Trevigen, Gaithersburg, Maryland, USA) für 30 min bei Raumtemperatur permeabilisiert, einmal mit 1x PBS gewaschen, pelletiert (siehe oben) und in der Regel in 300 µl 1x PBS resuspendiert. Kurz vor der Messung wurden die Proben mit 6 µl Propidiumiodid/RNase-Mix (Trevigen, Gaithersburg, Maryland, USA) versetzt und für mindestens 5 min inkubiert, sodass das Propidiumiodid in die DNA interkalieren kann. Die Proben wurden ebenfalls am Durchflusszytometer BD LSRII (analog zu oben) gemessen und mit der Software Summit ausgewertet. Hierbei wurden die Zellzyklusphasen (G0/G1, S, G2) pro SLGC-Linie anhand der kontrollbehandelten Zellen festgelegt und auf die behandelten Proben übertragen. Zudem wurde der Anteil von Zellen bestimmt, deren DNA-Gehalt höher als bei einem tetraploiden Chromosomensatz (>4n) war.

Durchflusszytometrie TUNEL-markierter Zellen

Zur Analyse des Anteils apoptotischer Zellen wurde die TUNEL- (*TdT- (terminal desoxynucleotidyl transferase-) mediated dUTP-biotin nick end labeling*) Methode angewendet. Hierzu wurde das FlowTACS[™] in situ Apoptosis Detection-Kit von Trevigen (Gaithersburg, Maryland, USA) nach der Anleitung des Herstellers verwendet. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet und mit 3,7% PBS-gepuffertem Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen wie zuvor beschrieben mit Cytonin[™] permeabilisiert. Die Markierung apoptotischer Zellen erfolgte über eine Färbelösung, die TdT-dNTPs und TdT-Enzym enthielt. Das TdT-Enzym fügt an freien 3'-OH-Enden, wie sie in der DNA apoptotischer Zellen zu finden sind, Biotin-markierte Nukleotide (TdT-dNTPs) an. Diese werden in einem zweiten Färbeschnitt durch Streptavidin-gekoppeltes Fluorescein gebunden und können durchflusszytometrisch erfasst werden. Die Messung der Proben erfolgte wie zuvor am Durchflusszytometer BD LSRII und die Auswertung mit der Software Summit, wobei zur Datenanalyse die *Overlay*-Funktion verwendet wurde.

FACS (fluorescence-activated cell sorting)

Um im Fall der SLGC-Linie T1522 CD133-positive und -negative Zellen getrennt zu untersuchen, wurden die Zellen mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) sortiert. Dabei wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet und analog zur durchflusszytometrischen Untersuchung vorbereitet, allerdings unter sterilen Bedingungen. Die Markierung der Zellen erfolgte in sterilem FACS-Puffer (siehe oben), in Anwesenheit von FcR-Block-Reagenz (1:5; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) und unter Verwendung des anti-CD133/2-PE-gekoppelten Antikörpers (1:11; Klon 293C3; Miltenyi Biotec) für 30 min im Dunkeln auf Eis. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert, pelletiert (5 min bei 250 x g und Raumtemperatur) und erneut in FACS-Puffer resuspendiert. Die Sortierung der Zellen erfolgte parallel mit zwei Geräten (*cell sorter* FACSAria III (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) und MoFlo Legacy (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)). Es handelt sich hier um eine Serviceleistung des CAnaCore des Zentrums für Infektiologie und Entzündungsforschung an der Universität zu Lübeck (Direktor Prof. Dr. J. Köhl). Die Zellen wurden in N-Medium mit 10% FCS sortiert, im Anschluss der Sortierung pelletiert (5 min bei 250 x g und Raumtemperatur) und in N-Medium ausplattiert. Der Anteil CD133-positiver Zellen der CD133-Positiv- und -Negativfraktion wurde direkt nach dem Sortieren und anschließend wöchentlich überprüft (Woche W0 bis Woche W5).

3.8. Analyse der Proteinexpression mittels Western blot

Die Zellen wurden zunächst, abhängig von dem geplanten Zeitpunkt der Untersuchung, plattiert und am Folgetag mit 100 μ M TMZ behandelt und/oder mit 5 Gy bestrahlt bzw. ausschließlich mit 10 Gy (T1522), 20 Gy (T1371, T1442, T1447 cl4, T1495) oder 25 Gy (T1440) bestrahlt. Für die Bestimmung der Proteinexpression 6 h nach der Behandlung wurden 2x10⁴ Zellen pro cm² plattiert, für die Tage d1 bis d3 1x10⁴ und für die Tage d4 sowie d5 5x10³. Die Behandlungsreihen wurden einmalig durchgeführt. Für die Charakterisierung der SLGC-Linien und Klone wurden Zellpellets im Rahmen der fortlaufenden Passagierung gewonnen.

Die Herstellung der Proteinextrakte erfolgte mittels JLB-Puffer [50 mM Tris-base (pH 8), 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 0,5% Triton-X-100]. Zur Lyse der Zellen wurde das Zellpellet in JLB-Puffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Zur Inhibition von Proteasen wurde dem JLB-Puffer PIC (protease inhibitor cocktail, Roche, Mannheim, Deutschland) sowie PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Separation der Zelltrümmer von der Proteinlösung durch Zentrifugierung für 10 min bei 16000 xg (Eppendorf Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und Raumtemperatur. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay, Biorad, München, Deutschland) nach Standardmethoden (Maniatis et al., 1989). Die Absorption des Protein-Bradford-Gemischs wurde nach 20-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Helios Omega UV-Vis Photometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) bei λ = 595 nm gemessen. Anhand einer vorhandenen, mit Serumalbumin erstellten Eichkurve wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Zur Bestimmung der Qualität der isolierten Proteine wurden 2 µl Gesamtzellextrakt mit 8 µl 1x PBS gemischt, mit 2x Laemmli-Puffer [125 mM Tris-base (pH 6,8), 4% SDS, 20% Glycerol, 10% 2-Mercaptoethanol, 0,002% Bromphenolblau] versetzt und für 5 min bei 94°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über eine diskontinuierliche SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) nach Laemmli (Maniatis et al., 1989) unter Verwendung des Protean III SDS-PAGE Systems von Biorad (München, Deutschland). Dabei bestand das Gel aus einem 10% igen Trenngel und einem 4% igen Sammelgel (für Zusammensetzung der Gele siehe Tab. 4). Anschließend wurde das analytische Gel mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt (Maniatis et al., 1989).

Komponenten	10%iges	15%iges	4%iges Sammelgel
	Trenngel	Trenngel	
Aqua dest.	2,00 ml	1,25 ml	1,80 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,25 ml	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	-	-	0,75 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8)	1,66 ml	2,5 ml	0,4 ml
10% APS	50 µl	50 µl	15 µl
TEMED	3 μΙ	3 μΙ	4 μl

Tab. 4: Zusammensetzung der diskontinuierlichen SDS-Gele.

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-base, 1% SDS, pH 8,8; Sammelgelpuffer: 1 M Tris-base, 1% SDS, pH 6,8. APS, Ammoniumpersulfat; TEMED, Tetramethylethylendiamin.

Zur Proteinanalyse mittels Western blot wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper verschiedene Mengen an Gesamtzellextrakt eingesetzt (siehe Tab. 5). Die Proteinproben wurden wie oben beschrieben vorbereitet und die Proteine über die diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt. Hierbei bestand das Gel je nach Größe des zu detektierenden Proteins aus einem 10%igen bzw. 15%igen Trenngel (siehe Tab. 5) und einem 4%igen Sammelgel.

Antikörper	Größe Protein [kDa]	Acrylamid im Trenngel	Aufgetragene Proteinmenge
		[%]	[µg]
Sox2	34	10	15
Musashi	39#	10	15
FABP7	15	15	15
PAX6	47	10	15
GFAP	ca. 50 §	10	10 bzw. 15*
Tau	79	10	12
EGFR	135 (175)\$	10	15
PDGFR α	123 (195)\$	10	15
PDGFRβ	124 (190)\$	10	15
PTEN	54	10	15
pATM(Ser1981)	350	10	15
pChk1(Ser317)	56	10	15
pChk2(Ser19)	62	10	15
p53	53	10	15
p21 ^{Cip1/WAF1}	21	15	15
γH2AX(Ser139)	15	15	15

Tab. 5: Analysierte Proteine.

Sox2, sex determining region Y-box 2; FABP7, fatty acid binding protein 7; PAX6, paired box protein 6; GFAP, glial fibrillary acidic protein; EGFR, epidermal growth factor receptor; PDGFR α/β , plateletderived growth factor receptor α/β ; PTEN, phosphatase and tensin homolog; pATM(Ser1981), am Serylrest S1981 phosphorylierte Kinase ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*); pChk1(Ser317), am Serylrest S317 phosphorylierte *checkpoint kinase* 1; pChk2(Ser19), am Serylrest S19 phosphorylierte *checkpoint kinase* 2; p53, Tumorsuppressorprotein p53; p21, Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1/WAF1}; γ H2AX(Ser139), am Serylrest S139 phosphoryliertes Histon H2AX; #, Musashi 1; §, mehrere Isoformen vorhanden, Antikörper erkennt Triplett; *, zutreffend für T1338- und T1464-Klone; \$, Proteine sind glykosyliert und migrieren daher langsamer in der Gelelektrophorese.

Die SDS-PAGE erfolgte bei 200 V in 1x Elektrophoresepuffer [25 mM Tris-base, 0,2 M Glycin, 0,1% SDS]. Im Anschluss wurde das präparative Gel für 15 min bei Raumtemperatur in Transferpuffer [47,9 mM Tris-base, 38,6 mM Glycin, 0,037% SDS, 20% Methanol] inkubiert. Im Semi-Dry-Verfahren (Transblot SD, Biorad, München, Deutschland) wurden die Proteine für 1 h bei 12 V auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm, Biorad, München, Deutschland) transferiert. Das Gel wurde nach dem Transfer mit Coomassie Brilliant Blue R-250 kontrollgefärbt (Maniatis et al., 1989). Die Membran wurde in 2% Trockenmilch/1x PBS für mindestens 15 min bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation des primären Antikörpers (Tab. 6) erfolgte in der Regel über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurde die Membran dreimal für 10 min in 1x PBS/0,05% Tween 20 gewaschen und danach für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert (Tab. 7). Die Detektion erfolgte über Chemolumineszenz am ChemiDoc XRS mit der Software Quantity One (Version 4.6.2, Biorad, München, Deutschland) unter Verwendung der Detektionslösung Super Signal[®] West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland).

Antikörper	Quelle	Hersteller; Bestellnummer	Verdünnung
αSox2	Maus	Abcam; ab75485	1:1000
αSox2	Kaninchen	Merck Millipore; AB5603	1:1000
lphaMusashi	Kaninchen	Chemicon; 2005896	1:500
αFABP7	Kaninchen	Novus Biologicals; IMG-6611A	1:500
αΡΑΧ6	Kaninchen	Abcam; ab5790	1:1000
αGFAP	Maus	Merck Millipore; MAB360	1:1000
αTau	Kaninchen	Dako Cytomation; A0024	1:1000
αEGFR	Kaninchen	Cell Signaling; #4267	1:1000
αPDGFRα	Kaninchen	Cell Signaling; #3174	1:1000
α PDGFR β	Kaninchen	Cell Signaling; #4564	1:1000
αΡΤΕΝ	Kaninchen	Cell Signaling; #9559	1:1000
lphaGAPDH HRP-coupled	Kaninchen	Cell signaling; #3683	1:1000
α - α -Tubulin HRP-coupled	Kaninchen	Cell signaling; #9099	1:1000
αAktin	Maus	Merck Millipore; MAB1501	1:5000
α pATM(Ser1981)	Kaninchen	Cell Signaling; #5883	1:1000
α pChk1(Ser317)	Kaninchen	Cell Signaling; #2344	1:1000
αpChk2(Ser19)	Kaninchen	Cell Signaling; #2666	1:1000
α p 53	Kaninchen	Cell Signaling; #9282	1:1000
$\alpha p21^{Cip1/WAF1}$	Maus	Cell Signaling; #2946	1:2000
α – γ H2AX(Ser139)	Kaninchen	Cell Signaling; #9718	1:1000

Tab. 6: Primäre Antikörper für die Western blot-Analyse.

α, Symbol für Antikörper; Sox2, sex determining region Y-box 2; FABP7, fatty acid binding protein 7; PAX6, paired box protein 6; GFAP, glial fibrillary acidic protein; EGFR, epidermal growth factor receptor; PDGFRα/β, platelet-derived growth factor receptor type α/β; PTEN, phosphatase and tensin homolog; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase; HPR-coupled, horseradish peroxidase-gekoppelt; pATM(Ser1981), am Serylrest S1981 phosphorylierte Kinase ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*); pChk1(Ser317), am Serylrest S317 phosphorylierte *checkpoint kinase* 1; pChk2(Ser19), am Serylrest S19 phosphorylierte *checkpoint kinase* 2; p53, Tumorsuppressorprotein p53; p21, Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1/Waf1}; γH2AX(Ser139), am Serylrest S139 phosphoryliertes Histon H2AX; Abcam, Cambridge, UK; Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland; Chemicon, gehört nun zu Merck Millipore; Novus Biologicals, Abingdon, UK; Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland; Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA. Antikörper wurden in 2% Trockenmilch/1x PBS verdünnt.

Tab. 7: Sekundäre Antikörper für die Western blot-Analyse.

Antikörper	Hersteller; Bestellnummer	Verdünnung
Goat F(ab')2 Fragment Anti-Mouse IgG (H+L)-	Beckman Coulter; IM0817	1:5000
Peroxidase [GAMPO]		
Goat F(ab')2 Fragment Anti-Rabbit IgG (H+L)-	Beckman Coulter; IM0831	1:5000
Peroxidase [GARPO]		

F(ab')2 Fragment, zwei Antigen-bindende Fragmente; IgG, Immunglobulin G; H, *heavy chain*; L, *light chain*; Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland. Antikörper-Verdünnung in 2% Trockenmilch/1x PBS.

3.9. Quantitative Analyse der RNA-Expression

Um die Auswirkungen der Behandlungen auf die RNA-Expression exemplarisch zu untersuchen, wurden die Zellen der T1495-Linie zunächst in einer Dichte von $5x10^3$ Zellen pro cm² ausplattiert und am Folgetag mit 100 μ M TMZ behandelt und 20 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden an den Tagen d3 bis d5 geerntet. Die Behandlungsreihe wurden einmalig durchgeführt. Für die Charakterisierung der SLGC-Linien und Klone wurden Zellpellets im Rahmen der fortlaufenden Passagierung gewonnen.

Für die Isolierung der RNA wurde das RNeasy-Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) entsprechend der Anleitung des Herstellers eingesetzt. Zum Scheren der im Lysat vorhandenen, genomischen DNA wurde eine Kanüle verwendet. Sowohl die RNA-Bindung als auch die Reinigung und Elution erfolgte nach Herstellerangaben.

Um DNA-Verunreinigungen in der RNA-Probe zu eliminieren, wurde ein DNase I-Verdau durchgeführt. Dazu wurde das Eluat mit DNase I (1µl; 2 U/µl, Ambion, Darmstadt, Deutschland) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde anschließend mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion von Proteinkontaminationen gereinigt und in Ethanol präzipitiert (mindestens 30 min bei -20°C). Das RNA-Präzipitat wurde mit 90% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur bis zum Verdampfen der Ethanolrückstände getrocknet und in RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (Helios Omega UV-Vis Photometer, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) bei $\lambda = 260$ nm bestimmt.

Zur cDNA-Synthese wurde das *First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* von Roche (Mannheim, Deutschland) verwendet. Dafür wurde die RNA zunächst auf 100 ng/µl verdünnt, für 10 min bei 65°C denaturiert und auf 4°C abgekühlt. Es wurden 18 µl Master-Mix (Tab. 8) und 2 µl denaturierte RNA eingesetzt. Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200, GMI, Ramsey, Massachusetts, USA) wie folgt: 20 min bei 25°C, 60 min bei 42°C, 5 min bei 94°C, Abkühlen auf 4°C.

Die synthetisierte cDNA wurde 1:5 mit DEPC- (Diethylpyrocarbonat-) behandeltem Wasser verdünnt und für die quantitative Real-Time PCR (*polymerase chain reaction*, qRT-PCR) eingesetzt. Hierzu wurden 20 µl Master-Mix (Tab. 9; qPCR Core Kit for Sybr® Green I, Eurogentec, Köln, Deutschland) sowie 5 µl verdünnte cDNA verwendet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 10 zusammengestellt. In der Regel wurden pro Probe Triplikate pipettiert. Die qRT-PCR wurde im Thermocycler i-Cycler unter Verwendung des My iQ[™] Single Color Real-Time PCR Detektionssystems (Biorad, München, Deutschland) durchgeführt. Die initiale Denaturierung erfolgte für 3 min bei 94°C. Anschließend wurden die Proben pro Zyklus für 15 sec bei 94°C denaturiert, auf die Annealing-Temperatur der Primerpaare abgekühlt sowie für 30 sec inkubiert und abschließend für 30 sec bei 72°C inkubiert, sodass die DNA-Synthese stattfinden kann. Dieser Zyklus wurde 39-mal wiederholt. Zur Auswertung wurde die Software iQ5 (Biorad) verwendet. Es wurde die Expression stammzellassoziierter mRNAs im Verhältnis zur Expression von drei "Haushaltsgenen" unter Verwendung der Formel *relative Expression* = 2^{-Δct} analysiert.

Tab. 8: Master-Mix für die cDNA-Synthese.

Komponenten	Volumen pro Reaktion
DEPC-behandeltes Wasser	7,2 μl
Random primer (1,6 µg/µl)	2,0 μl
MgCl ₂ (25 mM)	4,0 μl
dNTPs (je 10 mM)	2,0 μl
10x RT-Puffer	2,0 μl
RNAsin (50 U/μl)	1,0 µl
AMV-Reverse Transkriptase (20-25 U/µl)	0,8 μl

DEPC, Diethylpyrocarbonat; MgCl₂, Magnesiumchlorid; dNTP, Desoxyribonukleosidtriphosphat; RT, reverse Transkription; RNAsin, RNase-Inhibitor; U, Enzymeinheit; AMV, *avian myeoloblastosis virus*.

Tab. 9: Master-Mix für die quantitative Real-Time PCR.

Komponenten	Volumen pro Reaktion
Nuklease-freies Wasser	12,625 μl
Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)	0,75 μl
Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)	0,75 μl
dNTPs (je 5 mM)	1,0 μl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μl
10x qRT-Puffer	2,5 μl
SYBR Green	0,75 μl
Hot Gold Star (5 U/µl)	0,125 μl

PCR, *polymerase chain reaction*; dNTP, Desoxyribonukleosidtriphosphat; qRT, quantitative Real-Time PCR; U, Enzymeinheit.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur
sox2	V: 5'-GCT CGC AGA CCT ACA TGA AC-3'	60°C
	R: 5'-CTC TGG TAG TGC TGG GAC AT-3'	
oct3/4	V: 5'-GAG TAG TCC CTT CGC AAG C-3'	58°C
	R: 5'-CAC CTG GAG GGG GCG AG-3'	
nanog	V: 5'-AAA TAC CTC AGC CTC CAG CA-3'	56°C
	R: 5'-CTG GAT GTT CTG GGT CTG GT-3'	
с-тус	V: 5'-AGC AGC TCG CCC AAG TC-3'	60°C
	R: 5'-GCG GTG TCT CCT CAT GG-3'	
cd133	V: 5'-GCT CCC TGT TGC TGC TGG-3'	60°C
	R: 5'-TTG TTG CAG GCA ATT CAT AAT TC-3'	
gapdh	V: 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3'	60°C
	R: 5'-GGA AGA TGG TGA TGG GAT TT-3'	
18S rRNA	V: 5'-AGT CCC TGC CCT TTG ACA CA-3'	60°C
	R: 5'-GAT CCG AGG GCC TCA CTA AAC-3'	
ubc	V: 5'-ATT TGG GTC GCG GTT CTT G-3';	60°C
	R: 5'-TGC CTT GAC ATT CTC GAT GGT-3'	

Tab. 10: Primer für die quantitative Real-Time PCR.

*sox*2, Gen für *sex determining region Y-box* 2; *oct3/4*, Gen für *octamer-binding transcription factor* 3/4; *gapdh*, Gen für Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase; *cd133*, Gen für *cluster of differentiation* 133/ Prominin 1; *rRNA*, Gen für ribosomale RNA; *ubc*, Gen für Ubiquitin C Ligase; V, Vorwärtsprimer; R, Rückwärtsprimer; A, C, G, T, Basen der DNA, Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin. Alle Primer wurden von Eurofins (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

3.10. Analyse der Promotormethylierung

Zur Isolierung der genomischen DNA wurde das DNeasy Blood and Tissue – Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden in 1x PBS resuspendiert. Danach wurde sowohl Proteinase K (im Kit enthalten) als auch AL-Puffer (im Kit enthalten) zur Zellsuspension gegeben und die Zellen für 1 h bei 56°C inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangaben. Unter Verwendung von 100 μ l AE-Puffer (im Kit enthalten) wurde die DNA von der Säule eluiert. Die DNA-Konzentration wurde zunächst photometrisch (Helios Omega UV-Vis Photometer, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) bei $\lambda = 260$ nm bestimmt. Zudem wurde eine zweite Bestimmung der DNA-Konzentration durchgeführt, bei der die isolierte DNA gelelektrophoretisch in einem Ethidiumbromid-haltigen TBE-Agarose-Gel (TBE, Tris-base, Borsäure, EDTA; 0,5% Agarose) aufgetrennt wurde. Anschließend wurde das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid unter Verwendung von UV-Licht am ChemiDoc XRS mit der Software Quantity One (Version 4.6.2, Biorad, München, Deutschland) detektiert, sodass in Relation zu einer Referenzprobe die DNA-Konzentration bestimmt werden konnte.

Zur Modifizierung der DNA wurde das CpGenome[™] DNA Modification Kit (S7820, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Es wurde 1 µg genomische DNA pro Reaktion eingesetzt. Zunächst fand eine Denaturierung der DNA im basischen Milieu statt, gefolgt von einer Sulfonierung im sauren Milieu, bei der Hydrogensulfit-Ionen mit unmethylierten Cytosinresten der DNA reagierten (Huang et al., 2010). Anschließend kam es zu einer Desaminierung im modifizierten Cytosinrest, sodass ein Uracilsulfonat entstand (Huang et al., 2010). Im letzten Schritt kam es im basischen Milieu zu einer Desulfonierung, sodass das Uracilsulfonat zu Uracil umgewandelt wurde (Huang et al., 2010). Die Modifizierung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Elution der modifizierten DNA von den GlasmilchSilikat *beads* erfolgte in 25 µl DEPC-behandeltem Wasser (Ambion[™], Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). Um die Effizienz der Elution zu erhöhen, wurden die Proben für 15 min bei 50°C inkubiert.

Somit resultierte die Modifizierung in einer Umwandlung von Cytosin in Uracil, nicht aber im Fall von methyliertem Cytosin. Der Nachweis eines methylierten oder unmethylierten Promotors erfolgte über die methylierungsspezifische PCR (MSP), bei der zwei verschiedene Primerpaare eingesetzt werden. Dabei ist ein Primerpaar spezifisch für die methylierte Promotorregion, das andere für die unmethylierte Region. Abschließend wird die Relation der PCR-Produkte, die mit den beiden Primerpaaren erhalten wurden, zueinander über ein Ethidiumbromid-haltiges TBE-Agarose-Gel (2% Agarose) bestimmt (siehe oben).

Für die MSP wurden 19 µl Master-Mix (siehe Tab. 11) und 1 µl modifizierte DNA eingesetzt. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200, GMI, Ramsey, Massachusetts, USA, oder T100[™] Thermal Cycler, Biorad, München, Deutschland). Initial wurde die modifizierte DNA für 3 min bei 94°C denaturiert. Anschließend folgten 40 – 45 Zyklen, die aus einer Phase der DNA-Denaturierung (45 sec bei 94°C), des Annealings der Primerpaare (45 sec, Temperatur siehe Tab. 12) und der DNA-Synthese (45 sec bei 72°C) bestanden. Im letzten Schritt gab es eine 10-minütige Synthesephase bei 72°C.

Tab. 11: Master-Mix für die methylierungsspezifische PCR.

Komponenten	Volumen pro Reaktion
Nuklease-freies Wasser	16,5 μl
dNTPs (je 10 mM)	0,5 μl
Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)	0,4 μl
Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)	0,4 μl
10x Polymerase-Puffer	2,0 μl
Taq Polymerase (5 U/μl)	0,2 μΙ

PCR, *polymerase chain reaction*; dNTP, Desoxyribonukleosidtriphosphat; U, Enzymeinheit. dNTPs, Polymerase-Puffer und Taq Polymerase wurden von Peqlab (Erlangen, Deutschland) bezogen.

Tab. 12: Primer für die methylierungsspezifische PCR.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur
M ^{Sox2}	V: 5'-TGT TTA TTT ATT TTT TTC GAA AAG GCG G-3'	55°C
	R: 5'-GAA CCC AAC CTC GCT ACC GAA-3'	
U ^{Sox2}	V: 5'-TGT TTA TTT ATT TTT TTT GAA AAG GTG-3'	55°C
	R: 5'-CTC AAA CCC AAC CTC ACT ACC AA-3'	
M ^{Oct3/4}	V: 5'-CGG GAT ATT TGG TTT CGG ATT TC-3'	58°C
	R: 5'-CCC ACA AAA CTC ATA CGA CGA-3'	
U ^{Oct3/4}	V: 5'-TGG GAT ATT TGG TTT TGG ATT TT-3'	60°C
	R: 5'-CCC CAC AAA ACT CAT ACA ACA AA-3'	

M, Primer spezifisch für den methylierten Promotor; U, Primer spezifisch für den unmethylierten Promotor; Sox2, *sex determining region Y-box 2*; Oct3/4, *octamer-binding transcription factor 3/4*; V, Vorwärtsprimer; R, Rückwärtsprimer; A, C, G, T, Basen der DNA, Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin. Alle Primer wurden von Eurofins (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

3.11. In vivo-Analysen

Die *in vivo*-Analysen erfolgten in einer Kooperation mit den Kollegen der AG. Dabei wurden sowohl die Xenotransplantation als auch die Opferung der Mäuse und die Entnahme der Gehirne von Kollegen durchgeführt. Meine Aufgaben umfassten die Vorbereitung der Zellen für die Inokulation und die spätere Untersuchung der Gehirne mittels HE (Hämalaun- und Eosin-Färbung) und Immunhistologie. Die Analyse der Gehirne führte ich zum Teil mit Unterstützung einer MTA durch.

Die Zellen, die entweder unbehandelt waren oder am Vortag mit 5 Gy bestrahlt wurden, wurden wie oben beschrieben geerntet, dreimal mit 1x PBS gewaschen und in N-Medium auf eine Konzentration von 5x10⁴ Zellen/µl verdünnt. In der Regel wurden 1x10⁵ und/oder 2x10⁵ Zellen in die rechte Hemisphäre 6 – 7 Wochen alter, weiblicher SCID- (*severe combined immunodeficiency*) Mäuse inokuliert. Die Xenotransplantation und Opferung der Tiere erfolgte nach den Richtlinien des Rats der Europäischen Gemeinschaft (Direktive 86/609/EEC) bzw. der Europäischen Union (Direktive 2010/63/EU) mit Genehmigung des Ministeriums für Landwirtschaft, Umwelt und Verbraucherschutz Schleswig-Holstein (Kiel; V242-72241.122-13[77-8/08]). Die Tiere wurden nach 12 Wochen (im Fall der T1338-Klone 24 Wochen) nach Vorgaben der Leitung der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck (Leiter Dr. med. vet. B. Schmelting) fachgerecht abgetötet. Unmittelbar danach erfolgte die Entnahme und Präparation der Gehirne durch die Kollegen der AG. Die präparierten Gehirne wurden über Nacht in 4% Paraformaldehyd fixiert und am Folgetag in 70% Ethanol überführt. Die weitere Bearbeitung der Präparate führte ich wie unten beschrieben durch.

Die fixierten Mäusegehirne wurden an der Einstichstelle quer in zwei Teile geschnitten. Beide, das anteriore und posteriore Teilstück, wurden in Paraffin eingebettet. Die notwendigen Arbeitsschritte wurden an der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des UKSH, Campus Lübeck (Direktor Prof. Dr. D. Zillikens), durchgeführt. Dabei wurde das im Routinebetrieb eingesetzte Gerät Leica ASP 300S (Wetzlar, Deutschland) verwendet. Zunächst wurden die Gehirne schrittweise entwässert und danach mit Paraffin versetzt. Die eingebetteten Gehirnhälften wurden mit dem Mikrotom Leica RM2245 (Wetzlar, Deutschland) geschnitten. Es wurden 4,5 µm Schnitte angefertigt und auf Glasobjektträger gezogen. Die Fertigung der Präparate erfolgte nach einem festen Schema, bei dem pro Region, beginnend an der Schnittfläche, zehn Gewebeschnitte pro Gehirnhälfte gewonnen wurden. Anschließend wurden etwa 100 µM Gewebe verworfen, bevor aus der nächsten Region Gewebeschnitte gewonnen wurden. Zudem wurde nicht das gesamte Gehirn durchgeschnitten, sondern ausgehend von der Einstichstelle etwa 1 mm in die anteriore und posteriore Richtung.

Für die HE-Färbung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Schnitte zuerst in Xylol entparaffiniert und im Anschluss in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Das Gewebe wurde für 15 min in Hämalaun gefärbt, für 10 – 15 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und 2 min in Eosin gefärbt. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde das Gewebe wieder entwässert und abschließend für 10 min in Xylol inkubiert. Die Schnitte wurden mit Entellan[®] Neu (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) eindeckt. Für die Analysen der HE-Färbungen wurden ein 2x Objektiv sowie die Hellfeld-Funktion des Fluoreszenzmikroskops Biozero BZ-8000 von Keyence (Neu-Isenburg, Deutschland) und die Software BZ 9000 Viewer (Keyence) verwendet.

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden die Schnitte wie oben beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte in 1x PBS gewaschen bevor sie für 15 min im Schnellkochtopf in Citratpuffer [9 ml 0,1 M Zitronensäure, 41 ml 0,1 M Natriumcitrat, 450 ml Aqua dest.] demaskiert wurden. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Präparate zweimal mit 1x PBS gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden mit einem "Fettstift" (DAKO PEN (Dako,
Hamburg, Deutschland)) umrandet und 25 µl Antikörper-Mix [1x PBS, 10% FCS, 0,04% Natriumazid + Antikörper] auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Tab. 13) erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS der Fluorochrom-gekoppelte, sekundäre Antikörper (Tab. 13) auf die Schnitte gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal mit 1x PBS gewaschen und die Zellkerne für 10 min mit DAPI (0,25 µg pro µl 1x PBS; Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt. Schließlich wurden die Schnitte erneut gewaschen und mit Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, USA) eingedeckt. Die mikroskopischen Analysen wurden mit einem 20x Objektiv am Fluoreszenzmikroskop Biozero BZ-8000 von Keyence (Neu-Isenburg, Deutschland) unter Verwendung der Software BZ Viewer 9000 (Keyence) durchgeführt. Um fokussierte Bilder der immunhistologischen Färbungen zu erhalten, wurde die z-Stack-Funktion verwendet und die Daten mit der Software BZ Analyzer (Keyence) verarbeitet.

Antikörper	Ouelle	Hersteller: Bestellnummer	Verdünnung
Next	Maura		1.100
anestin	iviaus	Millipore; MAB5326	1:100
αSox2	Kaninchen	Cell Signaling; #3579	1:100
αStem121	Maus	Stemcells Inc.; AB-121-U-050	1:100
αKu80	Kaninchen	Cell Signaling; #2180	1:100
lphaMaus DyLight®	Ziege	Thermo Fisher Scientific; 35502	1:400
α Kaninchen Cy3	Ziege	Jackson ImmunoResearch; 111-165-003	1:300

Tab. 13: Antikörper für die immunhistologische Analyse.

α, Symbol für Antikörper; Sox2, *sex determining region Y-box* 2; Cy3, Cyanin 3; Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland; Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA; Stemcells Inc., Newark, Kalifornien, USA; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA.

3.12. Statistik

Im Fall des MTT-Assays wurden die Mittelwerte aus 16 bzw. 24 parallelen Einzelwerten sowie die Standardabweichungen bestimmt. Zum statistischen Vergleich der verschiedenen Behandlungsmodalitäten wurde ein *One-way ANOVA* mit anschließendem *Tukey post test* durchgeführt um alle Behandlungen auch untereinander zu vergleichen. Das Signifikanzniveau betrug 5%.

Bei den qRT-PCR-Analysen wurden Triplikate untersucht, deren Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt wurden. Wie für die MTT-Assays wurde für die statistische Auswertung der qRT-PCR-Analysen eine *One-way ANOVA*-Statistik mit einem Signifikanzniveau von 5% und anschließendem *Tukey post test* durchgeführt. Da jedoch die Anzahl der Einzelwerte gering war, ist die Aussagekraft des statistischen Tests womöglich eingeschränkt.

Für alle Daten, die aus Western blot-, durchflusszytometrischen sowie MSP-Analysen stammten, wurde aufgrund geringer Fallzahlen und experimenteller Variationen keine Statistik durchgeführt. Dabei waren besonders Veränderungen der Zellqualität (z.B. der Aggregatbildung der Zellen) kritisch. Daher sind Serien nur miteinander vergleichbar. Aus diesen Gründen wurde aufgrund empirischer Daten des Labors ein systematischer Fehler von 10% angenommen.

Im Fall der immunzytologischen Analysen wurden zwar stets zehn repräsentative Mikrofotographien gezählt, allerdings war die Zellzahl insbesondere nach der Doppelbehandlung sehr gering. Auf einigen Mikrofotographien waren wenige Zellen zu detektieren, während andere Areale deutlich mehr Zellen aufwiesen. Zudem war eine höhere Variation der Signalstärke insbesondere in Arealen mit wenigen Zellen im Vergleich zu Arealen mit vielen Zellen zu beobachten. Aus diesen Gründen wurde nicht die Variation der Zellzahl, sondern ein systematischer Fehler von 10% angegeben und keine statistische Auswertung durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Zelluläre und molekulare Heterogenität

Im ersten Teil dieser Arbeit lag der Fokus auf der zellulären und molekularen Heterogenität von SLGC-Linien. Um Hinweise auf eine Heterogenität von SLGC-Linien zu erhalten, wurde die Expression der stammzellassoziierten Faktoren Sox2, Oct3/4, Nanog, FABP7, Musashi und PAX6 in SLGC-Linien und davon abgeleiteten Klonen untersucht. Zusätzlich wurde in den SLGC- und Klonlinien der Anteil CD133positiver Zellen bestimmt, dessen Bedeutung als Gliomstammzellmarker in der Literatur kontrovers diskutiert wird (Bao et al., 2006; Bidlingmaier et al., 2008; Chen et al., 2010; Clément et al., 2009; Schonberg et al., 2014; Singh et al., 2003; Zhang und Li, 2010). Als Differenzierungsmarker wurden GFAP (glial), Tau (neuronal) und CD31 (endothelial) analysiert. Um das Vorhandensein einer molekularen Heterogenität in den SLGC-Linien zu prüfen, wurde in SLGC-Linien und davon abgeleiteten Klonen die Expression von EGFR, PDGFR α und β sowie PTEN untersucht.

4.1.1. Sox2-Expression

Die Sox2-Expression wurde sowohl auf Proteinebene mittels Western blot-Analyse als auch auf Transkriptionsebene mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) untersucht. In Abbildung 5 ist zu erkennen, dass alle Klonkulturen Sox2-Protein und *sox2*-mRNA exprimierten. Die Sox2-Expression der jeweiligen Mutterkultur wurde auf 1 normiert. Die Mutterkultur entspricht der Ursprungskultur, die sich vom Tumorgewebe ableitet und als Ausgangspunkt für die klonale Expansion diente. Erste Analysen bezüglich der Sox2-Expression von Klonkulturen der SLGC-Linien T1452 und T1495 hatte ich im Rahmen meiner Masterarbeit (2012) durchgeführt. Die Daten sind in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt.

In acht von elf T1338-Klonen war die Sox2-Proteinexpression im Vergleich zu der der Mutterkultur um mindestens das 2-Fache erhöht (Abb. 5 A, links, und Anhang Abb. 75). Hierbei wiesen die Klone T1338 cl1, cl4 und cl7 die höchste Sox2-Expression auf. Diese war um das 4-Fache höher als in der Mutterkultur. Das Sox2-Level von fünf Klonen war zwei- bis dreimal höher als das der Mutterkultur (T1338 cl2: 2x; cl5: 2,6x; cl9: 2,9x; cl10: 2,4x; cl11: 2,4x). Die Klone T1338 cl3 und cl8 wiesen eine um 50% (cl3) bzw. 70% (cl8) erhöhte Sox2-Expression auf. Der Klon T1338 cl6 war der einzige Klon, der ein ähnliches Sox2-Level wie die Mutterkultur aufwies.

Alle Klone der T1440-Linie wiesen im Vergleich zur Mutterkultur eine um mindestens 50% reduzierte Sox2-Expression auf (Abb. 5 A, mittig). Das Sox2-Level war in den Klonen T1440 cl5-1 und cl5 im Vergleich zu dem der Mutterkultur um 50% (cl5-1) bzw. 55% (cl5) geringer, in Klon T1440 cl4 um zwei Drittel. Der Klon T1440 cl8 zeigte die geringste Sox2-Expression. Diese war 80% geringer als die Sox2-Expression der Mutterkultur.

Unter den T1464-Klonen gab es zwei Klone, die mehr Sox2 als die Mutterkultur exprimierten (Abb. 5 A, rechts). Das Sox2-Level war in Klon T1464 cl18 um das 2-Fache erhöht und in Klon T1464 cl6 um 60%. Die Klone T1464 cl8 und cl21 wiesen eine Sox2-Expression auf, die derjenigen der Mutterkultur ähnelte. Die Sox2-Expression war in Klon T1464 cl27 relativ zu der der Mutterkultur um 25% reduziert. Die Klone T1464 cl1, cl11 und cl16 wiesen eine deutlich schwächere Sox2-Expression auf. Hier waren die Level relativ zu dem der Mutterkultur um 75% (cl1), 90% (cl11) und 65% (cl16) geringer.



Abb. 5: Sox2-Protein- und sox2-mRNA-Expression in SLGC-Klonen. (A) Die Sox2-Proteinexpression wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Ein systematischer Fehler von 10% ist angegeben. (B) Die sox2-mRNA-Expression wurde gegen die Expression von drei Referenzgenen (gapdh, ubc, 18S r-rna) normalisiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte eines Triplikats von Reaktionen und die Standardabweichungen. Statistisch signifikante Abweichungen der Klonkulturen (cl) relativ zur Mutterkultur (Mc) sind gekennzeichnet [ns, nicht signifikant; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001]. Die relativen Sox2-Expressionen wurden auf die der jeweiligen Mutterkultur normiert, die als 1 definiert wurde. – Sox2, sex determining region Y-box 2; p, Passage; SLGC, stem-like glioma cell; gapdh, Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase; Ubiquitin ubc, Ligase С; r-rna, ribosomale Ribonukleinsäure.

Insgesamt führte die klonale Expansion nicht generell zu einer Anreicherung von Zellen mit einem hohen Sox2-Level. Im Fall der T1338-Linie überwogen Klone, die mehr Sox2 als die Mutterkultur exprimierten, hingegen wiesen alle T1440-Klone eine geringere Sox2-Expression auf und im Fall von T1464 wurde annähernd die gleiche Anzahl von Klonen mit ähnlicher, höherer bzw. geringerer Sox2-Proteinexpression identifiziert.

Die *sox2*-mRNA-Expression variierte zwischen den T1338-Klonen im Vergleich zur Proteinexpression weniger stark (vergleiche Abb. 5 A und B, jeweils links). Es gab drei Klone (T1338 cl1, cl3 und cl5), deren *sox2*-Expression im Vergleich zur Mutterkultur um mehr als das Doppelte erhöht war (Abb. 5 B, links). Hierbei war die *sox2*-Expression in den Klonen T1338 cl1 und cl5 signifikant um etwa das 2-Fache erhöht, in Klon T1338 cl3 signifikant um das 2,6-Fache. Die Klone T1338 cl2 (+80%), cl6 (+40%), cl7 (+80%) und cl9 (+90%) wiesen relativ zur Mutterkultur ebenfalls signifikant erhöhte *sox2*-Level auf. Die *sox2*-Expression der Klone T1338 cl8 und cl10 war der der Mutterkultur ähnlich, während die *sox2*-Expression der Klone T1338 cl4 und cl11 um 20% (cl4) bzw. 15% (cl11) geringfügig reduziert war.

Alle T1440-Klone zeigten im Vergleich zur Mutterkultur geringere *sox2*-Level (Abb. 5 B, mittig). Hierbei war das *sox2*-Level in den Klonen T1440 cl5 und cl4 signifikant um 25% (cl5) bzw. 40% (cl4) geringer, während die *sox2*-Expression der Klone T1440 cl5-1 und cl8 deutlich stärker reduziert war (cl5-1: -85%; cl8: -90%).

Auch im Fall von T1464 wiesen alle Klone im Vergleich zur Mutterkultur signifikant geringere *sox2*-Expressionen auf (Abb. 5 B, rechts). Die *sox2*-Level waren zwischen 15% (T1464 cl6) und 95% (T1464 cl11) geringer. Die *sox2*-Expression in den Klonen T1464 cl16, cl18 und cl27 war um 50% bis 55% reduziert. Die Klone T1464 cl1, cl8 und cl21 wiesen relativ zur Mutterkultur eine um 75% bis 80% geringere *sox2*-Expression auf.

Insgesamt ließ sich auch hier keine allgemeingültige Aussage bezüglich der *sox2*-Expression der Klone im Vergleich zur Mutterkultur treffen. Im Fall von T1440 und T1464 zeigten alle Klone eine signifikant geringere *sox2*-Expression, wohingegen sieben der elf T1338-Klone eine im Vergleich zur Mutterkultur signifikant erhöhte *sox2*-Expression aufwiesen. Hierbei waren die *sox2*-mRNA-Level weniger stark erhöht als die Sox2-Proteinlevel. Zudem ließ sich nicht in allen Klonen eine Korrelation zwischen der Menge an *sox2*-Transkript und Sox2-Protein feststellen. Beispiele für eine positive Korrelation sind T1338 cl2 und cl5, T1440 cl8 sowie T1464 cl1, cl11 und cl16. Keine Korrelation zwischen dem *sox2*mRNA- und Sox2-Proteinlevel war für die Klone T1338 cl3, cl4 und cl11 sowie T1464 cl6, cl8, cl18 und cl21 zu beobachten.

<u>Fazit – Sox2 in Klonen</u>

Die Analysen der Sox2-Proteinlevel sowie der *sox2*-mRNA-Expressionen zeigten eine hohe, interklonale Variation der Expressionsstärke. Darüber hinaus ließ sich keine eindeutige Korrelation zwischen dem Sox2-Proteinlevel und der Expression der *sox2*-mRNA feststellen. Die Verteilung der Klone, die verglichen zur Mutterkultur mehr bzw. weniger Sox2 exprimierten, war zwischen verschiedenen SLGC-Linien unterschiedlich.

Zur Analyse der Tumorigenität wurden ausgewählte Klone in das Gehirn von SCID (*severe combined immunodeficiency*) – Mäusen xenotransplantiert. Die Bildung orthotoper Tumore wurde histologisch bestimmt. Dazu wurden Gewebeschnitte der fixierten Mäusegehirne sowohl mit HE als auch immunhistologisch mit den humanspezifischen Antikörpern α Ku80 und α Stem121 gefärbt. Zusätzlich erfolgten immunhistologische Färbungen mit einem Antikörper gegen Sox2. Das diente dazu die Sox2-Expression der SLGC-Klone *in vivo* zu beurteilen.



Abb. 6: Sox2-Expression humaner SLGC-Klone in orthotopen Tumoren. Mikrofotografien immunhistologischer Analysen. 4,5 µm Gewebeschnitte orthotoper Tumore in SCID-Mäusen, gefärbt mit α Stem121 (grün), α Sox2 (rot) und DAPI (blau). (Oben) Überlagerung aller Farbkanäle, (unten) ausschließlich Überlagerung des grünen und roten Farbkanals der gleichen Region. Messbalken, 50 µm. – Sox2, sex determining region Y-box 2; SLGC, stem-like glioma cell; SCID, severe combined immunodeficiency; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

Unter Verwendung des Stem121-Antikörpers konnten Zellen humanen Ursprungs in den Gewebeschnitten nachgewiesen werden (Abb. 6). Diese Zuordnung wurde mit einem zweiten, humanspezifischen Antikörper (α Ku80, für Beispiele siehe Anhang Abb. 76) bestätigt. Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, waren die Klone T1464 cl18, T1452 cl10 sowie T1440 cl4 in der Lage orthotope Tumore in SCID-Mäusen zu bilden. Hingegen waren im Fall von T1338 cl1 zwar einzelne, humane Zellen im Parenchym des Mäusegehirns zu finden, die jedoch über einzelne Areale nahe der Implantationsstelle verteilt waren und keine Tumore bildeten. Insgesamt waren 50% der untersuchten T1464-Klone in der Lage orthotope Tumore zu bilden, zwei Drittel der untersuchten T1440- und T1495-Klone (Beispiele in Abb. 6 und im Anhang Abb. 76). Dagegen konnten für die T1338-Klone in keinem Fall orthotope Tumore beobachtet werden (Abb. 6 und Anhang Abb. 77). Dabei fand die Opferung der Mäuse sogar drei Monate später als nach den Xenotransplantationen der T1440-, T1452-, T1464- und T1495-Klone statt. Im Fall der T1338-Klone waren lediglich überlebende Zellen sowie Zellansammlungen von wenigen, einzelnen Zellen zu erkennen. Damit verhielten sich die T1338-Klone ähnlich wie die T1338-Mutterkultur (Anhang Abb. 77).

Betrachtete man die Stärke der Sox2-Expression der einzelnen Zellen in den orthotopen Tumoren, so war festzustellen, dass die Expressionsstärke zwischen den Zellen verschiedener Klone variierte (Abb. 6). Hierbei zeigten die Zellen des Klons T1440 cl4 im orthotopen Tumor eine gleichmäßige Sox2-Expression, während das Sox2-Level der Zellen des Klons T1452 cl10 variierte. Etwa ein Fünftel der Zellen wies eine starke Sox2-Expression auf, in einem weiteren Fünftel der Zellen war kein Sox2-Signal detektierbar. Die restlichen Zellen zeigten eine graduelle Abstufung der Sox2-Expression. Die Verteilung der stark Sox2-positiven Zellen erschien im orthotopen Tumor eine starke Sox2-Expression, die nur lokal in Inseln auftrat (Abb. 6 und Abb. 78). Im Vergleich dazu wies die Mehrheit der Zellen des Klons T1464 cl18 im orthotopen Tumor eine starke Sox2-Expression auf. Alle Zellen des Klons T1338 cl1, die mit dem Antikörper α Stem121 nachgewiesen wurden, zeigten eine starke Sox2-Expression.

Im Fall der Klone T1452 cl10 und T1464 cl18 wurden Stem121-positive Zellen im Mäusegehirn detektiert, die ein unterschiedliches Sox2-Level aufwiesen, während die Sox2-Expression in Stem121-positiven Zellen der Klone T1440 cl4 und T1338 cl1 homogen war.

Zur Untersuchung der Stabilität der Sox2-Expression über die Zeit wurden verschiedene Passagen gleicher Klone hinsichtlich ihrer Sox2-Protein- und *sox2*-mRNA-Expression mittels Western blot und qRT-PCR analysiert.

Vier von fünf T1338-Klonen zeigten einen Anstieg der Sox2-Proteinexpression über die Passagen (Abb. 7, links, und Anhang Abb. 75). Hierbei stieg das Sox2-Level in den Klonen T1338 cl2 und cl6 nach acht bzw. sieben Passagen um 40% bzw. um das 3-Fache. Anschließend blieb das Sox2-Level über die folgenden sieben Passagen unverändert. In den Klonen T1338 cl7 und cl8 kam es zu einem stetigen Anstieg der Sox2-Expression über die Passagen. Dabei nahm die Sox2-Expression in Klon T1338 cl7 nur geringfügig zu (über 15 Passagen: +30%), während das Sox2-Level in Klon T1338 cl8 deutlich stärker anstieg (über sieben Passagen: +50%; weitere zehn Passagen: +120%). Nur der Klon T1338 cl9 zeigte innerhalb von sechs Passagen eine Reduktion der Sox2-Expression um 70%.



Abb. 7: Stabilität der Sox2-Protein-Expression in SLGC-Klonen über die Passagen. Die Sox2-Proteinexpression wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Ein systematischer Fehler von 10% ist angegeben. Die relativen Sox2-Expressionen wurden auf die der jeweiligen Mutterkultur normiert, die als 1 definiert wurde. Messwerte für ein und denselben Klon sind im gleichen Farbton dargestellt. – Sox2, sex determining region Y-box 2; p, Passage; SLGC, stemlike glioma cell.

Zwei von vier T1440-Klonen wiesen eine stetige Zunahme der Sox2-Expression über die Passagen auf (Abb. 7, mittig). Der Klon T1440 cl4 zeigte zunächst einen geringen Anstieg des Sox2-Levels um 20% über zehn Passagen, gefolgt von einem 2,5-fachen Anstieg über die folgenden 13 Passagen. In Klon T1440 cl8 stieg die Sox2-Expression über neun Passagen um das 2-Fache und über die folgenden 20 Passagen um weitere 50%. Die Sox2-Expression zeigte in Klon T1440 cl5 über neun Passagen einen Anstieg um 90%, gefolgt von einer drastischen Reduktion des Sox2-Levels über 18 Passagen auf ein Viertel. Über 22 Passagen zeigte der Klon T1440 cl5-1 eine sehr starke Reduktion der Sox2-Expression um 90%.

Zwei von vier T1464-Klonen zeigten einen Anstieg der Sox2-Expression über die Passagen (Abb. 7, rechts). In Extrakten von Klon T1464 cl1 und cl6 stieg die Sox2-Expression um das 2,4-Fache (cl1; über neun Passagen) bzw. um 40% (cl6; über elf Passagen). Die Sox2-Expression von Klon T1464 cl18 veränderte sich kaum über 13 Passagen (-15%). Über neun Passagen blieb das Sox2-Level von T1464 cl21 unverändert.

Insgesamt wies mehr als die Hälfte der Klone einen Anstieg der Sox2-Expression über die Passagen auf. Dabei stieg die Sox2-Expression in wiederum der Hälfte dieser Klone um mehr als das 2-Fache. Der andere Teil der untersuchten Klone wies eine Reduktion der Sox2-Expression über die Passagen auf. Nur in einem Klon (T1464 cl21) blieb das Sox2-Level unverändert.

Die Expression der *sox2*-mRNA der T1338-Klone wurde in drei von fünf Klonen und der Mutterkultur über die Passagen signifikant reduziert (Abb. 8, links). In Klon T1338 cl2 reduzierte sich die *sox2*-Expression über acht Passagen signifikant um 30% und blieb über die folgenden sieben Passagen unverändert, wohingegen es in Klon T1338 cl7 zu einer signifikanten, stetigen Reduktion über die Passagen kam (über acht Passagen: -35%; über weitere sieben Passagen: -35%). Auch in Klon T1338 cl9 war eine starke, signifikante Reduktion der *sox2*-Expression über sieben Passagen um 75% festzustellen. In der T1338-Mutterkultur wurde die *sox2*-Expression über 38 Passagen signifikant um 97% reduziert. Im Gegensatz dazu wies Klon T1338 cl6 zunächst über acht Passagen keine Veränderung des *sox2*-mRNA-Levels auf, während über die nachfolgenden sechs Passagen die *sox2*-Expression signifikant um 25% stieg. Der Klon T1338 cl8 wies über die Passagen eine Variation der *sox2*-Expression

auf. Zunächst reduzierte sich das *sox2*-Level über sechs Passagen gering um 15% und stieg über die folgenden elf Passagen signifikant um 50% an.

Zwei der vier T1440-Klone zeigten eine signifikante, zunehmende Reduktion der *sox2*-Expression über die Passagen (Abb. 8, mittig). In Klon T1440 cl4 wurde das *sox2*-Level über zwölf Passagen signifikant um 35% und über die folgenden elf Passagen um 10% reduziert. Der Klon T1440 cl5 wies über elf Passagen eine signifikante Reduktion um 40% auf, gefolgt von einer weiteren, signifikanten Reduktion um 35% über 16 Passagen. Im Gegensatz dazu wies Klon T1440 cl5-1 einen stetigen Anstieg der *sox2*-Expression auf. Über zwölf Passagen stieg das *sox2*-Level signifikant um das 2,8-Fache und nach weiteren zehn Passagen um zusätzliche 30%. Die *sox2*-Expression variierte in Klon T1440 cl8 über die Passagen. Zunächst kam es zu einem starken, signifikanten Reduktion um 65% über die folgenden 18 Passagen.



Abb. 8: Stabilität der *sox2*-mRNA-Expression in SLGC-Klonen über die Passagen. Die *sox2*-mRNA-Expression wurde gegen die Expression von drei Referenzgenen (*gapdh, ubc,* 18S *r-rna*) normalisiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte eines Triplikats von Reaktionen sowie die Standardabweichungen. Statistisch signifikante Abweichungen sind mit ns, nicht signifikant, * = p < 0,05, ** = p < 0,01 bzw. *** = p < 0,001 markiert und die Bezugsgrößen durch Klammern gekennzeichnet. Die relativen *sox2*-Expressionen der Klonkulturen (cl) wurden auf die der jeweiligen Mutterkultur (Mc) normiert, die als 1 definiert wurde. Messwerte für ein und denselben Klon sind im gleichen Farbton dargestellt. – *sox2, sex determining region Y-box* 2; p, Passage; SLGC, *stem-like glioma cell; gapdh*, Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase; *ubc*, Ubiquitin Ligase C; *r-rna*, ribosomale Ribonukleinsäure.

Die Hälfte der T1464-Klone wiesen über die Passagen eine signifikante Reduktion der *sox2*-Expression auf (Abb. 8, rechts). In den Klonen T1464 cl6 und cl18 reduzierte sich das *sox2*-mRNA-Level über 13 Passagen signifikant um 30% (cl6) bzw. 60% (cl18), während der Klon T1464 cl21 einen Anstieg der *sox2*-Expression um 65% über sieben Passagen aufwies. Im Vergleich dazu stieg das *sox2*-Level über sieben Passagen in Klon T1464 cl1 nur minimal (+10%).

Insgesamt wies mehr als die Hälfte der Klone eine signifikante Reduktion der *sox2*-Expression über die Passagen auf. Dabei wurde das *sox2*-mRNA-Level in wiederum der Hälfte dieser Klone um mehr als 50% reduziert. Der andere Teil der untersuchten Klone wies einen Anstieg der *sox2*-Expression über die Passagen auf. Nur in einem Klon (T1464 cl1) blieb das *sox2*-Level nahezu unverändert.

Fazit – Veränderung von Sox2 in Klonen

Die Analysen zeigten Veränderungen der Sox2-Protein- sowie der *sox2*-mRNA-Expression mit zunehmenden Passagen. Diese waren zwischen den Klonen über den gleichen Messzeitraum unterschiedlich. Mehr als die Hälfte der Klone zeigte einen Anstieg der Sox2-Proteinexpression. Allerdings korrelierte die Variation des Sox2-Levels nur im Fall der Klone T1338 cl9, T1464 cl18 und bedingt T1338 cl6, T1440 cl5 und T1440 cl8 positiv mit der *sox2*-mRNA-Expression. Eine negative Korrelation war für die Klone T1338 cl7, T1440 cl 5-1, T1464 cl6 und bedingt für T1338 cl2 sowie T1440 cl4 festzustellen. Die Expressionsanalysen zeigten, dass Veränderungen der Sox2-Protein- und der *sox2*-mRNA-Expression nur in einem Sechstel der Klone eindeutig positiv korrelierten.

4.1.2. Transkriptionsfaktoren Oct3/4 und Nanog

Um den Stammzellcharakter der SLGC-Klone zu untersuchen, wurden neben der Sox2-Expression die mRNA-Level von *oct3/4* und *nanog* mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) bestimmt. Die qRT-PCR-Analysen der T1452- und T1495-Klone hatte ich im Rahmen meiner Masterarbeit (2012) durchgeführt. Die Daten werden in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt. Zusätzlich zur *oct3/4*-mRNA-Expression wurde der Methylierungsgrad des Oct3/4-Promotors mittels methylspezifischer PCR ermittelt.



Abb. 9: *oct3/4*-mRNA-Expression in SLGC-Klonen. Die *oct3/4*-mRNA-Expression wurde gegen die Expression von drei Referenzgenen (*gapdh, ubc,* 18S *r-rna*) normalisiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte eines Triplikats von Reaktionen und die Standardabweichungen. Statistisch signifikante Abweichungen der Klonkulturen (cl) relativ zur Mutterkultur (Mc) sind gekennzeichnet [ns, nicht signifikant; *, p < 0,05; ***, p < 0,001]. Die relativen Expressionen wurden auf die der jeweiligen Mutterkultur normiert, die als 1 definiert wurde. – *oct3/4, octamer-binding transcription factor* 3/4; p, Passage; SLGC, *stem-like glioma cell; gapdh*, Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase; *ubc*, Ubiquitin Ligase C; *r-rna*, ribosomale Ribonukleinsäure.

Die *oct3/4*-mRNA-Expression war in allen T1338-Klonen im Vergleich zur Mutterkultur ähnlich hoch oder geringer (Abb. 9 A, links). Hierbei gab es vier Klone, die weniger als die Hälfte an *oct3/4*-mRNA aufwiesen (T1338 cl2 (-55%), cl7 (-80%), cl8 (-75%), cl11(-60%); jeweils statistisch nicht signifikant). Die *oct3/4*-Level der Klone T1338 cl1, cl3, cl4 und cl10 waren im Vergleich zu dem der Mutterkultur zwischen 25% und 45% geringer. Die *oct3/4*-Expression der Klone T1338 cl5, cl6 und cl9 unterschied sich kaum von der der Mutterkultur.

Drei von vier T1440-Klone (T1440 cl4, cl5 und cl8) wiesen geringere *oct3/4*-Level als die Mutterkultur auf (Abb. 9 A, mittig). Hierbei war die *oct3/4*-Expression in den Klonen T1440 cl4 und cl8 zwischen 30%

und 35% geringer, in Klon T1440 cl5 um 45%. Nur in Klon T1440 cl5-1 war die *oct3/4*-Expression relativ zur Mutterkultur höher (+40%).

Im Gegensatz dazu zeigten alle T1464-Klone eine höhere *oct3/4*-Expression als die Mutterkultur (Abb. 9 A, rechts). In fünf von sieben Klonen war die *oct3/4*-Expression um mehr als das 2-Fache erhöht. Hierbei zeigte Klon T1464 cl21 relativ zur Mutterkultur die höchste *oct3/4*-Expression (signifikant 4-fach erhöht). In den Klonen T1464 cl1, cl8, cl11 und cl16 war das *oct3/4*-Level relativ zur Mutterkultur 2- bis 3-mal höher (signifikant nur im Fall von T1338 cl1 und cl8). Die Klone mit der geringsten *oct3/4*-Expression waren T1464 cl6 und cl18. In diesen Extrakten war das *oct3/4*-Level von Klon T1464 cl6 um 80% höher als das der Mutterkultur, das von Klon T1464 cl18 um 45%.

Insgesamt war nach der klonalen Expansion keine generelle Anreicherung von Zellen mit einem hohen *oct3/4*-mRNA-Level zu beobachten. Nur im Fall der T1464-Linie wiesen alle Klone eine höhere *oct3/4*-Expression als die Mutterkultur auf. Hingegen waren die *oct3/4*-Level in drei der vier T1440-Klone sowie im Fall von T1338 in acht von elf Klonen relativ zur Mutterkultur geringer.



Abb. 10: Methylierungsgrad des Oct3/4-Promotors in SLGC-Klonen. MSP-Analyse der *oct3/4-*Promotormethylierung unter Verwendung spezifischer Primer für den methylierten und den unmethylierten Promotor. Aufgetragen ist die relative Methylierung sowie ein systematischer Fehler von 10%. – *oct3/4, octamer-binding transcription factor* 3/4; Mc, Mutterkultur; SLGC, *stem-like glioma cell*; MSP, methylierungsspezifische PCR.

Die Gesamtmenge detektierter *oct3/4*-mRNA war in allen Klonen sehr gering. Somit stellte sich die Frage, ob dies mit der Methylierung des *oct3/4*-Promotors korrelierte. In Abbildung 10 sind die Daten zum Methylierungsgrad des *oct3/4*-Promotors in ausgewählten Klonen verschiedener SLGC-Linien zusammengestellt. Es ist zu erkennen, dass in allen Klonen eine *oct3/4*-Promotormethylierung von über 80% vorhanden war und es nur eine geringe Variation zwischen den Klonen gab. Somit wiesen alle SLGC-Klone eine Hypermethylierung des *oct3/4*-Promotors auf.

Alle Klone der T1338-Linie zeigten im Vergleich zur Mutterkultur eine ähnliche oder eine verminderte *nanog*-Expression (Abb. 11, links). In den Klonen T1338 cl2 und cl4 war das *nanog*-Level relativ zur Mutterkultur um mehr als die Hälfte signifikant reduziert (T1338 cl2: -55%; cl4: -65%). Die *nanog*-Expression der Klone T1338 cl5, cl6 und cl11 unterschied sich nur gering von der der Mutterkultur. Die *nanog*-Level der übrigen sechs untersuchten Klone waren verglichen zur Mutterkultur zwischen 20% und 50% reduziert (T1338 cl1: -50% (signifikant); cl3: -20%; cl7: -40% (signifikant); cl8: -40% (signifikant); cl9: -30%; cl10: -25%).



Abb. 11: *nanog*-mRNA-Expression in SLGC-Klonen. Die *nanog*-mRNA-Expression wurde gegen die Expression von drei Referenzgenen (*gapdh, ubc,* 18S *r-rna*) normalisiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte eines Triplikats von Reaktionen und die Standardabweichungen. Statistisch signifikante Abweichungen der Klonkulturen (cl) relativ zur Mutterkultur (Mc) sind gekennzeichnet [ns, nicht signifikant; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001]. Die relativen Expressionen wurden auf die der jeweiligen Mutterkultur normiert, die als 1 definiert wurde. – p, Passage; SLGC, *stem-like glioma cell*; *gapdh*, Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase; *ubc*, Ubiquitin Ligase C; *r-rna*, ribosomale Ribonukleinsäure.

Im Fall von T1440 zeigten alle Klone im Vergleich zur Mutterkultur ein signifikant geringeres *nanog*-Level (Abb. 11, mittig). Hierbei war in drei von vier Klonen die *nanog*-Expression um mehr als 50% reduziert (T1440 cl4: -60%; cl5: -65%; cl5-1: -55%). Der Klon T1440 cl8 wies relativ zur Mutterkultur eine um 45% reduzierte *nanog*-Expression auf.

Die *nanog*-Expression aller T1464-Klone war höher als die der Mutterkultur oder ähnlich hoch (Abb. 11, rechts). Vier der sieben Klone wiesen relativ zur Mutterkultur eine 2- bis 7,5-fach erhöhte *nanog*-Expression auf (T1464 cl1: 7,5x (signifikant); cl8: 2,5x; cl16: 7x (signifikant); cl21: 4x). Im Vergleich zur *nanog*-Expression der Mutterkultur war das *nanog*-Level in den Klonen T1464 cl6 und cl18 um 50% (cl6) bzw. 85% (cl18) erhöht. Nur die *nanog*-Expression von Klon T1464 cl11 unterschied sich kaum von der der Mutterkultur.

Insgesamt führte die klonale Expansion in zwei der drei SLGC-Linien (T1338 und T1440) zu einer Reduktion der *nanog*-Expression. Nur im Fall von T1464 kam es in den Klonkulturen zu einer Anreicherung von Zellen mit einem hohen *nanog*-mRNA-Level.

Fazit – oct3/4 und nanog in Klonen

Alle Klone wiesen sowohl eine *sox2-, oct3/4-* als auch eine *nanog*-Expression auf. Angenommen die drei Primerpaare arbeiteten gleich effizient, so war in allen SLGCs deutlich weniger *nanog-* und vor allem *oct3/4-*Transkript als *sox2-m*RNA vorhanden. Beim Vergleich der *sox2-, oct3/4-* und *nanog-*mRNA-Level war nicht in allen SLGCs eine eindeutige Korrelation zu erkennen. Im Falle von T1440, T1452 und T1495 korrelierte die *sox2-, oct3/4-* und *nanog-*Expression positiv, wohingegen im Fall von T1338 und T1464 eine negative Korrelation zwischen der *sox2-*Expression und der Expression von *oct3/4* und *nanog* festzustellen war.

4.1.3. Weitere stammzellassoziierte Faktoren

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Proteine FABP7, Musashi und PAX6 mit dem Stammzellcharakter von SLGCs assoziiert sind (Cox et al., 2013; Liu et al., 2012; Morihiro et al., 2013; Wang et al., 2014; Yasumoto et al., 2016; Zhou et al., 2005). Die Expression dieser drei Faktoren wurde auf Proteinebene mittels Western blot-Analysen bestimmt.

Die Abbildung 12 zeigt eine exemplarische Western blot-Analyse der Expression von Musashi, PAX6 und FABP7 in Klonen der SLGC-Linie T1495. Es ist zu erkennen, dass die FABP7-Expression zwischen den Klonen weniger variierte als die Musashi- und PAX6-Expression. Hier waren größere Unterschiede in der Expression vorhanden.



Abb. 12: Musashi-, PAX6- und FABP7-Expression in T1495-Klonen. Exemplarische Western blot-Analyse der Expression von Musashi, PAX6 und FABP7 in sechs Klonen (cl) der T1495-Linie. Aktin diente als Ladekontrolle. Die Signale wurden mittels Chemolumineszenz am ChemiDoc XRS mit der Software "Quantity One" detektiert. * kennzeichnet eine unspezifische Bande. – PAX6, *paired-box protein* 6; FABP7, *fatty acid binding protein* 7.

In Abbildung 13 ist die FABP7-, Musashi- und PAX6-Expression ausgewählter SLGC-Klone zusammengestellt. Alle Expressionslevel wurden auf das der jeweiligen Mutterkultur normiert, deren Expression als 1 definiert wurde. Um die Expression von FABP7, Musashi und PAX6 in Relation zur Sox2-Expression zu betrachten, wurden die Klone in Abbildung 13 nicht wie zuvor nach ihren Nummern aufgetragen. Die Reihenfolge der Klone in Abbildung 13 entspricht ihrer Sox2-Expression. Hierbei sind die Klone absteigend nach ihrem Sox2-Level sortiert.

Die FABP7-Expression variierte in allen SLGC-Klonen relativ zur Mutterkultur maximal um den Faktor 2,5 (Abb. 13 A). Im Fall von T1338 war in zwei von sieben Klonen (T1338 cl5 und cl6) die FABP7-Expression im Vergleich zu der der Mutterkultur um das 2-Fache erhöht, in Klon T1338 cl9 um 30%. Im Vergleich dazu wiesen die Klone T1338 cl2 und cl4 eine der Mutterkultur ähnliche FABP7-Expression auf und in den Klonen T1338 cl1 und cl8 war das FABP7-Level relativ zur Mutterkultur um 45% (cl1) bzw. 25% (cl8) geringer.

Die FABP7-Expression variierte in Extrakten der T1440-Klone gering. In Klon T1440 cl4 wich das FABP7-Level am stärksten von dem der Mutterkultur ab (-35%), während die FABP7-Expression der Klone T1440 cl5, cl5-1 und cl8 maximal um 15% höher war als die der Mutterkultur.

Drei von fünf T1452-Klone wiesen eine höhere FABP7-Expression als die Mutterkultur auf. Dabei war in den Klonen T1452 cl15, cl16 und cl21 die Expression zwischen 35% und 40% erhöht. Die FABP7-Expression von Klon T1452 cl10 unterschied sich nicht von der der Mutterkultur und Klon T1452 cl155 war der einzige Klon mit einer im Vergleich zur Mutterkultur reduzierten FABP7-Expression (-60%).

Im Vergleich zur Mutterkultur wiesen zwei von sechs T1464-Klone eine höhere FABP7-Expression auf. Dabei war das FABP7-Level in Klon T1464 cl18 um 65% und in Klon T1464 cl6 um 90% erhöht. Im Vergleich dazu war die FABP7-Expression von Klon T1464 cl8 ähnlich der der Mutterkultur und in drei von sechs Klonen reduziert (T1464 cl27: -35%; cl11: -50%; cl16: -55%).

Drei von vier Klone der T1495-Linie zeigten eine höhere FABP7-Expression als die Mutterkultur. Hierbei war die FABP7-Expression in den Klonen T1495 cl12 um das 2,5-Fache, T1495 cl26 um 50% und T1495 cl13 um 45% erhöht. Nur der Klon T1495 cl37 wies relativ zur Mutterkultur eine um 35% reduzierte FABP7-Expression auf.

Wie oben bereits erläutert, wurden die Expressionslevel von FABP7 in Abbildung 13 A entsprechend der Sox2-Expression der Klone angeordnet. Dabei zeigte sich, dass eine positive Korrelation zwischen der FABP7- und Sox2-Proteinexpression für die SLGC-Linien T1452, T1464 und T1495 (Ausnahme: T1452 Mc und T1495 cl12) bestand. Im Fall von T1338 und T1440 war keine eindeutige Korrelation festzustellen.

Im Vergleich zur Mutterkultur variierte die Musashi-Expression in allen SLGC-Klonen maximal um den Faktor 3,5 (Abb. 13 B). Alle T1338-Klone wiesen im Vergleich zur Mutterkultur eine höhere Musashi-Expression auf. Hierbei war in drei von sieben T1338-Klonen das Musashi-Level um mehr als das Doppelte erhöht (T1338 cl2: 2,5-fach; cl5: 3,5-fach; cl6: 3-fach). In Klon T1338 cl8 war die Musashi-Expression um 95% höher als die der Mutterkultur, in Klon T1338 cl4 um 50%. Die Musashi-Level der Klone T1338 cl1 und cl9 waren relativ zur Mutterkultur nur geringfügig höher (T1338 cl1: 20%; cl9: 15%).



Abb. 13: FABP7-, Musashi- und PAX6-Expression in SLGC-Klonen. Die FABP7- (**A**), Musashi- (**B**) und PAX6- (**C**) Expression wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Ein systematischer Fehler von 10% ist angegeben. Die relativen Expressionen der Klonkulturen (cl) wurden auf die der jeweiligen Mutterkultur (Mc) normiert, die als 1 definiert wurde. Die Klone sind absteigend nach ihrer Sox2-Proteinexpression sortiert. – FABP7, *fatty acid binding protein* 7; PAX6, *paired-box protein* 6; SLGC, *stem-like glioma cell;* Sox2, *sex determining region* Y-*box* 2.

Im Fall von T1440 variierte die Musashi-Expression nur wenig. Die Musashi-Level der Klone T1440 cl4, cl5, cl5-1 und cl8 waren maximal 20% geringer als das der Mutterkultur.

In der T1452-Linie gab es nur einen Klon, der eine erhöhte Musashi-Expression aufwies (T1452 cl15: +30%). Die anderen, untersuchten Klone wiesen relativ zur Mutterkultur eine geringere Musashi-Expression auf. Dabei war das Musashi-Level in Klon T1452 cl10 um 25% geringer und in den Klonen T1452 cl16, cl21 sowie cl155 um 45%.

Alle Klone der T1464-Linie exprimierten mehr Musashi als die Mutterkultur. Hierbei war die Musashi-Expression in Klon T1464 cl18 kaum erhöht (+15%). Die Klone T1464 cl6, cl8, cl11, cl16 und cl27 wiesen eine Musashi-Expression auf, die um 55% (T1464 cl16) bis 85% (cl8) höher war als die der Mutterkultur.

Drei von vier T1495-Klone zeigten eine höhere Musashi-Expression als die Mutterkultur. Hierbei war die Musashi-Expression in den Klonen T1495 cl12 um das 2,5-Fache, cl26 um 55% und cl13 um 45% erhöht. Der Klon T1495 cl37 hingegen wies relativ zur Mutterkultur eine um 25% reduzierte Musashi-Expression auf.

Die Musashi-Expression der Klone wurde, analog zur FABP7-Expression, in Abbildung 13 B entsprechend der Sox2-Expression absteigend angeordnet. Es zeigte sich, dass die Expressionslevel von Musashi und Sox2 in der T1452- und T1495-Linie positiv korrelierten (Ausnahme: T1495 cl12). Für die SLGC-Linien T1338, T1440 und T1464 wurde keine Korrelation beobachtet.

Die PAX6-Expression variierte in allen SLGC-Linien zwischen den Klonen und der jeweiligen Mutterkultur um maximal den Faktor 5 (Abb. 13 C). Im Fall von T1338 war die PAX6-Expression in drei von sieben Klonen im Vergleich zur Mutterkultur erhöht (T1338 cl5: +40%; cl6: +30%; cl8: +80%), wohingegen das PAX6-Level in den Klonen T1338 cl1, cl2, cl4 und cl9 reduziert war (T1338 cl1: -55%; cl2: -15%; cl4: -45%; cl9: -55%).

In T1440 gab es einen Klon, in dem die PAX6-Expression relativ zur Mutterkultur stärker erhöht war (T1440 cl5-1: +75%). Im Vergleich dazu war die PAX6-Expression in den Klonen T1440 cl4 und cl8 maximal 20% höher als die der Mutterkultur. Der Klon T1440 cl5 zeigte im Vergleich zur Mutterkultur ein um die Hälfte reduziertes PAX6-Level.

Drei von fünf T1452-Klone wiesen eine im Vergleich zur Mutterkultur erhöhte PAX6-Expression auf. Hierbei war das PAX6-Level in den Klonen T1452 cl10 um das 2,5-Fache, cl15 um 90% und cl155 um 70% erhöht, während der Klon T1452 cl16 ein ähnliches PAX6-Level wie die Mutterkultur aufwies. Nur der Klon T1452 cl21 zeigte relativ zur Mutterkultur ein leicht reduziertes PAX6-Level (-15%).

Im Fall von T1464 exprimierten alle Klone mehr PAX6 als die Mutterkultur. Hierbei war die PAX6-Expression in Klon T1464 cl6 um 25% höher als die der Mutterkultur, in den Klonen T1464 cl8 und cl18 um 50%, in den Klonen T1464 cl16 und cl27 um 75% und in Klon T1464 cl11 sogar um das 2,5-Fache.

Der Klon T1495 cl12 war der einzige Klone dieser SLGC-Linie, der mehr PAX6 exprimierte als die Mutterkultur (95%), während Klon T1495 cl37 eine ähnliche PAX6-Expression wie die Mutterkultur aufwies. Die PAX6-Expression in den Klonen T1495 cl13 und cl26 war relativ zur Mutterkultur um 80% geringer.

Die Expressionslevel von PAX6 wurden in Abbildung 13 C ebenfalls entsprechend des absteigenden Sox2-Levels der Klone angeordnet. Im Fall der Linien T1338, T1495 und bedingt T1464 war eher eine negative Korrelation zwischen der Expression von PAX6 und der von Sox2 zu erkennen, während im Fall von T1440 und T1452 keine Korrelation festzustellen war.

Fazit – FABP7, Musashi, PAX6 in Klonen

Alle untersuchten SLGC-Klone zeigten eine FABP7-, Musashi- und PAX6-Expression, die in 15% der Klone um mehr als den Faktor 2 von der der Mutterkultur abwich. Eine positive Korrelation zwischen dem Sox2- und dem FABP7-Level war in Klonen der SLGC-Linien T1452, T1464 und T1495 festzustellen, während die Sox2- und die Musashi-Expression nur den SLGC-Linien T1452 und T1495 positiv korrelierte. Die Expressionslevel von Sox2 und PAX6 zeigten zueinander eher eine negative Korrelation. Diese wurde in Klonen der SLGC-Linien T1338, T1495 und bedingt T1464 beobachtet.

Wie bereits für die Sox2-Expression wurde die Stabilität der FABP7-, Musashi- und PAX6-Expression über die Passagen untersucht. Dazu wurden verschiedene Passagen gleicher Klone hinsichtlich ihrer Proteinexpression mittels Western blot analysiert.

Im Fall von T1338 zeigten die Klone T1338 cl6 und cl8 jeweils eine Zunahme des FABP7-Levels über sieben (cl6) bzw. zehn Passagen (cl8) (T1338 cl6: 3,5-fach; cl8: 75%; Abb. 14 A). Ebenso wies der Klon T1440 cl5 einen Anstieg der FABP7-Expression um 50% innerhalb von neun Passagen auf, wohingegen der Klon T1440 cl8 eine 30%ige Reduktion des FABP7-Levels über neun Passagen zeigte. In den Extrakten der T1452-Klone variierten die FABP7-Level geringfügig (Abb. 14 A und D). Hierbei zeigte Klon T1452 cl10 über fünf Passagen kaum eine Veränderung der FABP7-Expression, der Klon T1452 cl15 eine geringe, 15%ige Reduktion über vier Passagen. Der Klon T1464 cl1 wies eine Zunahme der FABP7-Expression um 45% über neun Passagen auf, während sich die FABP7-Expression in Klon T1464 cl6 über 13 Passagen nicht veränderte.

Insgesamt variierte die FABP7-Expression in den Klonen der SLGC-Linien T1440, T1452 und T1464 über den beobachteten Zeitraum um weniger als 50%. Nur in den Klonen der T1338-Linie, besonders in T1338 cl6, war das FABP7-Level um mehr als 75% erhöht. Im Fall der Klone T1338 cl6 und cl8, T1440 cl5 sowie T1464 cl1 nahm die FABP7-Expression über die Zeit eher zu, während im Fall der Klone T1440 cl8 und T1452 cl15 eher eine Reduktion des FABP7-Levels zu erkennen war. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass einerseits die Veränderungen gering waren (Ausnahme: T1338 cl6) und andererseits sowohl die Passagen als auch die Zeitabstände zwischen den SLGC-Linien und zwischen den Klonen einer Linie variierten, was die Aussagekraft dieser Daten einschränkt.

Die Musashi-Expression variierte in allen Klonen um weniger als 50% zwischen den Passagen (Abb. 14 B). In Klon T1338 cl6 stieg das Musashi-Level innerhalb von sieben Passagen um 40% an, in Klon T1338 cl8 hingegen war eine Reduktion von 20% über zehn Passagen zu verzeichnen. Auch in den Klonen der T1440-Linie kam es in einem Fall zu einem Anstieg der Musashi-Expression (T1440 cl5: +40%) und im anderen Fall zu einer Reduktion (T1440 cl8: -20%). Ebenso stieg das Musashi-Level von Klon T1452 cl10 über fünf Passagen um 35% und das Level von Klon T1452 cl15 zeigte eine Reduktion um 20% über vier Passagen. Im Fall von T1464 blieb die Musashi-Expression in den Klonen T1464 cl1 und cl6 nahezu unverändert. Insgesamt wurden je zwei Klone der SLGC-Linien T1338, T1440 und T1452 hinsichtlich der Veränderung des Musashi-Levels über die Passagen analysiert. Dabei zeigte je ein Klon einen Anstieg der Musashi-Expression, während im Fall des zweiten Klons eine Reduktion zu erkennen war. Nur im Fall von T1464 waren keine Veränderungen der Musashi-Expression zu beobachten. Ebenso wie bei den Veränderungen von FABP7 ist auch hier zu beachten, dass die Veränderungen nur gering waren und sich die Passagen sowie die Zeitabstände unterschieden, was die Bedeutung dieser Veränderungen einschränkt.



Abb. 14: Stabilität der FABP7-, Musashi- und PAX6-Expression in SLGC-Klonen über die Passagen. Die FABP7- (A), Musashi- (B) und PAX6- (C) Expression über die Passagen wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Ein systematischer Fehler von 10% ist angegeben. Die Expressionen wurden jeweils auf die frühere Passage des jeweiligen Klons (cl) normiert, der als 1 definiert wurde. (D) Exemplarische Western blot-Analyse der PAX6-, Musashi- und FABP7-Proteinexpression in T1452-Klonen über verschiedene Passagen. Aktin diente als Ladekontrolle. – p, Passage; FABP7, *fatty acid binding protein* 7; PAX6, *paired-box protein* 6; SLGC, *stem-like glioma cell*.

Die PAX6-Expression nahm in Klon T1338 cl6 über sieben Passagen 2,5-fach zu, wohingegen der Klon T1338 cl8 eine Reduktion um 60% aufwies (Abb. 14 C). Im Fall von T1440 wies der Klon T1440 cl5 über neun Passagen einen Anstieg der PAX6-Expression um 70% auf, während das PAX6-Level von Klon T1440 cl8 unverändert blieb. Über fünf bzw. vier Passagen zeigten die Klone T1452 cl10 und cl15 eine Reduktion der PAX6-Expression (T1452 cl10: -50%; cl15: -25%; Abb. 14 A und D). Die PAX6-Expression der T1464-Klone variierte gering. Hierbei wies T1464 cl1 einen Anstieg um 20% auf, während das PAX6-Level in T1464 cl6 nahezu unverändert blieb.

Insgesamt zeigten die Klone T1338 cl6, T1440 cl5 und T1464 cl1 einen Anstieg der PAX6-Expression über die Passagen, während das PAX6-Level in den Klonen T1338 cl8, T1452 cl10 sowie T1452 cl15 reduziert wurde und in den Klonen T1440 cl8 sowie T1464 cl6 unverändert blieb. Auch bei dieser Expressionsanalyse waren die Passagen und die Zeitabstände verschieden und die Veränderungen über die Passagen eher gering, was auch in diesem Fall bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden muss.

Fazit – Veränderung von FABP7, Musashi und PAX6 in Klonen

Es zeigten sich Veränderungen der Expressionen von FABP7, Musashi und PAX6 in den Klonen über die Passagen. Diese waren zwischen den Klonen einer SLGC-Linie über einen ähnlichen Messzeitraum zum Teil stark unterschiedlich. Vier von acht Klone zeigten über die Passagen einen Anstieg der FABP7-Expression, zwei eine Reduktion und zwei blieben unverändert. Im Fall von Musashi und PAX6 wiesen jeweils drei Klone einen Anstieg des Proteinlevels auf, drei eine Reduktion und zwei blieben nahezu unverändert. Dabei variierte weder die FABP7-, noch die Musashi- oder die PAX6-Expression in Klon T1464 cl6 über 13 Passagen. Es zeigte sich, dass die Expressionslevel von FABP7, Musashi und PAX6 in den Klonen T1338 cl6, T1440 cl5 und tendenziell in T1452 cl15 positiv korrelierten. Im Fall von der Klone T1338 cl6 und T1452 cl15 waren die beobachteten Anstiege der FABP7-, Musashi- und PAX6-Expression mit einem Anstieg des Sox2-Levels über die Passagen korreliert (siehe Anhang Tab. 21). In allen weiteren, untersuchten Klonkulturen konnte keine Korrelation zwischen den Veränderungen der FABP7-, Musashi- und PAX6-Level festgestellt werden. Zudem war keine Korrelation zur Variation der Sox2-Expression zu erkennen.

4.1.4. Potenzielle SLGC-Marker

Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde eine Auswahl von SLGC-Linien, abgeleiteten Klonen und weiter differenzierten Kulturen bezüglich des Anteils CD44-positiver Zellen untersucht. Zusätzlich wurde der Anteil Integrin α 6-positiver Zellen in ausgewählten SLGC-Linien und weiter differenzierten Kulturen bestimmt. In der Literatur werden sowohl CD44 als auch Intergrin α 6 als Marker für SLGCs postuliert (Schonberg et al., 2014).



Abb. 15: Anteil CD44-positiver Zellen in SLGC-Linien, weiter differenzierten Kulturen und Klonen. Durchflusszytometrische Analysen mit einem Antikörper gegen CD44 in Kulturen von SLGC-Linien, weiter differenzierten Zellen (F-Linien) und Klonen (cl). Aufgetragen ist der Anteil CD44-positiver Zellen sowie ein systematischer Fehler von 10%. – CD44, Hyaluronsäurerezeptor; p, Passage; SLGC, *stem-like glioma cell*.

Es zeigte sich, dass in allen SLGC-Linien mehr als 90% der Zellen CD44-positiv waren (Abb. 15, links). Hierbei lag der Anteil CD44-positiver Zellen in vier der fünf untersuchten SLGC-Linien bei über 97% (T1338: 97%; T1440: 100%; T1452: 97%; T1495: 100%). Nur im Fall von T1464 war der Anteil CD44positiver mit 91% etwas geringer. Darüber hinaus wurden Klone der T1440-Linie über die Passagen untersucht. Dabei war zum einen zu beobachten, dass die Klone wie auch die Mutterkultur zu 100% CD44-positiv waren und zum anderen, dass sich der Anteil CD44-positiver Zellen über die Passagen nicht veränderte (Abb. 15, rechts). Zusätzlich wurde der Anteil CD44-positiver Zellen in weiter differenzierten Linien in serumhaltigem Medium im Vergleich zu den SLGC-Linien in serumfreiem Medium untersucht. Hierbei waren die weiter differenzierten Zellen, mit Ausnahme von T1452, ebenfalls zu über 90% CD44-positiv (Abb. 15, mittig). Der Anteil CD44-positiver Zellen lag im Fall der weiter differenzierten Kulturen von T1338 bei 99%, T1440 bei 98% und T1464 bei 100%. In der T1452-Kultur, die in serumhaltigem Medium kultivierte wurde, waren 72% der Zellen CD44-positiv. Eine Kultivierung von T1495-SLGCs in serumhaltigem Medium schlug reproduzierbar fehl.

Insgesamt lag der Anteil CD44-positiver Zellen sowohl in den SLGC-Linien als auch in den weiter differenzierten Kulturen bei über 90% (Ausnahme: T1452-Kultur in serumhaltigem Medium). Zudem war der Anteil CD44-positiver Zellen in den Klonkulturen im Vergleich zum Anteil in der Mutterkultur unverändert. Über die Passagen war keine Änderung des Anteils CD44-positiver Zellen in Klonen der T1440-Linie festzustellen.



Abb. 16: Anteil Integrin α 6-positiver Zellen in SLGC-Linien und weiter differenzierten Kulturen. Durchflusszytometrische Analysen mit einem Antikörper gegen Integrin α 6 in Kulturen von SLGC-Linien und weiter differenzierten Zellen (F-Linien). Aufgetragen ist der Anteil Integrin α 6-positiver Zellen sowie ein systematischer Fehler von 10%. – SLGC, stem-like glioma cell.

Im Fall von Integrin α 6 wurde der Anteil positiver Zellen exemplarisch für ausgewählte SLGC-Linien bestimmt (Abb. 16, links). Hierbei lag der Anteil Integrin α 6-positiver Zellen im Fall von T1440 bei 93% und T1495 bei 88%. Hingegen war der Anteil in den SLGC-Linien T1338 und T1452 geringer. Im Fall von T1338 waren 23% der Zellen Integrin α 6-positiv, während in der T1452-Kultur 43% positiv waren. Zusätzlich wurde der Anteil Integrin α 6-positiver Zellen in weiter differenzierten Kulturen, die in serumhaltigem Medium kultiviert wurden, bestimmt (Abb. 16, rechts). Im Fall von T1338 und T1452 waren 36% (T1338) bzw. 25% (T1452) der Zellen Integrin α 6-positiv, während der Anteil in T1440 und T1464 deutlich höher war und bei 86% (T1440) bzw. 73% (T1464) lag. Wie bereits oben beschrieben, gelang eine Kultivierung von T1495 in serumhaltigem Medium nicht.

Insgesamt waren sowohl in den SLGC-Linien als auch in den weiter differenzierten Kulturen Integrin α 6-positive Zellen nachweisbar. Im Vergleich der SLGC-Linien mit den weiter differenzierten Kulturen war zu beobachten, dass sich der Anteil Integrin α 6-positiver Zellen um maximal 18% unterschied. Im Fall von T1440 war der Anteil Integrin α 6-positiver Zellen in der weiter differenzierten Kultur um 7% geringer und im Fall von T1452 um 18%, wohingegen der Anteil Integrin α 6-positiver Zellen in der weiter differenzierten Kultur von T1338 um 13% höher war.

Fazit – CD44 und Integrin α 6 in SLGC-Linien, Klonen und weiter differenzierten Kulturen

Es zeigte sich, dass mindestens 90% der Zellen in SLGC-Linien, abgeleiteten Klonkulturen und weiter differenzierten Kulturen CD44-positiv waren (Ausnahme: T1452-Kultur in serumhaltigem Medium) und sich der Anteil über die Passagen nicht veränderte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass CD44 nicht nur auf SLGCs präsentiert wird und somit kein SLGC-Marker sein kann. Mehr als 20% der Zellen in den SLGC-Linien sowie den weiter differenzierten Kulturen waren Integrin α 6-positiv. Im Fall von T1440 und T1452 war der Anteil Integrin α 6-positiver Zellen in den weiter differenzierten Kulturen geringer als in den SLGC-Linien. Allerdings war es im Fall von T1338 umgekehrt. Hier waren in der SLGC-Linie weniger Zellen Integrin α 6-positiv im Vergleich zur weiter differenzierten Kultur. Damit korrelierte der Anteil Integrin α 6-positiver Zellen nicht mit dem Differenzierten Kultur. Das spricht dafür, dass Integrin α 6 eher kein SLGC-Marker ist.

4.1.5. CD133

Um die Bedeutung von CD133 als SLGC-Marker zu untersuchen, wurden sowohl selektierte SLGC-Linien als auch davon abgeleitete Klonlinien bezüglich ihres Anteils CD133-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zusätzlich wurde überprüft wie stabil der Anteil CD133-positiver Zellen über die Zeit ist, sowohl in ausgewählten Klonlinien als auch in Kulturen, die nach der Zellsortierung mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) CD133-positiv bzw. CD133-negativ waren.

In den durchflusszytometrischen Analysen wiesen die SLGC-Linien einen unterschiedlich hohen Anteil an CD133-positiven Zellen auf (Abb. 17, links). Im Fall von T1338, T1440 und T1452 waren weniger als 3% der Zellen CD133-positiv, während der Anteil CD133-positiver Zellen in T1464 und T1495 bei 15% bzw. 13% lag. Nur im Fall von T1522 war der Anteil CD133-positiver Zellen im Vergleich zu den anderen SLGC-Linien deutlich höher und betrug 35%.

Betrachtet man die Klone der T1440-Linie, so war der Anteil CD133-positiver Zellen in frühen Phasen nach der klonalen Expansion geringer als in der Mutterkultur (ca. 2%) und mit <1% sehr gering (Abb. 17, rechts). Über die Passagen stieg der Anteil CD133-positiver Zellen in T1440 cl4 auf etwa das Doppelte (ca. 1,5%). Im Fall von T1440 cl5 war ebenfalls ein Anstieg zu beobachten, wobei dieser deutlich stärker ausfiel. Der Anteil CD133-positiver Zellen stieg im gleichen Zeitraum auf 22%. Über die folgenden Passagen reduzierte sich der Anteil CD133-positiver Zellen auf etwa 5% bis 6% und lag somit deutlich über dem Ausgangslevel (0,1%). Somit scheint es zunächst zu einer Anreicherung CD133-positiver Zellen zu kommen, gefolgt von einer Reduktion des Anteils positiver Zellen über die folgenden Passagen.

Insgesamt variierte der Anteil CD133-positiver Zellen stark zwischen den SLGC-Linien. T1338, T1440 und T1452 gehörten zu den Linien, die einen sehr geringen Anteil CD133-positiver Zellen aufwiesen, während der Anteil in den Linien T1464 und 1495 bei etwa 15% lag und in T1522 sogar bei 35%. Zudem nahm der Anteil CD133-positiver Zellen über die Passagen zunächst zu, bevor es zu einer Reduktion des Anteils kam.



Abb. 17: Anteil CD133-positiver Zellen in SLGC-Linien und Klonen sowie die Stabilität über die Passagen. Durchflusszytometrische Analysen mit einem Antikörper gegen CD133 in Kulturen von SLGC-Mutterkulturen (links) und zwei Klonen (cl) der T1440-Linie verschiedener Passagen (rechts). Aufgetragen ist der Anteil CD133-positiver Zellen sowie ein systematischer Fehler von 10%. Messwerte für ein und denselben Klon sind im gleichen Farbton dargestellt. – CD133, Prominin 1; p, Passage; SLGC, *stem-like glioma cell.*

Um die Beobachtungen zur Veränderung des Anteils CD133-positiver Zellen zu bestätigen, wurden mittels FACS sortierte Kulturen über die Zeit analysiert. Es wurde die SLGC-Linie T1522 verwendet, die im Labor als Mutterkultur mit einem hohen Anteil an CD133-positiven Zellen identifiziert wurde und für die geplante Analyse gut geeignet schien. In CD133-positive und -negative Fraktionen sortierte Kulturen der T1522-Linie wurden über fünf Wochen hinsichtlich ihres Anteils CD133-positiver Zellen untersucht.



Abb. 18: Stabilität des Anteils CD133-positiver Zellen in sortierten T1522-Kulturen. Durchflusszytometrische Analysen mit einem Antikörper gegen CD133 nach Sortierung der T1522-Ausgangskultur (Mc) in eine Population CD133-positiver sowie -negativer Zellen. Die Sortierung erfolgte mittels FACS an zwei verschiedenen Geräten (Aria, *cell sorter* FACSAria III (BD Biosciences) und MoFlo, *cell sorter* MoFlo Legacy (Beckman Coulter)). Die Messung des Anteils CD133-positiver Zeller erfolgte mittels Durchflusszytometrie am Durchflusszytometer BD LSRII (BD Biosciences). Aufgetragen sind die Anteile CD133-positiver Zellen in den Kulturen, die sich von der Positiv- (weiß) bzw. Negativfraktion (hellgrau) ableiten. Die Analyse erfolgte einmal wöchentlich über einen Zeitraum von fünf Wochen (W0 bis W5). Ein systematischer Fehler von 10% ist angegeben. – CD133, Prominin 1; pos., positiv sortierte Zellen; neg., negativ sortierte Zellen; FACS, *fluorescence-activated cell sorting*.

Die Zellsortierung der T1522-Kultur erfolgte parallel an zwei verschiedenen Geräten (Aria, *cell sorter* FACSAria III (BD Biosciences) und MoFlo, *cell sorter* MoFlo Legacy (Beckman Coulter)). Der Anteil an positiven bzw. negativen Zellen veränderte sich in beiden Ansätzen (Aria und MoFlo) bereits innerhalb von einer Woche sehr stark (Abb. 18). Der Anteil an CD133-positiven Zellen in den Positivfraktionen (100%) verringerte sich innerhalb einer Woche auf 65% (Aria) bzw. 68% (MoFlo). In der CD133-

Negativfraktionen stieg der Anteil CD133-positiver Zellen innerhalb einer Woche auf 26% (Aria) bzw. 11% (MoFlo). In den folgenden Wochen (W2 bis W4) veränderte sich der Anteil CD133-positiver Zellen in den Positivfraktionen nur leicht (W2: 72% (Aria) bzw. 63% (MoFlo); W3: 76% (Aria) bzw. 66% (MoFlo); W4: 72% (Aria und MoFlo)). Hingegen stieg der Anteil CD133-positiver Zellen in den Negativfraktionen weiter an (W2: 43% (Aria) bzw. 41% (MoFlo); W3: 47% (Aria) bzw. 62% (MoFlo); W4: 50% (Aria) bzw. 70% (MoFlo)). In der Woche W5 wurde in allen Fraktionen eine Reduktion CD133-positiver Zellen gemessen. In den Positivfraktionen sank der Anteil von 72% auf 55% (Aria) bzw. von 72% auf 49% (MoFlo), in den Negativfraktionen von 50% auf 35% (Aria) bzw. von 70% auf 52% (MoFlo).

Interessant ist, dass die Negativfraktionen, die mit Hilfe der beiden unterschiedlichen Geräte sortiert wurden, in der Woche W1 starke Unterschiede aufwiesen: 11% CD133-positive Zellen nach der Sortierung mittels MoFlo Legacy (Beckman Coulter) gegen 26% CD133-positive Zellen nach der Sortierung mittels FACSAria III (BD Biosciences). In der Woche W2 glichen sich die Anteile etwas an. Ab der Woche W3 lag der Anteil an CD133-positiven Zellen in der Negativfraktion des MoFlo durchschnittlich 17% höher als in der Negativfraktion des Aria. Solch deutliche Unterschiede waren in den Positivfraktionen nicht zu verzeichnen. Dort variierte der Anteil CD133-positiver Zellen zwischen 0% und 10%. Darüber hinaus war zu erkennen, dass bis zur Woche W5 der Anteil CD133-positiver Zellen in keiner Fraktion bis auf den Anteil der Mutterkultur zum Zeitpunkt der Sortierung sank.

Insgesamt konnte durch das Sortieren in Positiv- und Negativfraktionen bestätigt werden, dass sich der Anteil CD133-positiver Zellen über die Zeit verändert. Insbesondere zeigte sich, dass CD133negative Fraktionen CD133-positive Zellen hervorbringen können.

Zusätzlich wurde überprüft, ob der Anteil CD133-positiver Zellen in den T1522-Kulturen, die sich von den CD133-Positiv- bzw. Negativfraktionen ableiten, mit der CD133-Expression korrelierte. Dazu wurden T1522-Kulturen vier (W4) bzw. sieben Wochen (W7; nicht in der Durchflusszytometrie analysiert) nach der Zellsortierung hinsichtlich der CD133-Expression mittels Western blot untersucht. Parallel dazu wurde die Expression von Sox2 in diesen Ansätzen bestimmt.



Abb. 19: CD133- und Sox2-Expression in sortierten T1522-Kulturen. (A) Exemplarische Western blot-Analyse und (B) graphische Darstellung der CD133- und Sox2-Proteinexpression in sortierten T1522-Kulturen vier (W4) bzw. sieben Wochen (W7) nach der Zellsortierung. Die CD133- bzw. Sox2-Expression wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Ein systematischer Fehler von 10% ist angegeben. Die Sortierung der T1522-Ausgangskultur (Mc) in eine Population CD133-positiver (+) sowie -negativer Zellen (-) erfolgte mittels FACS an zwei verschiedenen Geräten (A, *cell sorter* FACSAria III (BD Biosciences) und M, *cell sorter* MoFlo Legacy (Beckman Coulter)). – CD133, Prominin 1; Sox2, *sex determining region Y-box* 2; FACS, *fluorescence-activated cell sorting*. Es zeigte sich, dass in dem Proteinextrakt der T1522-Kultur, die sich von der CD133-Positivfraktion ableitete (Aria_{pos}), vier Wochen nach der Zellsortierung (Woche W4) die CD133-Expression 3-mal stärker war als in der Kultur, die sich von der CD133-Negativfraktion ableitete (Aria_{neg}, Abb. 19). Zudem nahm die CD133-Expression in der Aria_{pos}-Kultur über die nächsten drei Wochen um 60% ab, wohingegen das CD133-Level im gleichen Zeitraum in der Aria_{neg}-Kultur um das 3-Fache anstieg. Sieben Wochen nach der Zellsortierung (Wochen W7) exprimierten die T1522-Kultur, die sich von der CD133-Positivfraktion des MoFlo ableitete (MoFlo_{pos}), und die Aria_{pos}-Kultur aus der gleichen Woche ähnlich viel CD133. Die Beobachtung aus der Woche W4 korreliert bedingt mit der Anzahl CD133-positiver Zellen. Im Fall der Aria_{pos}-Kultur waren 72% der Zellen CD133-positiv, im Fall der Aria_{neg}-Kultur 50%. Zwar korrelierte die geringere CD133-Expression in der Aria_{neg}-Kultur, allerdings fiel die Variation der CD133-Expression deutlich stärker aus als die des Anteils CD133-positiver Zellen. Ob die Veränderung der CD133-Expression von Woche W4 bis zur Woche W7 mit der Variation des Anteils CD133-positiver Zellen korrelierte, konnte aufgrund fehlender durchflusszytometrischer Analysen nicht beurteilt werden.

Die Sox2-Expressionen der Aria_{pos}- und Aria_{neg}-Kultur aus Woche W4 unterschieden sich wenig (Abb. 19). Hierbei war die Sox2-Expression in der Aria_{neg}-Kultur im Vergleich zur Aria_{pos}-Kultur um 20% höher. In beiden Kulturen stieg das Sox2-Level innerhalb von drei Wochen. Im Fall der Aria_{pos}-Kultur nahm die Sox2-Expression um 80% zu, im Fall der Aria_{neg}-Kultur um das 2,3-Fache. Somit war das Sox2-Level in der Aria_{neg}-Kultur sieben Wochen nach der Zellsortierung im Vergleich zur Aria_{pos}-Kultur um 65% höher. Das Sox2-Level der MoFlo_{pos}-Kultur sieben Wochen nach der Zellsortierung unterschied sich nicht von dem der Aria_{pos}-Kultur aus der gleichen Woche.

Insgesamt zeigte sich, dass die Sox2-Expression sowohl in der Aria_{pos}- als auch in der Aria_{neg}-Kultur innerhalb von drei Wochen zunahm, obwohl im Fall der Aria_{pos}-Kultur eine Reduktion und im Fall der Aria_{neg}-Kultur ein Anstieg der CD133-Expression nachweisbar war. Damit korrelierte das Expressionslevel von Sox2 nicht mit dem von CD133. Das CD133- und das Sox2-Level war in der Aria_{pos}- und der MoFlo_{pos}-Kultur sieben Wochen nach der Zellsortierung (Woche W7) nahezu identisch.

Fazit – CD133 in SLGC-Linien, Klonen und sortierten T1522-Kulturen

Nur eine Subpopulation der Zellen in den SLGC-Linien war CD133-positiv. Darüber hinaus veränderte sich der Anteil CD133-positiver Zellen sowohl im Fall von Klon T1440 cl5 als auch in den T1522-Kulturen, die sich von CD133-Positiv- und CD133-Negativfraktionen ableiteten, über die Passagen. Der Anteil CD133-positiver Zellen in Klon T1440 cl5 nahm zunächst zu, bevor eine Reduktion des Anteils über die Passagen zu beobachten war. Parallel dazu stieg das Sox2-Level zunächst an (vergleiche Abb. 7 und Abb. 17) und wurde in Extrakten späterer Passagen reduziert. Im Fall der Aria_{pos}- bzw. MoFlo_{pos}-Kultur der T1522-Linie nahm der Anteil CD133-positiver Zellen ab, während Aria_{neg}- und MoFlo_{neg}-Kulturen CD133-positive Zellen hervorbrachten. Die Expressionslevel von CD133 in Aria_{pos}- und Aria_{neg}-Kulturen wiesen ebenfalls auf eine Reduktion im Fall der Aria_{pos}-Kultur sowie einen Anstieg im Fall der Aria_{neg}-Kultur hin. Allerdings ist zu beachten, dass sich die Zeitpunkte der durchflusszytometrischen und der Western blot-Analyse zwar überlappen, jedoch nicht identisch waren. Die Sox2-Expression stieg in Aria_{pos}- und Aria_{neg}-Kulturen innerhalb von drei Wochen, jedoch unabhängig von der CD133-Expression. Damit scheint CD133 eher kein Marker für SLGCs zu sein.

4.1.6. Differenzierungsassoziierte Faktoren

Um Hinweise auf glial, neuronal oder endothelial differenzierende Kulturen zu erhalten, wurde die Expression von GFAP (glial) und Tau (neuronal) mittels Western blot-Analysen bestimmt. Der Anteil CD31-positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch erfasst. Hinsichtlich der GFAP-Expression ist zu bemerken, dass sie nicht ausschließlich auf eine gliale Differenzierung hindeutet, sondern es in Analogie zu den adulten neuralen Stammzellen SLGCs mit einer GFAP-Expression in der Gliomstammzelle gibt (Choschzick et al., 2014 und persönliche Mitteilung von C. Zechel). Die untersuchten SLGC-Mutterkulturen, nicht aber die abgeleiteten Klone, wurden in dieser Arbeit mit Antikörper gegen Nestin und GFAP gefärbt.



Abb. 20: Expression differenzierungsassoziierter Faktoren in SLGC-Klonen. (A) Exemplarische Western blot-Analyse der GFAP- und Tau-Expression in T1338- und T1452-Klonen (cl). Aktin bzw. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) diente als Ladekontrolle. (B) Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α Nestin (grün), α GFAP (rot) und DAPI (blau) in SLGC-Linien. Messbalken, 50 µm. (C-D) Western blot-Analyse der GFAP- (C) und Tau- (D) Expression. Die Expressionen wurden gegen die Expression der Ladekontrolle GAPDH bzw. Aktin normalisiert. Ein systematischer Fehler von 10% ist angegeben. Die Expressionen wurden auf die der jeweiligen Mutterkultur normiert, die als 1 definiert wurde und im Graphen nicht gezeigt ist. Die Klone sind absteigend nach ihrer Sox2-Proteinexpression sortiert. – GFAP, glial fibrillary acidic protein; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; p, Passage; SLGC, stem-like glioma cell; Sox2, sex determining region Y-box 2.

Eine hohe Expression von GFAP in allen Zellen einer SLGC-Kultur legt nahe, dass GFAP in dieser Kultur ein Marker für SLGCs ist. Sind hingegen wenige Zellen der SLGC-Kultur GFAP-positiv, spricht das eher dafür, dass GFAP in diesem Fall ein Differenzierungsmarker ist.

In der Western blot-Analyse wurde mit dem Antikörper gegen GFAP stets ein Triplett detektiert (Abb. 20 A). Hierbei stellt die obere Bande das volle Länge GFAP Protein (50 kDa) dar. Die anderen zwei Banden könnten GFAP-Isoformen sein (Kamphuis et al., 2012). Für die Quantifizierung des GFAP-Signals wurden stets alle drei Banden berücksichtigt. Die Expressionslevel von GFAP der Klonkulturen

wurden auf die jeweilige Mutterkultur normiert, deren Expression als 1 definiert wurde. Wie bereits im Abschnitt 4.1.3. wurden die Klone in Abbildung 20 nicht der Klon-Nummern entsprechend aufgetragen, sondern absteigend nach ihrem Sox2-Level sortiert. So lässt sich die GFAP-Expression in Relation zum Sox2-Level betrachten.

Nur in einem Teil der Zellen der T1338-Mutterkultur (ca. 30%) waren GFAP-Filamente nachweisbar (Abb. 20 B). Das deutet darauf hin, dass GFAP in T1338 eher ein Differenzierungsmarker ist. Die GFAP-Expression der T1338-Klone war deutlich geringer als die der Mutterkultur (Abb. 20 A und C). Hierbei zeigte T1338 cl5 mit 30% relativ zur Mutterkultur die höchste GFAP-Expression unter den Klonen. In den Klonen T1338 cl2 und cl8 war die GFAP-Expression verglichen zu der der Mutterkultur auf ein Viertel (cl2) bzw. ein Fünftel (cl8) reduziert. Im Fall der Klone cl1, cl4 und cl9 war die GFAP-Expression relativ zur Mutterkultur zwischen 85% und 90% geringer. Die geringste GFAP-Expression wies T1338 cl6 auf (-95%). Die geringen GFAP-Level aller Klonkulturen relativ zur Mutterkultur korrelierten mit einer im Vergleich zur Mutterkultur erhöhten Sox2-Expression. Allerdings korrelierte die Höhe der Expressionslevel von GFAP nicht mit der von Sox2.

60% bis 70% der Zellen der T1440-Mutterkultur waren stark GFAP-positiv (Abb. 20 B). Somit scheint GFAP in der T1440-Linie eher ein Marker für SLGCs zu sein. Zwei von vier T1440-Klone wiesen im Vergleich zur Mutterkultur ein erhöhtes GFAP-Level auf (Abb. 20 C). Hierbei war die GFAP-Expression in Klon T1440 cl5-1 um das 2-Fache erhöht, in T1440 cl5 um 75%. Die GFAP-Expression war in Klon T1440 cl4 kaum von der Mutterkultur verschieden (+10%), während im Fall von Klon T1440 cl8 eine Reduktion von 80% zu beobachten war. Vergleicht man die Expressionslevel von GFAP und Sox2 der Klonkulturen untereinander, so war eine positive Korrelation zwischen dem Sox2- und dem GFAP-Level festzustellen. Im Vergleich zur Mutterkultur allerdings korrelierte eine höhere GFAP-Expression in den Klonen relativ zur Mutterkultur nicht mit einer höheren Sox2-Expression.

Eine GFAP-Expression war in etwa 70% bis 80% der Zellen der T1452-Mutterkultur zu beobachten, weshalb GFAP in diesem Fall eher ein SLGC-Marker ist (Abb. 20 B). Alle T1452-Klone zeigten eine geringere GFAP-Expression als die Mutterkultur (Abb. 20 C). Hierbei war in Klon T1452 cl16 die GFAP-Expression 20% geringer als die der Mutterkultur. In den Extrakten der Klone T1452 cl15 und cl10 war das GFAP-Level im Vergleich zur Mutterkultur um 35% (cl15) bzw. 40% (cl10) reduziert, in Klon T1452 cl21 um 65%. Das GFAP-Level von Klon T1452 cl155 war relativ zur Mutterkultur 90% geringer. Vergleicht man die Expressionslevel von GFAP und Sox2 der Klone mit denen der Mutterkultur, so deuten die Daten darauf hin, dass eine positive Korrelation zwischen dem GFAP- und dem Sox2-Level vorhanden war. Jedoch korrelierte die Höhe der Sox2-Expression nicht mit der Höhe des GFAP-Levels.

Die T1495-Mutterkultur enthält nur sehr wenige, GFAP-positive Zellen, was dafür spricht, dass GFAP in T1495 eher als Differenzierungsmarker dient (<5%; Abb. 20 B). In den Western blot-Analysen der T1495-Klone war die GFAP-Expression im Vergleich zur Mutterkultur drastisch erhöht (Abb. 20 C). Während in der Mutterkultur ein GFAP-Signal kaum zu detektieren war, wurden für alle Klone sehr starke GFAP-Signale detektiert. Die stärkste GFAP-Expression wies Klon T1495 cl12 auf, die schwächste T1495 cl26. Dabei war das GFAP-Level in Klon T1495 cl12 50% höher als in Klon T1495 cl26. Eine Korrelation zwischen der Höhe des Sox2-Levels und der Höhe der GFAP-Expression war nicht festzustellen, dennoch war sowohl das Expressionslevel von Sox2 als auch von GFAP in den Klonen höher als in der Mutterkultur.

Obwohl die T1464-Mutterkultur in der immunzytochemischen Analyse in früheren Versuchen des Labors nachweislich GFAP exprimierte (Choschzick et al., 2014), konnte ich in der Mutterkultur und den untersuchten Klonen (T1464 cl1, cl6, cl8, cl11, cl16, cl18, cl21, cl27) mittels Western blot-Analyse und 15 µg Gesamtzell-Proteinextrakt pro Probe reproduzierbar kein GFAP-Signal detektieren (nicht gezeigt).

Insgesamt kann anhand der immunzytologischen Analysen vermutet werden, dass GFAP in den Linien T1440 und T1452 ein SLGC-Marker ist, wohingegen GFAP in T1338 und T1495 eher als Differenzierungsmarker dient. Im Fall von T1440 korrelierte das GFAP-Level in den Klonen positiv mit der Sox2-Expression, wodurch GFAP als SLGC-Marker bestätigt wird. Im Fall der T1452-Linie ist das weniger eindeutig. In T1452 exprimierte zwar kein Klon mehr GFAP und Sox2 als die Mutterkultur, was für GFAP als SLGC-Marker spricht, allerdings gab es keine eindeutige, positive Korrelation zwischen dem Expressionslevel von GFAP und Sox2. Bei der SLGC-Linie T1338 mit GFAP als Differenzierungsmarker, war die GFAP-Expression aller Klone deutlich geringer als die der Mutterkultur. Zudem war das Sox2-Level in den Extrakten der Klonkulturen relativ zur Mutterkultur erhöht. Das zusammen unterstreicht die Annahme, dass es sich bei GFAP in T1338 um einen Differenzierungsmarker handelt, auch wenn keine eindeutige, negative Korrelation zwischen dem GFAP- und dem Sox2-Level festgestellt werden konnte. Im Fall von T1495, in der GFAP aufgrund der immunzytologischen Analysen eher als Differenzierungsmarker einzuordnen ist, nahm das GFAP-Level in den Klonen relativ zur Mutterkultur drastisch zu. Gleichzeitig stieg die Sox2-Expression in den Klonen im Vergleich zur Mutterkultur. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass GFAP in der T1495-Linie eher ein Marker für SLGCs als für Differenzierung ist, auch wenn die Expressionslevel von GFAP und Sox2 nicht positiv korrelierten.

Tau ist ein Protein, das unter physiologischen Konditionen neuronal exprimiert wird (Avila et al., 2004). Allerdings war ein basales Expressionslevel von Tau in allen hier analysierten SLGC-Linien nachweisbar und wurde im Fall einer Differenzierung hochreguliert (Choschzick et al., 2014). Die Tau-Level der Klone wurden auf die Mutterkultur normiert, die als 1 definiert wurde. Auch bei dieser Analyse wurde die Tau-Expression in Relation zum Sox2-Level betrachtet. Dazu wurden die Klone wie im Abschnitt 4.1.3. entsprechend ihrer Sox2-Expression sortiert und absteigend angeordnet (Abb. 20 D).

Drei von sieben T1338-Klone zeigten relativ zur Mutterkultur eine deutlich erhöhte Tau-Expression. Hierbei war das Tau-Level in Klon T1338 cl1 im Vergleich zur Mutterkultur um das 2-Fache erhöht, in cl4 um 60% und in cl 5 um 45%. Der Klon T1338 cl2 wies eine leicht erhöhte Tau-Expression auf (+15%), während in den Klonen T1338 cl6, cl8 und cl9 die Tau-Expression der der Mutterkultur ähnelte. Eine eindeutige Korrelation zwischen dem Expressionslevel von Tau und Sox2 ließ sich nicht feststellen.

Die Tau-Expression war in drei von vier T1440-Klonen im Vergleich zur Mutterkultur deutlich erhöht. Hierbei war das Tau-Level in den Klonen T1440 cl5-1 und cl8 um das 2,5-Fache höher als das der Mutterkultur, in Klon T1440 cl5 um 75%. Im Vergleich dazu unterschied sich der Klon T1440 cl4 in der Tau-Expression nicht von der Mutterkultur. Im Fall der T1440-Klone wurde keine Korrelation zwischen der Tau- und der Sox2-Expression beobachtet.

Die Tau-Level der T1452-Klonkulturen wichen maximal um 55% von dem der Mutterkultur ab. Hierbei war die Tau-Expression in Klon T1452 cl16 relativ zur Mutterkultur um 55% erhöht. Während sich die Klone T1452 cl10 und cl15 hinsichtlich der Tau-Expression kaum von der Mutterkultur unterschieden, war das Tau-Level in Klon T1452 cl155 um 20% und in Klon T1452 cl21 sogar um 55% geringer. Auch in den T1452-Klonen korrelierte das Expressionslevel von Tau nicht mit dem von Sox2.

Alle Klone der T1464-Linie wiesen eine höhere Tau-Expression als die Mutterkultur auf. Hierbei wich das Tau-Level in Klon T1464 cl6 am geringsten von dem der Mutterkultur ab (+15%). Im Vergleich dazu war das Tau-Level in den Klonen T1464 cl1, cl11 und cl18 relativ zur Mutterkultur um 50% (cl1) bzw. 60% (cl11 und cl18) und in Klon T1464 cl21 sogar um das 2-Fache höher. Betrachtet man die Tau- und die Sox2-Expression der T1464-Klone, so ließ sich keine Korrelation erkennen.

Im Fall von T1495 wich die Tau-Expression nur in einem Klon (T1495 cl37) stark von der der Mutterkultur ab. Hierbei war das Tau-Level in Klon T1495 cl37 relativ zur Mutterkultur um 60% geringer. Die Expressionslevel von Tau waren im Vergleich zur Mutterkultur in den Klonen T1495 cl13 und cl26 um 20% (cl13) bzw. 30% (cl26) reduziert, während sich die Tau-Expression des Klons T1495 cl12 nicht von der der Mutterkultur unterschied. Wie in den anderen, analysierten SLGC-Linien konnte auch im Fall von T1495 keine Korrelation zwischen dem Tau- und dem Sox2-Level festgestellt werden.

Insgesamt war die Tau-Expression in den Klonen der Linien T1440 und T1464 ähnlich der der Mutterkultur oder höher, wohingegen in T1495 alle Klone ein ähnliches oder geringeres Tau-Level als die Mutterkultur aufwiesen. Im Fall von T1338 und T1452 gab es Klone, die mehr, weniger oder ähnlich viel Tau wie die Mutterkultur exprimierten. Unabhängig davon wurde in keiner SLGC-Linie eine eindeutige Korrelation zwischen dem Expressionslevel von Tau und Sox2 festgestellt.

Fazit – GFAP und Tau in Klonen

In allen untersuchten Klonen der SLGC-Linien T1338, T1440, T1452 und T1495 konnte ein GFAP-Signal detektiert werden. Im Vergleich zur Mutterkultur wich die GFAP-Expression in 75% der Klone um mehr als den Faktor 2 ab. Nur im Fall von T1464 konnte reproduzierbar kein GFAP-Signal im Western blot nachgewiesen werden. Es gab Hinweise darauf, dass GFAP in den Linien T1440, T1452 und T1495 ein Marker für SLGCs darstellt, wohingegen eine Expression von GFAP in T1338 eher mit der Differenzierung assoziiert ist. Eine eindeutige, positive Korrelation zwischen dem GFAP- und dem Sox2-Level war nur in Extrakten der T1440-Klone zu beobachten. Alle analysierten SLGC-Klone wiesen eine Tau-Expression auf, die in einem Fünftel der Klone um mehr als den Faktor 2 relativ zur Mutterkultur variierte. Die Expressionslevel von Tau und Sox2 zeigten zueinander in keiner SLGC-Linie eine Korrelation. Interessanterweise schienen die Expressionslevel von GFAP und Tau in T1440, T1452 und T1495 positiv miteinander zu korrelieren (Ausnahme: T1440 cl8, T1452 cl155 und T1495 cl37). Im Fall von Klon T1440 cl8 war sowohl das Sox2- als auch das GFAP-Level (GFAP ist hier eher ein SLGC-Marker) im Vergleich zur Mutterkultur stark reduziert, jedoch die Tau-Expression relativ zur Mutterkultur deutlich erhöht. Das könnte darauf hindeuten, dass es in Klon T1440 cl8 zunehmend zu einer neuronalen Differenzierung kam.

Theoretisch wäre es möglich, dass es in den SLGC-Linien, deren Sox2-Level über die Passagen fällt, zu einer Zunahme von GFAP oder Tau kommt. Um Hinweise auf eine Korrelation zwischen dem Expressionslevel von Sox2 und GFAP bzw. Tau zu erhalten, wurden zusätzlich Extrakte gleicher Klone aus unterschiedlichen Passagen hinsichtlich ihrer GFAP- und Tau-Expression untersucht. Diese Analyse erfolgte exemplarisch an einigen Klonen der Linien T1338, T1440 und T1464 (nur Tau). Die Veränderungen der Expression von GFAP und Tau wurden wiederum mittels Western blot analysiert. Für die Quantifizierung der Expressionslevel von GFAP wurde stets das gesamte Triplett des GFAP-Signals berücksichtigt.



Abb. 21: Stabilität der GFAP- und Tau-Expression in SLGC-Klonen über die Passagen. Die GFAP- (A) und Tau- (B) Expression über die Passagen wurde gegen die Expression der Ladekontrolle GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) bzw. Aktin normalisiert. Ein systematischer Fehler von 10% ist angegeben. Messwerte für ein und denselben Klon (cl) sind im gleichen Farbton dargestellt. Die Expressionen wurden jeweils auf die der Mutterkultur normiert, die als 1 definiert wurde. – GFAP, glial fibrillary acidic protein; p, Passage; SLGC, stem-like glioma cell.

Im Fall der T1338-Linie reduzierte sich die GFAP-Expression in zwei von vier Klonen über die Passagen (Abb. 21 A). Die GFAP-Expression des Klons T1338 cl2 nahm innerhalb von acht Passagen um 15% ab und über die folgenden sieben Passagen um weitere 15%. In Klon T1338 cl9 blieb das GFAP-Level zunächst konstant, fiel dann aber über zehn Passagen um 45%. Im Fall des Klons T1338 cl6 war über sieben Passagen ein Anstieg der GFAP-Expression um das 4-Fache zu beobachten, gefolgt von einer Reduktion um 75%. Im Vergleich dazu wies Klon T1338 cl10 einen kontinuierlichen Anstieg des GFAP-Levels über die Passagen auf. Über fünf Passagen war in Klon T1338 cl10 ein Anstieg um das 5-Fache zu verzeichnen und über weitere zehn Passagen um das 2,5-Fache. Im Fall der T1338-Klone cl2, cl6, cl9 und cl11 ließ sich keine Korrelation hinsichtlich der Veränderung der GFAP-Expression und der Höhe des Sox2-Levels zu frühen Passagen feststellen (vergleiche Abb. 7, Abb. 21 A und Abb. 22). Zudem ließ sich keine Korrelation zwischen der Veränderung des GFAP- und Sox2-Levels erkennen. Diese Beobachtung spricht eher gegen eine gliale Differenzierung in Klonen der T1338-Linie.



Abb. 22: GFAP-Expression in T1338- und T1440-Klonen in Abhängigkeit von der Passagenzahl. Exemplarische Western blot-Analyse der GFAP-Proteinexpression in T1338- und T1440-Klonen (cl) über verschiedene Passagen (p). – GFAP, *glial fibrillary acidic protein*; Mc, Mutterkultur.

Alle T1440-Klone zeigten zunächst einen geringen (T1440 cl5 und cl8) bis deutlichen (T1440 cl4) Anstieg der GFAP-Expression über neun bis zehn Passagen (Abb. 21 A und Abb. 22). Nach weiteren 13 bis 20 Passagen fiel das GFAP-Level unter das Ausgangsniveau. Dieser Effekt war besonders deutlich im Fall von Klon T1440 cl4. Hier gab es einen 3-fachen Anstieg der GFAP-Expression nach zehn Passagen,

gefolgt von einer Reduktion um 75% nach weiteren 13 Passagen. In Klon T1440 cl5 stieg die GFAP-Expression über neun Passagen um 30% und reduzierte sich nach weiteren 18 Passagen um 60%. Das GFAP-Level von Klon T1440 cl8 nahm über neun Passagen um 20% zu. Nach weiteren 20 Passagen war das GFAP-Level in Klon T1440 cl8 so stark reduziert, dass mittels Western blot-Analyse kein GFAP detektiert werden konnte. Wie bereits in den analysierten T1338-Klonen ließ sich auch in den Klonen T1440 cl4, cl5 und cl8 keine Korrelation zwischen dem Expressionslevel von Sox2 in frühen Passagen und der Veränderung der GFAP-Expression über die Passagen erkennen (vergleiche Abb. 7, Abb. 21 A und Abb. 22). Der transiente Anstieg der GFAP-Expression schien mit einem Anstieg des Expressionslevels von Sox2 positiv zu korrelieren, allerdings korrelierte die Reduktion des GFAP-Levels mit zunehmender Passage nur in Klon T1440 cl5 mit der Reduktion des Sox2-Levels positiv. Im Fall der Klone T1440 cl4 und cl8 war ein weiterer Anstieg des Sox2-Levels bei gleichzeitiger Reduktion der GFAP-Expression zu beobachten. Somit schienen die Veränderungen der GFAP-Expression in den Klonen der T1440-Linie eher unabhängig von den Veränderungen der Sox2-Level aufzutreten.

Insgesamt war weder für die SLGC-Linie T1338, in der GFAP eher ein Differenzierungsmarker ist, noch für T1440, in der GFAP eher ein Marker für SLGCs ist, eine Korrelation zwischen dem Sox2-Level in frühen Passagen und der Veränderung des GFAP-Expressionslevels festzustellen. Darüber hinaus korrelierten die Veränderungen der Expressionslevel von GFAP und Sox2 nicht eindeutig miteinander.

In zwei von drei T1338-Klonen (T1338 cl2 und cl9) blieb die Tau-Expression nach fortlaufender Passagierung nahezu unverändert (Abb. 21 B). Im Gegensatz dazu kam es bei Klon T1338 cl6 zu einem stetigen Anstieg der Tau-Expression. Dabei stieg das Tau-Level über sieben Passagen um 65% an und um weitere 15% innerhalb von weiteren sieben Passagen. Der Klon T1338 cl6 war derjenige mit der geringsten Sox2-Expression (Abb. 5). Somit schien ein Anstieg der Tau-Expression mit zunehmender Passagenzahl in Klon T1338 cl6 mit einem relativ zur Mutterkultur geringen Sox2-Level in frühen Passagen zu korrelieren. Diese Beobachtung könnte auf eine neuronale Differenzierung in Klon T1338 cl6 hindeuten. Betrachtet man allerdings die Veränderung der Sox2-Expression im gleichen Zeitraum, so ist zu erkennen, dass ein Anstieg des Sox2-Levels zu beobachten war, was eher gegen eine Differenzierung spricht. In den Klonen T1338 cl2 und cl9 veränderte sich zwar das Expressionslevel von Sox2 mit fortlaufender Passagierung, allerdings blieb das Tau-Level unverändert, was eine neuronale Differenzierung eher ausschließt.

In den Extrakten der T1440-Klone variierte die Tau-Expression maximal um den Faktor 2 (Abb. 21 B). Zunächst wiesen die Klone T1440 cl4 und cl5 einen Anstieg auf, gefolgt von einer Reduktion. Dabei stieg die Tau-Expression in Klon T1440 cl4 über zehn Passagen um das 2-Fache, gefolgt von einer Reduktion um 15% nach weiteren 13 Passagen. Der Klon T1440 cl5 zeigte über neun Passagen einen Anstieg des Tau-Levels um 30% und nach weiteren 18 Passagen eine Reduktion um 35%, während in Klon T1440 cl8 die Tau-Expression über die Passagen kaum variierte. Im Fall von T1440 korrelierten die Veränderungen des Tau-Levels nicht mit der Sox2-Expression in frühen Passagen. Zudem ließ sich keine Korrelation zwischen den Veränderungen im Sox2- und Tau-Expressionslevel mit zunehmender Passagierung feststellen. Eine neuronale Differenzierung der T1440-Klone im untersuchten Zeitraum ist damit eher unwahrscheinlich.

Die Tau-Expression veränderte sich in zwei von drei Klonen der T1464-Linie (T1464 cl1 und cl6) nicht mit zunehmender Passagenzahl (Abb. 21 B). Im Gegensatz dazu war in Klon T1464 cl18 eine Reduktion der Tau-Expression um 25% über 13 Passagen zu verzeichnen. Es ließ sich keine Korrelation zwischen

der Veränderung im Expressionslevel von Tau und der Sox2-Expression in frühen Passagen feststellen. Auch korrelierten die Veränderungen der Sox2-Expression nicht mit denen der Tau-Expression, was eher gegen eine neuronale Differenzierung in Klonen der T1464-Linie spricht.

Insgesamt veränderte sich die Tau-Expression in vier der neun untersuchten Klone (T1338 cl6, T1440 cl4, T1440 cl5, T1464 cl18) mit fortlaufender Passagierung. Hierbei variierte das Expressionslevel von Tau im Fall des Klons T1440 cl4 um das 2-Fache, wohingegen die Variation in den Klonen T1338 cl6, T1440 cl5 und T1464 cl18 maximal 65% betrug. In den Klonen der SLGC-Linien T1440 und T1464 ließ sich keine Korrelation zwischen den Veränderungen im Tau-Level und der Sox2-Expression in frühen Passagen beobachten. Im Fall von T1338 schien der Anstieg der Tau-Expression mit zunehmender Passagenzahl in Klon T1338 cl6 mit einem geringen Sox2-Level zu korrelieren. Allerdings konnte in allen SLGC-Linien keine Korrelation zwischen Veränderungen der Tau-Expression und des Sox2-Levels festgestellt werden.

Im Fall der T1440-Linie scheint GFAP ein Marker für SLGCs zu sein. Aus diesem Grund wurde die GFAP-Expression über steigende Passagen exemplarisch für die Klone T1440 cl4 und cl8 mittels immunzytochemischer Analyse untersucht. Es erfolgte eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen GFAP und Nestin, ein Intermediärfilament, welches von neuralen Stamm- und Progenitorzellen (Michalczyk and Ziman, 2005) sowie von SLGCs (Chen et al., 2010; Choschzick et al., 2014) exprimiert wird.

Die Kulturen des Klons T1440 cl4 wiesen stets eine heterogene Zellpopulation auf (Abb. 23, oben). Hierbei waren sowohl Nestin/GFAP-doppeltpositive als auch Nestin-einfachpositive Zellen nachweisbar. GFAP-einfachpositive Zellen traten selten auf (< 1%). Zu Beginn (Passage 10) lag der Anteil Nestin/GFAP-doppeltpositiver Zellen des Klons T1440 cl4 bei ca. 60% und stieg zunächst innerhalb von sieben Passagen auf ca. 80%. Nach weiteren 15 Passagen sank der Anteil Nestin/GFAPdoppeltpositiver Zellen auf den Ausgangswert von 60%.



Abb. 23: GFAP-Expression in Kulturen von T1440-Klonen über steigende Passagen. Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α Nestin (grün), α GFAP (rot) und DAPI (blau) in T1440 cl4 und cl8 über verschiedene Passagen (p). Messbalken, 50 µm. – GFAP, glial fibrillary acidic protein; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

Auch in Klon T1440 cl8 wies nur eine Subpopulation von Zellen eine GFAP-Expression auf (Abb. 23, unten). In mehr als 99% der GFAP-positiven Zellen war eine Koexpression mit Nestin zu beobachten. In der frühen Passage (Passage 5) waren etwa 7% der Zellen des Klons T1440 cl8 Nestin/GFAP-doppeltpositiv. Anschließend war innerhalb von zehn Passagen ein drastischer Anstieg des Anteils Nestin/GFAP-doppeltpositiver Zellen auf 70% zu beobachten, gefolgt von einer noch stärkeren Reduktion der Anzahl Nestin/GFAP-doppeltpositiver Zellen auf 2% bis 3%. Zudem war zu beobachten, dass im Fall von T1440 cl8 die Intensität des GFAP-Signals in späten Passagen (Passage 35) deutlich reduziert war.

Insgesamt nahm die Anzahl GFAP-positiver Zellen in den Kulturen der Klone T1440 cl4 und cl8 zunächst mit steigender Passagenzahl zu, bevor es mit fortlaufender Passagierung zu einer, im Fall von Klon T1440 cl8 drastischen, Reduktion GFAP-positiver Zellen kam. Somit korrelierten die Beobachtungen aus der immunzytologischen Analyse mit den Daten aus der Western blot-Analyse.

Fazit – Veränderung von GFAP und Tau in Klonen

Es waren keine Korrelationen in den SLGC-Linien T1338, T1440 und T1464, mit Ausnahme des Klons T1338 cl6, zwischen der Veränderung des GFAP- bzw. des Tau-Levels der analysierten Klonkulturen und deren Sox2-Expression in frühen Passagen festzustellen. Zudem konnten keine Korrelationen zwischen den Veränderungen der Sox2- und GFAP- bzw. Tau-Expression beobachtet werden (siehe Anhang Tab. 22). Das deutet darauf hin, dass es in keiner dieser SLGC-Klonkulturen zu einer zunehmenden, glialen oder neuronalen Differenzierung kam. Allerdings nahm das GFAP-Level in Klonen der T1440-Linie nach einem transienten Anstieg mit zunehmender Passagenzahl zum Teil drastisch ab. Da GFAP im Fall von T1440 eher ein SLGC-Marker ist, würde das bedeuten, dass der Stammzellcharakter mit fortlaufender Passagierung reduziert wird. Jedoch wiesen die Klone T1440 cl4 und cl8 gleichzeitig einen Anstieg des Sox2-Levels auf, was eher für eine Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters spricht.

Außer einer neuralen Differenzierung in neuronale oder gliale Derivate, wäre auch eine endotheliale Differenzierung von SLGCs möglich (Ricci-Vitiani et al., 2007). Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde die Expression des endothelialen Markers CD31/PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule* 1) untersucht. Dazu wurde die Methode der Durchflusszytometrie genutzt, da diese Rückschlüsse auf den Anteil CD31-positiver Zellen in einer Kultur gibt. Der Anteil CD31-positiver Zellen der Klonkulturen ist in Abbildung 24 A, rechts, entsprechend der Sox2-Expression der Klone angeordnet. Die Klone wurden dabei hinsichtlich ihres Sox2-Levels absteigend sortiert.

Der Anteil CD31-positiver Zellen war zwischen den Mutterkulturen verschieden. Dabei wies die T1338-Kultur mit 10% den höchsten Anteil CD31-positiver Zellen auf, gefolgt von der T1495-Kultur mit 9%. In den Kulturen der SLGC-Linien T1440, T1452 und T1464 lag der Anteil CD31-positiver Zellen bei 4% (T1440, T1464) bzw. 6,5% (T1452) (Abb. 24, A). Der Anteil CD31-positiver Zellen variierte nicht nur zwischen den Mutterkulturen, sondern auch zwischen den Klonen, die sich von ein und derselben SLGC-Linie ableiteten.



Abb. 24: Anteil CD31-positiver Zellen in SLGC-Linien und Klonen. Durchflusszytometrische Analysen mit einem Antikörper gegen CD31 in Kulturen von (A) SLGC-Linien und Klonen (cl) sowie (B) Klonkulturen unterschiedlicher Passagen (p). Aufgetragen ist der Anteil CD31-positiver Zellen sowie ein systematischer Fehler von 10%. Messwerte für ein und denselben Klon sind im gleichen Farbton dargestellt. – CD31, PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule* 1); SLGC, *stem-like glioma cell*.

Im Fall von T1338 lag der Anteil CD31-positiver Zellen in Klon T1338 cl11 bei 1% und in den Klonen T1338 cl2, cl4, cl5 sowie cl9 zwischen 5% (cl1) und 7% (cl9) (Abb. 24 A). Im Vergleich dazu war der Anteil CD31-positiver Zellen in den Klonen T1338 cl6 und cl7 ähnlich dem der Mutterkultur (10%). Mit fortlaufender Passagierung stieg in fünf von sieben Klonkulturen der T1338-Linie der Anteil CD31positiver Zellen (T1338 cl2, cl4, cl5, cl6 und cl11; Abb. 24 B). Hierbei stieg der Anteil CD31-positiver Zellen in Klon T1338 cl2 nach vier Passagen von 6% auf 12% und nach weiteren 16 Passagen auf 15%. Im Fall des Klons T1338 cl4 war ein Anstieg des Anteils CD31-positiver Zellen von 7% auf 10% nach vier Passagen zu verzeichnen, gefolgt von einem weiteren Anstieg auf 13% über die folgenden elf Passagen. Der Anteil CD31-positiver Zellen stieg in Klon T1338 cl5 nach neun Passagen von 7% auf 13% und nach weiteren zwölf Passagen auf 19%. Der Klon T1338 cl11 zeigte den steilsten Anstieg des Anteils CD31positiver Zellen mit zunehmender Passagenzahl. Hierbei war ein Anstieg von 1% auf 7% nach drei Passagen zu verzeichnen und ein weiterer Anstieg auf 16% nach weiteren 13 Passagen. Hingegen blieb der Anteil CD31-positiver Zellen im Fall des Klons T1338 cl6 zunächst über vier Passagen nahezu unverändert (10%), bevor der Anteil innerhalb von elf Passagen auf 19% anstieg. Im Gegensatz dazu veränderte sich der Anteil CD31-positiver Zellen in den Klonkulturen T1338 cl7 und cl9 kaum mit steigender Passagenzahl.

In Klonkulturen der T1440-Linie war der Anteil CD31-positiver Zellen in zwei von vier Klonen höher als in der Mutterkultur (Mc: 4%; T1440 cl4: 7%; cl5: 8%) (Abb. 24 A). Der Anteil CD31-positiver Zellen in Klon T1440 cl8 lag bei 3% und im Fall des Klons T1440 cl5-1 unter 2%. Im Fall des Klons T1440 cl4 war ein Anstieg des Anteils CD31-positiver Zellen nach sieben Passagen von 3% auf 7% zu beobachten (Abb. 24 B). Im Gegensatz dazu war in Klon T1440 cl5 eine zunehmende Reduktion zu verzeichnen. Dabei fiel der Anteil CD31-positiver Zellen nach acht Passagen von 10% auf 8% und nach weiteren fünf Passagen auf 6%. Der Anteil CD31-positiver Zellen war in drei von fünf T1452-Klonen (T1452 cl10, cl15 und cl16) mit 9% höher als der Anteil der Mutterkultur (6,5%) (Abb. 24 A). Im Vergleich dazu war der Anteil CD31-positiver Zellen in Klon T1452 cl21 ähnlich dem der Mutterkultur, während in Klon T1452 cl155 0,1% der Zellen CD31-positiv waren. Ob sich der Anteil CD31-positiver Zellen mit zunehmender Passagenzahl ändert, wurde nicht untersucht.

Im Fall von T1495 war der Anteil CD31-positiver Zellen in Klon T1495 cl13 ähnlich dem der Mutterkultur (9%), während in den Klonen T1495 cl12, cl26 und cl37 der Anteil geringer war und bei 3% (T1495 cl12 und cl 37) bzw. 7% (cl26) lag (Abb. 24 A). Die Stabilität des Anteils CD31-positiver Zellen mit fortlaufender Passagierung wurde nicht analysiert.

Für die Klonkulturen der T1464-Linie wurde der Anteil CD31-positiver Zellen in dieser Arbeit nicht bestimmt.

<u>Fazit – CD31 in Klonen</u>

In allen untersuchten Klonkulturen der SLGC-Linien T1338, T1440, T1452 und T1495 konnte keine Korrelation zwischen dem Expressionslevel von Sox2 und dem Anteil CD31-positiver Zellen festgestellt werden. Im Fall von T1338 kam es in fünf von sieben Klonkulturen mit zunehmender Passage zu einem Anstieg des Anteils CD31-positiver Zellen (T1338 cl2, cl4, cl5, cl6 und c11), was auf eine endotheliale Differenzierung hindeuten könnte. Allerdings stieg im gleichen Zeitraum parallel dazu die Sox2-Expression in vier Klonen um mehr als 50% (T1338 cl4, cl5, cl6 und c11). Diese Beobachtung würde eher gegen eine Differenzierung sprechen. In den Klonen T1338 cl7 und cl9 blieb der Anteil CD31-positiver Zellen mit zunehmender Passage nahezu unverändert. Im Fall der T1440-Linie nahm der Anteil CD31-positiver Zellen in Klon T1440 cl4 zu, parallel dazu jedoch auch die Sox2-Expression. Der Klon T1440 cl5 wies eine stetige Reduktion des Anteils CD31-positiver Zellen mit fortlaufender Passagierung auf. Zudem ergaben die Analysen der SLGC-Linien T1338 und T1440 keine Korrelation zwischen den Veränderungen der GFAP- bzw. Tau-Level und der Variation des Anteils CD31-positiver Zellen mit 2011-positiver Zellen mit zunehmender Passagenzahl. Das deutet darauf hin, dass sich in den SLGC-Linien T1338 und T1440 eine neurale und endotheliale Differenzierung nicht gegenseitig ausschließen.

4.1.8. EGFR-, PDGFRα-, PDGFRβ- und PTEN-Expression

Um Hinweise zu erhalten, ob sich die Zellen innerhalb einer SLGC-Kultur nicht nur zellulär, sondern auch molekular unterscheiden, wurde die Expression von EGFR, PDGFR α , PDGFR β und PTEN mittels Western blot-Analysen bestimmt.

Alle T1338-Klone, außer T1338 cl1, wiesen eine geringere EGFR-Expression als die Mutterkultur auf (Abb. 25 B). Klon T1338 cl1 exprimierte ähnlich viel EGFR wie die Mutterkultur. In den Klonen T1338 cl2, cl4 und cl9 war die EGFR-Expression zwischen 30% und 40% reduziert, in den Extrakten der Klone T1338 cl3 und cl7 um die Hälfte (cl3) bzw. zwei Drittel (cl7). Im Vergleich dazu war die EGFR-Expression variierte zwischen 11338 cl6 und cl10 7-fach (cl6) bzw. 9-fach (cl10) reduziert. Die EGFR-Expression variierte zwischen den T1338-Klonen maximal um den Faktor 9, was eher auf eine Modulation der Expression als auf eine molekulare Heterogenität der T1338-Klone hinweist.



Abb. 25: EGFR-Expression in SLGC-Linien und Klonen. (A) Exemplarische Western blot-Analyse der EGFR-Expression in T1452- (oben) bzw. T1440- und T1495-Klonen (unten). Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Graphische Darstellung der EGFR-Expression in den Mutterkulturen (Mc) und Klonen (cl) der SLGC-Linien T1338, T1440, T1452, T1464 und T1495. Die Expression wurde gegen die der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Ein systematischer Fehler von 10% ist angegeben. – EGFR, *epidermal growth factor receptor;* SLGC, *stem-like glioma cell*.

Die EGFR-Expression der T1440-Klone variierte relativ zur Mutterkultur maximal um den Faktor 2. Im Fall des Klons T1440 cl5 war die EGFR-Expression um das 2-Fache erhöht und in Klon T1440 cl5-1 um 75%, während sich der Klon T1440 cl8 kaum von der Mutterkultur unterschied (+30%) und in Klon T1440 cl4 die EGFR-Expression um 45% geringer war auf (Abb. 25 A und B). Die Expressionslevel in der Mutterkultur und in den Klonen wiesen somit eher auf eine Modulation der EGFR-Expression als auf eine Heterogenität in der T1440-Kultur hin.

In Extrakten der T1452-Mutterkultur konnte, ebenso wie in Klon T1452 cl20, mit dem Antikörper kein Signal detektiert werden (Abb. 25 A und B). Alle anderen Klone wiesen eine EGFR-Expression auf. Der Klon T1452 cl15 zeigte die stärkste EGFR-Expression, T1452 cl16 die schwächste (ein Neuntel der EGFR-Expression von Klon T1452 cl15). Im Falle der Klone T1452 cl10, cl14, cl155 und cl21 war das EGFR-Level ähnlich. Im Vergleich zum Klon T1452 cl15 war das EGFR-Level in den Klonen T1452 cl14, cl155 und cl21 um die Hälfte und in Klon T1452 cl10 um 80% geringer. Damit ergab sich ein sehr starker Unterschied zwischen dem EGFR-Level der Klone T1452 cl15 und cl20, was darauf hindeuten könnte, dass in T1452 cl15 das *egfr*-Gen aufgrund genetischer oder epigenetischer Veränderungen überexprimiert war.

Im Fall von T1464 ließ die Expressionsanalyse eher auf eine Modulation der EGFR-Level in den Klonen schließen. So variierte die EGFR-Expression in sechs der acht T1464-Klone um maximal ein Viertel relativ zur Mutterkultur (Klon T1464 cl8 25% höher, Klone T1464 cl6, cl11 und cl16 20% bis 25% reduziert, Klone T1464 cl21 und cl27 nahezu unverändert) (Abb. 25 B). Nur in Klon T1464 cl1 und cl18 wichen die Expressionslevel stärker ab. Die EGFR-Expression des Klons T1464 cl1 war um 45% geringer

als die der Mutterkultur, die des Klons T1464 cl18 um 50%. Neben dem EGFR-Signal wiesen die T1464-Klone starke Signale kleinerer Proteinfragmente auf, die mit dem anti-EGFR-Antikörper detektiert und in den Klonen der übrigen, analysierten SLGC-Linien nicht beobachtet wurden (siehe Anhang Abb. 79). Bei den zusätzlichen Banden könnte es sich um verkürzte EGFR-Varianten handeln. Die Expression dieser Extrabanden variierte zwischen den Klonen. Der Klon T1464 cl18 wies das stärkste Signal auf, gefolgt von cl1, cl21 und cl16. Sollte es sich bei diesen Extrabanden um verkürzte EGFR-Varianten handeln, könnte die Expression dieser Varianten molekular heterogen sein.

Extrakte der T1495-Mutterkultur zeigten eine starke EGFR-Expression (Abb. 25 A und B). Der Klon T1495 cl13 war der einzige Klon, der ebenfalls eine hohe, wenn auch um 45% niedrigere, EGFR-Expression aufwies. Das EGFR-Level in den Extrakten der Klone T1495 cl4 und cl12 war im Vergleich zur Mutterkultur drastisch reduziert. Diese um einen Faktor >20 unterschiedliche EGFR-Expression ließ eine genetische oder epigenetische Heterogenität der Zellen in der T1495-Mutterkultur hinsichtlich des EGFR-Status vermuten.

Insgesamt legte die Analyse der EGFR-Expression die Vermutung nahe, dass in den Mutterkulturen der SLGC-Linien T1452 und T1495, nicht aber in T1338, T1440 und T1464, eine molekulare Heterogenität bezüglich des EGFR-Status zwischen den Zellen vorlag.



Abb. 26: PDGFR α - **und PDGFR** β -**Expression in SLGC-Klonen.** (**A**) PDGFR α -Expression bzw. (**B**) PDGFR β -Expression in SLGC-Mutterkulturen (Mc) und Klonen (cl). Die Expression wurde gegen die der Ladekontrolle α Tubulin bzw. Aktin normalisiert. Ein systematischer Fehler von 10% ist angegeben. – PDGFR α/β , platelet-derived growth factor receptor α bzw. β ; SLGC, stem-like glioma cell.

Die PDGFR α -Expression war in sieben der acht untersuchten T1338-Klone relativ zur Mutterkultur maximal um den Faktor 2 verschieden (Abb. 26 A). Dabei war das PDGFR α -Level in den Klonen T1338 cl4 und cl10 um 90% höher als in der Mutterkultur, in den Klonen T1338 cl6 und cl9 um 45% und in Klon T1338 cl3 um 20%. In Klon T1338 cl1 war das PDGFR α -Level im Vergleich zur Mutterkultur leicht reduziert (-25%). Der Klon T1338 cl2 wies eine ähnliche PDGFR α -Expression wie die Mutterkultur auf. T1338 cl7 war der einzige Klon, dessen PDGFR α -Expression stark von der der Mutterkultur abwich. In Klon T1338 cl7 war das PDGFR α -Level 7-fach erhöht. Die Expressionslevel der Mutterkultur und der Klone wiesen eher auf eine Modulation der PDGFR α -Expression als auf eine molekulare Heterogenität in der T1338-Kultur hin.

In den Extrakten der T1440-Mutterkultur sowie der Klone T1440 cl4, cl5 und cl5-1 konnte mit dem Antikörper kein PDGFR α -Signal detektiert werden, während in Klon T1440 cl8 eine PDGFR α -Expression

nachweisbar war (Abb. 26 A). Das deutet darauf hin, dass in Klon T1440 cl8 genetische oder epigenetische Veränderungen vorlagen, die zur Expression von PDGFR α führten.

Auch im Fall von T1495 könnte die PDGFRα-Expression in T1495 cl4 auf eine Heterogenität innerhalb der Mutterkultur hindeuten. Das PDGFRα-Level war in Klon T1495 cl4 20-mal höher als das der Mutterkultur (Abb. 26 A). Die anderen, untersuchten Klone (T1495 cl12 und cl13) waren hinsichtlich der PDGFRα-Expression der Mutterkultur ähnlich.

Die PDGFR α -Expression der T1452- und T1464-Klone wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Insgesamt kann anhand der Expressionsanalyse von PDGFR α vermutet werden, dass in T1440 und T1495, aber nicht in T1338, eine molekulare Heterogenität zwischen den Zellen vorlag. Allerdings ist zu beachten, dass die beobachteten PDGFR α -Signale eher schwach waren, was die Aussagekraft der Daten einschränken könnte.

Die PDGFRβ-Expression variierte zwischen den Klonen der T1338-Linie um maximal den Faktor 2 (Abb. 26 B). Der Klon T1338 cl9 wies eine ähnliche PDGFRβ-Expression wie die Mutterkultur auf, während das PDGFRβ-Level der restlichen, untersuchten Klone im Vergleich dazu reduziert war (T1338 cl1: - 25%; cl2, cl4, cl10: - 40%; cl3, cl6, cl7: -50%). Damit wies die Analyse der PDGFRβ-Expression eher auf eine Modulation der Expression in T1338 hin.

Auch im Fall der T1440-Linie war eher eine Modulation der PDGFR β -Expression als eine Heterogenität der Kultur vorhanden. Das PDGFR β -Level aller untersuchten Klone war maximal um die Hälfte geringer als das der Mutterkultur (Abb. 26 B). In den Klonen T1440 cl4, cl5 und cl5-1 war die PDGFR β -Expression um 50% reduziert und in Klon T1440 cl8 um 30%.

Das PDGFR β -Level war in den Klonen T1464 cl6 und cl21 im Vergleich zur Mutterkultur um die Hälfte reduziert, während die PDGFR β -Expression der restlichen, untersuchten Klone zwischen 30% und 3-fach höher war (T1464 cl1: +30%; cl11 und cl16: +50%; cl8: 2-fach; cl18: 3-fach; Abb. 26 B). Die Analyse der PDGFR β -Expression in T1464-Klonen ließ darauf schließen, dass das Level moduliert war.

Im Vergleich zu den anderen SLGC-Linien und den davon abgeleiteten Klonen zeigte die T1495-Mutterkultur eine sehr starke PDGFR β -Expression. Dieses deutet drauf hin, dass in T1495 das *pdgfr\beta*-Gen aufgrund von genetischen oder epigenetischen Veränderungen überexprimiert war. Die PDGFR β -Expression der Klone war um mindestens drei Viertel (T1495 cl4) geringer (Abb. 26 B). In den Klonen T1495 cl12 und cl13 war das PDGFR β -Level auf ein Achtel (cl12) bzw. ein Siebentel (cl13) reduziert. Damit lag im Falle von T1495 eher eine Modulation der PDGFR β -Expression vor als eine genetisch oder epigenetisch bedingte Deregulierung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PDGFR β -Expression der T1452-Klone nicht analysiert.

Insgesamt wiesen die Analysen der PDGFR β -Expression in T1338, T1440 und T1495 eher auf eine Modulation der Expression zwischen den Zellen der Kulturen hin, wobei die Variation der PDGFR β -Level zwischen den T1495-Klonen und der Mutterkultur stärker ausfiel als in T1338 oder T1440. Wie bereits für die Expressionsanalyse von PDGFR α ist zu beachten, dass auch die Expressionslevel von PDGFR β gering waren (außer in der T1495-Mutterkultur). Daher ist die Aussagekraft dieser Daten eingeschränkt.



Abb. 27: PTEN-Expression in SLGC-Klonen. Exemplarische Western blot-Analyse (links) und graphische Darstellung (rechts) der PTEN-Expression in der T1440- bzw. T1495-Mutterkultur (Mc) und den Klonkulturen (cl). Aktin diente als Ladekontrolle. Die Expressionen wurden auf die der jeweiligen Mutterkultur normiert, die als 1 definiert wurde. – PTEN, *phospatase and tensin homolog*; SLGC, *stem-like glioma cell*.

Eine PTEN-Expression war sowohl in der T1338-Mutterkultur als auch in allen untersuchten T1338-Klonen mit dem Antikörper und 15 µg Proteinextrakt pro Probe nicht zu detektieren (nicht gezeigt). Auch in T1452 konnte mit dem Antikörper weder in der Mutterkultur noch in den analysierten T1452-Klonen eine PTEN-Expression nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Eine Analyse der PTEN-Expression in T1464 und den davon abgeleiteten Klonen fand im dieser Arbeit nicht statt.

In den Extrakten der T1440-Mutterkultur und des Klons T1440 cl5-1 war ein ähnliches PTEN-Level nachweisbar (Abb. 27). Im Vergleich zur Mutterkultur wiesen die Klone T1440 cl4 und cl5 ein um die Hälfte reduziertes PTEN-Level auf, während in Klon T1440 cl8 mit dem Antikörper unter gleichen Bedingungen kein PTEN detektiert wurde. Die Variation legt die Vermutung nahe, dass die T1440-Klone hinsichtlich des PTEN-Status genetisch oder epigenetisch heterogen waren.

Die PTEN-Expression war in zwei T1495-Klonen ähnlich der der Mutterkultur (Klone T1495 cl4 und cl13) (Abb. 27). Im Falle des Klons T1495 cl12 war das PTEN-Level um die Hälfte reduziert, was genetisch oder epigenetisch bedingt sein könnte und auf eine molekulare Heterogenität der Zellen in der T1495-Mutterkultur hinwies.

Insgesamt wiesen die Expressionsanalysen von PTEN darauf hin, dass in den SLGC-Linien T1440 und T1495 Zellen vorhanden waren, die sich hinsichtlich ihres PTEN-Status molekular unterschieden.
Klone	EGFR	PDGFRα	PDGFRβ	PTEN
T1338 cl1	М	М	М	0
T1338 cl2	М	М	М	0
T1338 cl3	М	М	М	0
T1338 cl4	М	М	М	0
T1338 cl6	M? (7x)	М	М	0
T1338 cl7	М	M? (7x)	М	0
T1338 cl9	М	М	М	0
T1338 cl10	M? (9x)	М	Μ	0
T1440 cl4	М	0	М	Н
T1440 cl5	М	0	Μ	Н
T1440 cl5-1	М	0	М	Μ
T1440 cl8	Μ	Н	Μ	Н
T1452 cl10	Н	n.d.	n.d.	0
T1452 cl14	Н	n.d.	n.d.	0
T1452 cl15	Н	n.d.	n.d.	0
T1452 cl155	Н	n.d.	n.d.	0
T1452 cl16	Н	n.d.	n.d.	0
T1452 cl20	Μ	n.d.	n.d.	0
T1452 cl21	Н	n.d.	n.d.	0
T1464 cl1	Μ	n.d.	Μ	n.d.
T1464 cl6	М	n.d.	Μ	n.d.
T1464 cl8	Μ	n.d.	Μ	n.d.
T1464 cl11	Μ	n.d.	Μ	n.d.
T1464 cl16	Μ	n.d.	Μ	n.d.
T1464 cl18	Μ	n.d.	Μ	n.d.
T1464 cl21	Μ	n.d.	Μ	n.d.
T1464 cl27	М	n.d.	М	n.d.
T1495 cl4	Н	Н	Μ	Μ
T1495 cl12	Н	М	M? (8x)	Н
T1495 cl13	М	Μ	M? (7x)	Μ

Tab. 14: Unterschiede der EGFR-, PDGFRα-, PDGFRβ- und PTEN-Expression in Klonen.

Interpretation der Expressionsanalysen von EGFR, PDGFR α , PDGFR β und PTEN in Klonen im Vergleich zur jeweiligen Mutterkultur. Die Zellen von T1338 und T1464 wiesen eher eine Modulation (M) der Proteinexpression als eine molekulare Heterogenität (H) auf. – EGFR, *epidermal growth factor receptor*; PDGFR α/β , *platelet-derived growth factor receptor* α bzw. β ; PTEN, *phospatase and tensin homolog*; 0, keine Expression nachweisbar; n.d., nicht bestimmt; 7x/8x/9x, Variation der Expression um den Faktor 7, 8 bzw. 9 relativ zur Mutterkultur; SLGC, *stem-like glioma cell*.

Fazit – EGFR, PDGFRα, PDGFRβ und PTEN in Klonen

Die Expressionsanalysen deuteten darauf hin, dass die Zellen der SLGC-Linien T1338 und T1464 in ihrer Expression von EGFR, PDGFR α , PDGFR β bzw. PTEN eher moduliert waren und keine molekulare Heterogenität vorlag. Hingegen waren die Klone der SLGC-Linien T1440, T1452 und T1495 in der Expression mindestens eines Proteins molekular heterogen. Die Analysen der T1440-Klone wiesen auf eine Modulation der EGFR- und PDGFR β -Expression hin, während die PDGFR α - und PTEN-Level auf eine Heterogenität schließen ließen. Hierbei war Klon T1440 cl8 sowohl in der PDGFR α - als auch in der PTEN-Expression deutlich von der Mutterkultur und den restlichen, untersuchten Klonen verschieden. Die Klone T1440 cl4 und cl5 unterschieden sich ausschließlich im PTEN-Status von der Mutterkultur. Die Klone der T1452-Linie zeigten einen homogenen PTEN-Status, während die EGFR-Expression relativ zur Mutterkultur (Ausnahme T1452 cl20) in den Klonen stark variierte. Die SLGC-Linie T1495 schien stark heterogen in der EGFR-, PDGFR α -, PDGFR β - und PTEN-Expression zu sein. Während der Klon T1495 cl13 höchstens in der PDGFR β -Expression im Vergleich zur Mutterkultur verschieden war, waren die Klone T1495 cl4 und cl12 in mehr als einem Protein deutlich unterschiedlich. Hierbei war die EGFR-Expression in Klon T1495 cl4 20-fach reduziert und die PDGFR α -Level 20-fach erhöht, während in Klon T1495 cl12 zwar ebenfalls die EGFR-Expression deutlich geringer war als die der Mutterkultur (30-fach), aber nicht die PDGFR α -Expression verändert, sondern eher die PDGFR β -Expression (8-fach) reduziert und das PTEN-Level halbiert war. Damit legten die Expressionsanalysen der Klone die Vermutung nahe, dass eine Deregulierung der EGFR-, PDGFR α -, PDGFR β - bzw. PTEN-Expression vorlag, die genetisch oder epigenetisch bedingt sein könnte. Die Zellen der SLGC-Linien T1440, T1452 und T1495 wiesen somit für EGFR, PDGFR α , PDGFR β und/oder PTEN eine molekulare Heterogenität auf.

4.2. Radio- und Chemosensitivität stammzellähnlicher Gliomzellen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden SLGC-Linien und von diesen abgeleitete Klone mit Photonenstrahlung, Temozolomid (TMZ) oder einer Kombination aus beidem behandelt. Zwei SLGC-Linien (T1440, T1522) wiesen ein Wildtyp-p53-Gen auf, vier (T1371, T1442, T1447 Klon 4, T1495) ein mutiertes p53-Gen. Die p53-Mutationen dieser vier SLGC-Linien unterschieden sich voneinander und sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Zu Beginn wurde die Phosphorylierung von ATM, Chk1, Chk2 und H2AX mittels Western blot-Analysen untersucht. Weiterhin wurde die Expression der *downstream* Faktoren p53 und p21^{Cip1/WAF1} in Abhängigkeit von der Behandlung ermittelt. Bei diesen Analysen wurde ein Zeitraum von fünf Tagen untersucht, um Auskunft über Effekte in den Früh- und Spätphasen zu gewinnen. Zudem wurden die Auswirkungen der Behandlungen auf die Zellvitalität (MTT-Assay), den Zellzyklus (durchflusszytometrische Analyse Propidiumiodid-markierter Zellen) und die Apoptose (TUNEL-Analyse) untersucht. Um zu prüfen, ob die Behandlungen zur Anreicherung von Zellen mit einem hohen Stammzellcharakter führen, wurde die Expression von stammzellassoziierten Faktoren (Sox2, Nestin, CD133, FABP7) mittels immunzytologischer Färbungen, Western blot-Analysen bzw. qRT-PCR analysiert.

<u>4.2.1. Phosphorylierung in ATM, Chk1, Chk2 und γH2AX sowie Expression von p53 und p21 ^{Cip1/WAF1} nach</u> Bestrahlung mit 10, 20 bzw. 25 Gray

Um zu untersuchen, ob die strahleninduzierte Phosphorylierung der Zielproteine vom p53-Status abhängt, wurden SLGC-Linien mit einer Dosis zwischen 10 Gy und 25 Gy bestrahlt und anschließend Western blot-Analysen mit Antikörpern gegen die betreffende, post-translationale Modifizierung durchgeführt (Beispiele siehe Anhang Abb. 80). Die Wahl der Strahlendosis für die verschiedenen SLGC-Linien basierte auf den im Labor durchgeführten Dosis-Wirkungskurven (Dorenberg, Dissertation). Die applizierte Strahlendosis orientierte sich an der Dosis, die die Proliferation um 50% reduzierte [ED₅₀]. In den Liniendiagrammen zum Grad der Phosphorylierung über mehrere Tage, sind die SLGC-Linien mit einem Wildtyp-p53-Gen (p53_{wt}-Linien) in Schwarz (T1440) bzw. Grau (T1522) und die mit einem mutierten p53-Gen (p53_{mut}-Linien) in Rot (T1442) bzw. Orange (T1447 cl4) dargestellt.

Die Serin-/Threoninkinase ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*; 350 kDa) bindet an strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche und wird durch Phosphorylierung an dem Aminosäurerest Serin 1981 aktiviert (Bohgaki et al., 2010).

Eine Phosphorylierung am Serylrest S1981 der Kinase ATM (pATM^{Ser1981}) war bereits in den unbehandelten SLGC-Kulturen nachweisbar, wobei sich der Grad der Phosphorylierung zwischen den SLGC-Linien unterschied (Abb. 28 A und B). Hierbei wies T1522 das geringste pATM^{Ser1981}-Level auf. In T1440 war das pATM^{Ser1981}-Level ebenfalls sehr gering. Im Vergleich dazu wiesen T1442 und T1447 cl4 deutlich mehr pATM^{Ser1981} (10-fach (T1442) bzw. 5-fach (T1447 cl4) relativ zur T1440-Linie) auf. Im Fall von T1440 war 6 h nach der Bestrahlung ein 2-facher Anstieg des pATM^{Ser1981}-Levels zu verzeichnen. Am Tag d1 war das pATM^{Ser1981}-Level um 25% gesunken. Am Tag d2 und d3 kam es zu einer weiteren Reduktion (d2: -15%; d3: -80%), sodass das pATM^{Ser1981}-Level am Tag d3 um 75% geringer war als in der unbehandelten T1440-Kultur. Auch die zweite p53_{WT}-Linie T1522 zeigte einen transienten Anstieg des Phospho-ATM-Levels, der nach 6 h das Maximum erreichte (6 h: 5-fach relativ zur Kontrolle). Nach dem Erreichen des Peaks nach 6 h reduzierte sich das pATM^{Ser1981}-Level über die nächsten Tage. Am Tag d1 war das pATM^{Ser1981}-Level um 35% gesunken, am Tag d2 um weitere 15%. An den Tagen d3 und d4 reduzierte sich das pATM^{Ser1981}-Level weiter (d3: -20%; d4: -25%). Vom Tag d4 an blieb das

pATM^{Ser1981}-Level unverändert und lag etwa 80% über dem Ausgangsniveau der unbehandelten T1522-Kultur. Die p53-GOF (*gain-of-function* – Mutante) T1442 wies 6 h nach der Bestrahlung einen Anstieg des pATM^{Ser1981}-Levels um 20% auf. Allerdings stieg das pATM^{Ser1981}-Level am Tag d1 um weitere 40%. Am Tag d2 kam es zu einer Reduktion des pATM^{Ser1981}-Levels auf das Ausgangsniveau. Bis zum Tag d4 nahm das pATM^{Ser1981}-Level weiter ab (-30%) und verharrte bis zum Tag d5 auf diesem Level. Der Klon T1447 cl4, der eine p53-*missense*-Mutation trägt, zeigte 6 h nach der Bestrahlung einen transienten Anstieg des pATM^{Ser1981}-Levels um 85%, gefolgt von einer kontinuierlichen Reduktion des pATM^{Ser1981}-Levels über die nächsten Tage (d1: -10%; d2: -30%; d4: -30; d5: -60%). Das pATM^{Ser1981}-Level am Tag d5 war 65% geringer im Vergleich zur unbehandelten Kultur des Klons T1447 cl4.



Abb. 28: Veränderung des Phosphorylierungsgrads von ATM (pATM^{Ser1981}) nach Bestrahlung mit Photonen. Zeitlicher Verlauf über fünf Tage nach Einzeitbestrahlung mit zelllinienspezifischen Dosen von 10 Gy (T1522), 20 Gy (T1442, T1447 cl4) oder 25 Gy (T1440). Die Strahlendosis orientierte sich an der ED₅₀. (A) Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen. Das pATM^{Ser1981}-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) bzw. Aktin normalisiert. (B) Exemplarische Western blot-Analyse des pATM^{Ser1981}-Levels in der T1522-Mutterkultur (oben) und dem Klon T1447 cl4 (unten). GAPDH bzw. Aktin diente als Ladekontrolle. – pATM/pATM(Ser1981), am Serylrest S1981 phosphoryliertes ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*); C, Kontrolle; h, Stunde; d, Tag.

Insgesamt zeigten alle vier SLGC-Linien einen Anstieg der pATM^{Ser1981}-Phosphorylierung innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung, die nur im Fall von T1442-R248W bis zum Tag d1 weiter zunahm. In allen übrigen Fällen war bereits am Tag d1 eine Reduktion der Phosphorylierung zu verzeichnen, die über die nächsten Tage kontinuierlich abnahm. Nur im Fall von T1522 war die Phosphorylierung am Tag d5 nach der Bestrahlung im Vergleich zur unbehandelten Kultur weiterhin erhöht. In den übrigen Zelllinien war das pATM^{Ser1981}-Level nach fünf Tagen geringer als in der Kontrolle. Der initiale Anstieg der pATM^{Ser1981}-Phosphorylierung fiel in T1442-R248W am schwächsten und in T1522 (p53_{WT}) am stärksten aus. Dabei war die Induktion in den p53_{WT}-Linien (T1440, T1522) stärker als in p53_{mut}-Linien (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D). Die Veränderungen des pATM^{Ser1981}-Expressionslevels über die folgenden vier Tage schienen allerdings unabhängig vom p53-Status zu sein. Die applizierte Bestrahlungsdosis schien zwar keinen Einfluss auf die Induktion der Phosphorylierung zu haben, jedoch einen Einfluss auf die Induktion der Phosphorylierung zu haben, jedoch einen Einfluss auf die Reduktion des pATM^{Ser1981}-Levels. In T1522 (mit 10 Gy bestrahlt) fiel die Reduktion des pATM^{Ser1981}-Levels über die Tage deutlich schwächer aus als in T1442-R248W, T1447 cl4-N239D (beide mit 20 Gy bestrahlt) oder T1440 (mit 25 Gy bestrahlt). Die stärkste Reduktion war in der T1440-Kultur (mit 25 Gy bestrahlt) zu verzeichnen.

Die Serin-/Threoninkinasen *checkpoint kinase* 1 (Chk1, 54 kDa) und *checkpoint kinase* 2 (Chk2, 61 kDa) sind Regulatoren der Zellzyklusprogression und zumindest in einigen Systemen Zielproteine von ATM (Abraham, 2001; Kastan and Bartek, 2004). Wiederum werden diese Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert. Dabei ist die Phosphorylierung am Serylrest S317 von Chk1 bzw. am Serylrest S19 von Chk2 kritisch für die Aktivität der Kinasen (Leung-Pineda et al., 2006; Ropolo et al., 2009). Um die strahleninduzierte Aktivierung von Chk1 und Chk2 zu untersuchen, wurden Western blot-Analysen mit Antikörpern spezifisch für die post-translationale Modifizierung durchgeführt.



Abb. 29: Veränderung des Phosphorylierungsgrads von Chk1 und Chk2 nach Bestrahlung mit Photonen. Zeitlicher Verlauf über fünf Tage nach Einzeitbestrahlung mit zelllinienspezifischen Dosen von 10 Gy (T1522), 20 Gy (T1442, T1447 cl4) oder 25 Gy (T1440). Die Strahlendosis orientierte sich an der ED₅₀. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen. Das pChk1^{Ser317}. (A) und das pChk2^{Ser19}. (B) Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. – pChk1, am Serylrest S317 phosphorylierte Chk1 (*checkpoint kinase* 1); pChk2, am Serylrest S19 phosphorylierte Chk2 (*checkpoint kinase* 2).

Eine Phosphorylierung am Serylrest S317 der Kinase Chk1 (pChk1^{Ser317}) war lediglich in den Kontrollen der SLGC-Kulturen T1440, T1442 und T1447 cl4 nachweisbar (Abb. 29 A) In Extrakten der T1522-Mutterkultur war kein pChk1^{Ser317}-Signal zu detektieren, wenn 15 µg Proteinextrakt pro Spur aufgetrennt wurden. Mit Extrakten der Zelllinien T1440 und T1442 wurde unter identischen Bedingungen ein schwaches pChk1^{Ser317}-Signal erhalten. Im Vergleich dazu war das pChk1^{Ser317}-Signal für den Klon T1447 cl4 7-fach höher. Mit Ausnahme von T1522 wurde in allen Zelllinien nach der Bestrahlung eine Zunahme der Phosphorylierung an Chk1 gemessen, die nach 6 h ein Maximum erreichte und nach 24 h bereits wieder deutlich reduziert war. Im Detail zeigte die T1440-Mutterkultur 6 h nach der Bestrahlung einen 6-fachen Anstieg des pChk1^{Ser317}-Levels. Am Tag d1 war das pChk1^{Ser317}-Level um 70% reduziert, stieg am Tag d2 um 40% an und fiel am Tag d3 um 85%. Somit sank das pChk1^{ser317}-Level auf etwa ein Drittel des Ausgangswerts. Für die p53-Mutante T1442 stieg das pChk1^{Ser317}-Level 6 h nach der Bestrahlung um das 14-Fache an. Von Tag d1 an kam es zu einer kontinuierlichen Reduktion des pChk1^{Ser317}-Levels (d1: -40%; d2: -65%) bis am Tag d4 kein pChk1^{Ser317}-Signal zu detektieren war. Der Klon T1447 cl4 (p53-Mutante) wies ebenfalls innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung einen transienten Anstieg des pChk1^{Ser317}-Levels auf (relativ zur Kontrolle 2-fach erhöht). Das pChk1^{Ser317}-Level wurde zunächst bis zum Tag d2 reduziert (d1: -40%; d2: -75%), bevor es am Tag d4 zu einem erneuten, transienten Anstieg des pChk1^{Ser317}-Levels kam (d4: +50%), gefolgt von einer Reduktion um 55% am Tag d5. Somit war im Fall des Klons T1447 cl4 das pChk1^{Ser317}-Level am Tag d5 nach der Bestrahlung 75% geringer als in der unbehandelten Kultur.

Insgesamt war in Extrakten der SLGC-Linien T1440, T1442-R248W und T1447 cl4-N239D, in denen ein pChk1^{Ser317}-Signal detektiert wurde, ein strahleninduzierter, transienter Anstieg des Grads der Phosphorylierung von Chk1 mit einem Maximum nach 6 h zu verzeichnen. Der Anstieg des Phosphorylierungslevels fiel für den Klon T1447 cl4-N239D am schwächsten und für die Mutterkultur T1442-R248W am stärksten aus. Bereits nach 48 h war das pChk1^{Ser317}-Level drastisch reduziert und lag bei dem Klon T1447 cl4-N239D, nicht aber den anderen Linien, unterhalb des Ausgangswerts. Im Fall von T1440 und T1442-R248W wurde das Ausgangsniveau am Tag d3 (T1440) bzw. d4 (T1442-R248W) unterschritten. Der p53-Status schien nicht mit dem Grad der Phosphorylierung von Chk1 zu korrelieren. Möglicherweise gab es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der verwendeten Bestrahlungsdosis und der Induktion der Phosphorylierung von Chk1, da lediglich für T1522 (bestrahlt mit 10 Gy) kein pChk1^{Ser317}-Signal nachgewiesen werden konnte. Es ließ sich keine eindeutige Korrelation zwischen der Reduktion des pChk1^{Ser317}-Levels und dem p53-Status bzw. der applizierten Bestrahlungsdosis feststellen.

Im Gegensatz zur aktivierten Chk1 war die aktivierte Chk2 in allen vier untersuchten SLGC-Linien nachweisbar. Dabei wurden geringe Level von pChk2^{Ser19} in allen Kontrollen detektiert, die nach Bestrahlung in allen Fällen sehr deutlich anstiegen (Abb. 29 B). Die Level an phosphorylierter Chk2 unterschieden sich in den unbehandelten SLGC-Kulturen kaum. Dagegen wurden Unterschiede in der Effizienz der Induktion der Phosphorylierung am Serylrest S19 festgestellt. So wies die Zelllinie T1440 innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung einen Anstieg des pChk2^{Ser19}-Levels um das 7-Fache auf. Am Tag d1 war das pChk2^{Ser19}-Level um 30% reduziert, sank bis zum Tag d2 zunächst nicht weiter ab. Am Tag d3 war das pChk2^{Ser19}-Level deutlich reduziert (-55% relativ zum Tag d2), betrug aber noch das Doppelte des Levels der unbehandelten Kontrolle. Ebenso war in den Extrakten der zweiten p53_{WT}-Linie (T1522) ein transienter Anstieg der Phosphorylierung von Chk2 zu verzeichnen (18-fach relativ zur Kontrolle). Das pChk2^{ser19}-Level wurde am Tag d1 um 20% und am Tag d4 um 25% reduziert, sodass der Grad der Phosphorylierung von Chk2 am Tag d5 nach der Bestrahlung 10-fach höher war als in der unbehandelten Kultur. Im Gegensatz dazu kam es in T1442 (p53-GOF) 6 h nach der Bestrahlung zu einem transienten Anstieg des pChk2^{Ser19}-Levels um das 10-Fache relativ zur Kontrolle, gefolgt von einer kontinuierlichen Reduktion der Phosphorylierung von Chk2 über alle Tage (d1: -35%; d2: -15%; d4: -45%; d5: -15%). Allerdings sank das pChk2^{Ser19}-Level nicht auf den Ausgangswert, sondern blieb etwa doppelt so hoch. Ähnlich verhielt es sich in den Extrakten des Klons T1447 cl4 (p53-missense-Mutation). In dieser SLGC-Linie nahm der Grad der Phosphorylierung um das 20-Fache zu, gefolgt von einer kontinuierlichen Reduktion des pChk2^{Ser19}-Levels bis zum Tag d5 (d1: -35%; d2: -35%; d4: -60%; d5: -45%). Auch im Fall des Klons T1447 cl4 blieb das pChk2^{Ser19}-Level im Vergleich zur Kontrolle erhöht (+70%).

Insgesamt zeigten sowohl die beiden p53_{WT}- als auch die beiden p53_{mut}-Linien innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung eine Induktion der Phosphorylierung der Chk2 am Serylrest S19. Ab dem Tag d1 kam es im Fall von T1442-R248W und Klon T1447 cl4-N239D zu einer kontinuierlichen Reduktion des pChk2^{Ser19}-Levels über fünf Tage. Deutlich verzögert war die Reduktion des pChk2^{Ser19}-Levels für die beiden p53_{WT}-Linien. Dabei wurde für T1440 von Tag d2 zum Tag d3 eine deutliche Senkung (-55%) beobachtet (von 6h zu d3: -70%), während das Level im Fall von T1522 über den gesamten Zeitraum von fünf Tagen nur um 40% sank. In allen Linien blieb das pChk2^{Ser19}-Level über den gesamten Messzeitraum im Vergleich zur unbehandelten Kultur erhöht, dabei besonders stark in der T1522-Linie. Die applizierte Strahlendosis scheint keinen Einfluss auf die Induktion der Phosphorylierung von Chk2

zu haben, könnte jedoch für den Unterschied in der Reduktion des pChk2^{Ser19}-Levels zwischen T1440 (bestrahlt mit 25 Gy) und T1522 (bestrahlt mit 10 Gy) verantwortlich sein.

Die oben beschriebenen Daten zeigten, dass es in allen vier SLGC-Linien zur strahleninduzierten Phosphorylierung der Kinasen ATM und Chk2 kam. Zudem wurde in drei Linien (T1440, T1442, T1447 cl4) ebenfalls die Kinase Chk1 phosphoryliert. Um zu prüfen, ob sich die Expression von p53 und dem p53-Zielgen und Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1/WAF1} ebenfalls verändert, wurden mit den gleichen Proteinextrakten Western blot-Analysen mit Antikörpern gegen Regionen vom p53 bzw. p21^{Cip1/WAF1}, die weder mutiert noch phosphoryliert sind, durchgeführt.



Abb. 30: Veränderung der Expression von p53 und p21 nach Bestrahlung mit Photonen. Zeitlicher Verlauf über fünf Tage nach Einzeitbestrahlung mit zelllinienspezifischen Dosen von 10 Gy (T1522), 20 Gy (T1442, T1447 cl4) oder 25 Gy (T1440). Die Strahlendosis orientierte sich an der ED₅₀. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen. Die p53- (A) und p21- (B) Expression wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. (C) Exemplarische Western blot-Analysen der p53- (oben und mittig) und p21- (unten) Expression. Aktin diente als Ladekontrolle. – p53, Tumorsuppressorprotein p53; p21, Zellzyklusregulator p21^{Cip1/WAF1}; C, Kontrolle; h, Stunde; d, Tag.

Die p53-Expression war in den Kontrollen der beiden p53_{wT}-Linien (T1440, T1522) sehr gering und an der Nachweisgrenze des Antikörpers, wohingegen beide p53_{mut}-Linien (T1442, T1447 cl4) bereits hohe p53-Level in den Kontrollen aufwiesen (Abb. 30 A und C). Hierbei war die p53-Expression in Extrakten des Klons T1447 cl4 doppelt so hoch wie in T1442. Im Fall von T1440 stieg das p53-Level 6 h nach der Bestrahlung um das 35-fache an, fiel dann bis zum Tag d1 wieder ab (-35% an d1 relativ zum p53-Level nach 6 h). Am Tag d2 blieb das p53-Level in etwa konstant und wurde bis zum Tag d3 erneut reduziert (-40%). Somit war die p53-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kultur am Tag d3 nach der Bestrahlung 15-fach erhöht. In Extrakten der T1522-Linie stieg das p53-Level innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung transient auf das 20-Fache des Ausgangswerts an. Am Tag d1 war das p53-Level bereits um die Hälfte reduziert, sank in den nächsten Tagen nur noch langsam, aber stetig und erreichte am Tag d5 das 3-Fache der Expression der Kontrolle. Die p53-GOF T1442 zeigte trotz des bereits basal hohen p53-Levels einen Anstieg der p53-Expression mit einem Peak am Tag d1. Nach 6 h stieg das p53-Level um das 2,5-Fache an, nahm bis zum Tag d1 weiter um 35% zu und blieb bis zum Tag d2 nahezu unverändert. Die p53-Expression reduzierte sich von Tag d2 zu Tag d4 um 50% und erreichte am Tag

d5 nach der Bestrahlung ein Level, das 50% höher war als in der unbehandelten Kultur. Im Fall der anderen p53-Mutante wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. So stieg auch im Fall des Klons T1447 cl4 die initial hohe p53-Expression innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung um 20% an und erreichte das Maximum am Tag d1 (+25% Anstieg relativ zum p53-Level nach 6 h). Das Expressionslevel von p53 blieb auch an den folgenden Tagen auf dem erhöhten Niveau, obwohl es transient zu einer geringen Senkung der p53-Expression kam (d2: -20% relativ zu d1). Am Tag d5 nach der Bestrahlung war das p53-Level leicht reduziert (-25% relativ zu d4) und ähnlich hoch wie in der unbehandelten Kontrolle.

Insgesamt zeigten sowohl die p53_{WT}- als auch die p53_{mut}-Linien einen Anstieg der p53-Expression, jedoch mit deutlichen Unterschieden in den Verläufen. Erstens war der Anstieg des p53-Levels in den p53-Mutanten (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D) deutlich geringer als in den p53_{WT}-Linien (T1440, T1522). Zweitens erreichte die p53-Expression in den p53_{WT}-Linien das Maximum nach 6 h, in den p53_{mut}-Linien dagegen erst nach ein bis zwei Tagen. Drittens sank das p53-Level in den p53_{WT}-Linien nach dem Erreichen des Maximums deutlich schneller als in den p53_{mut}-Linien. Im Fall der p53_{WT}-Linien könnte die applizierte Dosis (für T1440 25 Gy; für T1522 10 Gy) mit der Stärke des Anstiegs 6 h nach der Bestrahlung sowie der Höhe des p53-Levels am Tag d5 relativ zur Kontrolle korrelieren.

Mit Ausnahme von T1440 wurden in den Western blots der unbehandelten, proliferierenden SLGC-Kulturen nur sehr schwache Signale des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1/WAF1} detektiert (Abb. 30 B und C). Hierbei war die p21^{cip1/WAF1}-Expression in der T1440-Linie 3- bis 5-mal höher als in T1522, T1442 und T1447 cl4. In allen Zelllinien kam es nach Bestrahlung zu einem Anstieg des p21^{Cip1/WAF1}-Levels, mit deutlichen Unterschieden hinsichtlich der Maxima und zeitlichen Verläufe. Im Fall von T1440 wurde bereits 6 h nach der Bestrahlung das p21^{Cip1/WAF1}-Level um das 5,5-Fache erhöht. Am Tag d1 war das p21^{Cip1/WAF1}-Level bereits wieder um 25% reduziert und nahm bis zum Tag d2 um weitere 30% ab. Von Tag d2 zu Tag d3 fiel die p21^{Cip1/WAF1}-Expression so stark, dass sie um 85% geringer war als in der unbehandelten T1440-Kontrolle. Im Fall der zweiten p53_{WT}-Linie T1522 kam es 6 h nach der Bestrahlung zu einem 8,5-fachen Anstieg der p21^{Cip1/WAF1}-Expression, die über 48 h nahezu unverändert blieb und am Tag d3 um 25% sank. Am Tag d4 war die p21^{Cip1/WAF1}-Expression im Vergleich zum Vortrag um fast die Hälfte reduziert (-45%) und erreichte am Tag d5 nach der Bestrahlung das Ausgangsniveau. Die Induktion der p21^{Cip1/WAF1}-Expression relativ zur unbehandelten Kontrolle war in den beiden p53_{mut}-Linien ähnlich effizient wie in den p53_{wt}-Linien. So wies T1442 einen 9-fachen Anstieg des p21^{Cip1/WAF1}-Levels 6 h nach der Bestrahlung auf, das sich bis zum Tag d1 weiter um das Doppelte erhöhte und auf diesem Level bis zum Tag d2 verharrte. Am Tag d3 setzte die Reduktion des p21^{Cip1/WAF1}-Levels ein, das am Tag d4 relativ zum Tag d2 um 55% geringer war und bis zum Tag d5 auf das 4-Fache der p21^{Cip1/WAF1}-Expression in der unbehandelten Kontrolle sank. Im Fall des Klons T1447 cl4 war die Induktion des p21^{Cip1/WAF1}-Levels weniger effizient. Bei dieser p53-Mutante stieg die p21^{Cip1/WAF1}-Expression 6 h nach der Bestrahlung um das 5-Fache und stieg bis zum Tag d2 nur noch gering (+25% relativ zum p21^{Cip1/WAF1}-Level nach 6 h). Anschließend reduzierte sich die p21^{Cip1/WAF1}-Expression kontinuierlich und erreichte am Tag d5 ein Viertel des Levels in der Kontrolle.

Insgesamt zeigten sowohl die p53_{WT}- als auch die p53_{mut}-Linien 6 h nach der Bestrahlung einen Anstieg der p21^{Cip1/WAF1}-Expression. In drei SLGC-Linien (T1440, T1522, T1447 cl4-N239D) erreichte die p21^{Cip1/WAF1}-Expression ihr Maximum nach 6 h und blieb im Fall von zwei Linien (T1522, T1447 cl4-N239D) zwischen 6 h und 48 h auf diesem Expressionslevel, das im Fall der p53-Mutante T1447 cl4-N239D unter dem der p53_{WT}-Linie T1522 lag. Die andere p53_{mut}-Linie (T1442-R248W) erreichte den

Peak des p21^{Cip1/WAF1}-Levels erst nach 24 h und reduzierte dieses ab dem Tag d3. Eine Korrelation zwischen der applizierten Strahlendosis und dem Anstieg des p21^{Cip1/WAF1}-Levels bzw. dessen Veränderung über fünf Tage wurde nicht festgestellt.

Um zu untersuchen, ob die Bestrahlung der Zelllinien mit der ED_{50} eine Phosphorylierung des Histons H2AX (15 kDa) am Serylrest S139 auslöst (kurz als γ H2AX bezeichnet) (Ivashkevich et al., 2012), wurden Western blot-Analysen durchgeführt.



Abb. 31: Veränderung des Phosphorylierungsgrads von H2AX (γ H2AX) nach Bestrahlung mit Photonen. Zeitlicher Verlauf über fünf Tage nach Einzeitbestrahlung mit zelllinienspezifischen Dosen von 10 Gy (T1522), 20 Gy (T1442, T1447 cl4) oder 25 Gy (T1440). Die Strahlendosis orientierte sich an der ED₅₀. (A) Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen. Das γ H2AX-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. (B) Exemplarische Western blot-Analyse des γ H2AX-Levels in unbehandelten SLGC-Kulturen. Die zugehörige Aktin-Ladekontrolle befindet sich darunter. – γ H2AX, am Serylrest S139 phosphoryliertes Histon H2AX.

In den Extrakten der unbehandelten Kontrollen wurden bereits yH2AX-Signale mit dem Antikörper detektiert, deren Intensität zwischen den Zelllinien variierte. Jedoch war das γH2AX-Level für ein und dieselbe Zelllinie reproduzierbar hoch bzw. niedrig (Abb. 31 A und B). Hinsichtlich der Unterschiede in dem basalen γH2AX-Level wies T1440 den geringsten, der Klon T1447 cl4 hingegen einen 25-mal höheren Phosphorylierungsgrad auf. Alle SLGC-Linien antworteten auf die Bestrahlung mit einem zum Teil deutlichen Anstieg des γ H2AX-Levels, wobei sich die Maxima und die zeitlichen Verläufe für alle Zelllinien unterschieden. Für die p53wt-Linie T1440 kam es innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung zu einem drastischen Anstieg des γ H2AX-Levels um das 30-Fache. Bis zum Tag d1 stieg die γ H2AX-Expression um weitere 80% und sank in den nächsten beiden Tagen kontinuierlich (Reduktion relativ zum Tag d1-Wert: am Tag d2 -50%; am Tag d3: -70%). Am Tag d3 nach der Bestrahlung war das γH2AX-Level verglichen zur unbehandelten Kontrolle 20-fach erhöht. Im Fall der zweiten p53_{wT}-Linie T1522 stieg das yH2AX-Level nach 6 h um das 8-Fache, sank dann bis zum 24 h-Wert um 30% und stieg am Tag d2 erneut um das 4-Fache an. Der Anstieg setzte sich bis zum Tag d3 fort (+65% relativ zum Tag d2) und reduzierte sich ab dem Tag d4 zunächst um 35% und dann um weitere 35%. Am Tag d5 nach der Bestrahlung war das γH2AX-Level noch 10-fach höher als in der Kontrolle. Trotz unterschiedlicher Maxima und Veränderungen des yH2AX-Levels über die Tage, reagierten die beiden p53_{mut}-Linien prinzipiell ähnlich. Im Fall der p53-Mutante T1442 war ein 5-facher Anstieg des Phosphorylierungsgrads von H2AX zu verzeichnen, der bis zum Tag d1 weiter um das 3-Fache zunahm. Von Tag d1 zu Tag d2 sank das γH2AX-Level um 30% und pendelte in den nächsten beiden Tagen um dieses Level. Somit war das yH2AX-Level bestrahlter T1442-Zellen am Tag d5 nach der Bestrahlung 10fach höher als das der unbehandelten Kontrolle. Bei der anderen p53_{mut}-Linie (Klon T1447 cl4) war der plateauartige Verlauf der H2AX-Phosphorylierung noch deutlicher als bei T1442. So wies der Klon T1447 cl4 bereits unbehandelt ein hohes γH2AX-Level auf, das 6 h nach der Bestrahlung zunächst um 25% und bis zum Tag d1 um weitere 25% anstieg. Danach blieb das γH2AX-Level bis zum Tag d5 nahezu unverändert. Die Phosphorylierung im H2AX war am Tag d5 nach der Bestrahlung um 65% höher als in der Kontrolle.

Insgesamt zeigten drei SLGC-Linien (T1522, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D) einen Anstieg des γ H2AX-Levels und eine Zelllinie (T1440) eine deutliche Induktion der Phosphorylierung von γ H2AX innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung. Diese Zunahme der Phosphorylierung fiel in der Zelllinie mit dem initial hohen γ H2AX-Level (T1447 cl4-N239D) am schwächsten aus. Das γ H2AX-Level blieb in allen SLGC-Linien über den gesamten Messzeitraum höher als das basale γ H2AX-Level. In p53_{mut}-Linien (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D) war nach Erreichen des Maximums nur eine leichte bzw. keine Reduktion des γ H2AX-Levels zu erkennen, während die p53_{WT}-Linien (T1440, T1522) eine starke Reduktion der H2AX-Phosphorylierung aufwiesen. Allerdings unterschieden sich die p53_{WT}-Linien darin, dass der γ H2AX-Peak im Fall von T1522 erst 48 h später erreicht wurde und auch das γ H2AX-Level dementsprechend zwei Tage später abnahm. Möglicherweise war dieser Verlauf von der applizierten Strahlendosis (T1522: 10 Gy; T1440: 25 Gy) abhängig. Die Induktion der Phosphorylierung von H2AX schien nicht mit der verwendeten Dosis zu korrelieren.

4.2.2. Phosphorylierung in ATM, Chk1, Chk2 und γH2AX sowie Expression von p53 und p21^{Cip1/WAF1} nach Bestrahlung mit 5 Gy, 100 μM Temozolomid oder deren kombinierter Behandlung

Es wurde nun untersucht wie sich eine Doppelbehandlung mit Photonenstrahlung und TMZ auf die Aktivierung der Kinasen ATM, Chk1 und Chk2 auswirkt. Wie bereits für die Einzeitbestrahlung mit Dosen, die sich an der ED₅₀ orientierten (siehe 4.2.1.), wurden weiterhin die Expression von p53 und dem p53-Zielgen p21^{Cip1/WAF1} sowie die Level an γ H2AX mittels Western blot-Analyse ermittelt (Beispiele siehe Anhang Abb. 81). Um mögliche, kooperative Effekte und zelllinienspezifische Effekte detektieren zu können, erfolgte in den folgenden Untersuchungen die Bestrahlung mit 5 Gy und es wurde, unabhängig vom MGMT-Status, eine TMZ-Konzentration von 100 µM eingesetzt. Für diese Analysen wurden zusätzlich zu den obigen vier SLGC-Linien zwei weitere p53_{mut}-Linien (T1371 und T1495) untersucht.

Zunächst werden die Effekte der Einfachbehandlung mit 5 Gy auf die genannten Proteine dargestellt. Danach werden die Effekte der alleinigen Behandlung mit TMZ beschrieben und abschließend die Effekte der Doppelbehandlung.

Phosphorylierung in ATM, Chk1, Chk2 und γH2AX sowie Expression von p53 und p21^{Cip1/WAF1} nach Bestrahlung mit 5 Gy

Alle SLGC-Linien außer T1522 zeigten eine Induktion der ATM-Phosphorylierung im Serylrest S1981 6 h nach der Bestrahlung mit 5 Gy (Abb. 32). Deutliche Unterschiede ergaben sich hinsichtlich des Zeitpunkts an dem das pATM^{Ser1981}-Level das Maximum erreichte, aber auch in Hinblick auf die Löschung des Signals. So stieg in T1440 das pATM^{Ser1981}-Level innerhalb von 6 h um das 16-Fache und war bereits am Tag d1 um 55% reduziert. Bis zum Tag d5 verharrte das pATM^{Ser1981}-Level auf diesem erhöhten Niveau (6-fach erhöht relativ zur Kontrolle). In den Extrakten von T1442 und Klon T1447 cl4 erreichte die Phosphorylierung von ATM sein Maximum ebenfalls nach 6 h. Im Fall der p53-GOF T1442

kam es zu einer 10-fachen Zunahme des pATM^{Ser1981}-Levels, gefolgt von einer kontinuierlichen Reduktion bis zum Tag d2 (d1: -30%; d2: -55%) und dem Erreichen eines Plateaus. Ab dem Tag d2 blieb das pATM^{Ser1981}-Level über die nächsten Tage etwa 4-mal höher als in der Kontrolle. In Extrakten des Klons T1447 cl4 kam es nach dem transienten Anstieg (67-fach relativ zur Kontrolle) am Tag d1 zu einer drastischen Reduktion des pATM^{Ser1981}-Levels um 85%, welches am Tag d3 unterhalb der Nachweisgrenze des Antikörpers sank. Im Gegensatz zur p53_{WT}-Linie T1440 und den zwei p53_{mut}-Linien T1442 (p53-GOF) und T1447 cl4 (p53-*missense*-Mutation) wiesen die zwei p53-GOFs T1371 und T1495 das maximale pATM^{Ser1981}-Level erst am Tag d4 auf. Dabei war im Fall von T1371 eine kontinuierliche Zunahme der ATM-Phosphorylierung zu beobachten, mit einem 2-fachen Anstieg nach 6 h und einer weiteren Zunahme des pATM^{Ser1981}-Level um 80% bis zum Tag d4 (relativ zu 6 h). Von Tag d4 zu Tag d5 veränderte sich der Grad der Phosphorylierung nicht und war relativ zur Kontrolle 4-fach erhöht. In den Extrakten von T1495 kam es innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung zu einem 30-fachen Anstieg des pATM^{Ser1981}-Levels, welches ab Tag d3 weiter zunahm (+60% relativ zum Tag d2) und am Tag d4 ein Maximum erreichte (60-fach höheres pATM^{Ser1981}-Level als die Kontrolle). Am Tag d5 nahm der Grad der Phosphorylierung von ATM um drei Viertel ab.



Abb. 32: Veränderung des pATM^{Ser1981}-Levels nach Bestrahlung mit 5 Gy. Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung am Serylrest S1981 der Kinase ATM (pATM^{Ser1981}) über fünf Tage nach einer Einzeitbestrahlung mit 5 Gy. Das pATM^{Ser1981}-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) bzw. Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen (C). – ATM, Ataxia telangiectasia mutated; h, Stunde; d, Tag.

Insgesamt zeigten fünf von sechs SLGC-Linien innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung mit 5 Gy einen Anstieg der Kinase ATM (T1371-R175H, T1440, T1442-R248W) oder eine drastische Induktion der Phosphorylierung (T1447 cl4-N239D, T1495-R273H). Während in zwei der p53_{mut}-Linien (T1442-R248W und T1447 cl4-N239D) das pATM^{Ser1981}-Level anschließend reduziert wurde, stieg in den beiden anderen p53_{mut}-Linien (T1371-R175H und T1495-R273H) das pATM^{Ser1981}-Level weiter an und erreichte in beiden Fällen am Tag d4 das Maximum. Die p53_{WT}-Linie T1440 wies das Maximum des Phospho-ATMs nach 6 h auf, nach 24 h war das pATM^{Ser1981}-Level um die Hälfte reduziert und blieb über die nächsten Tage konstant auf diesem erhöhten Level.

Ein basales pChk1^{Ser317}-Level wurde in den Kontrollen aller vier p53_{mut}-Linien detektiert, wobei die Phosphorylierung in T1371 und T1447 cl4 am höchsten war, gefolgt von T1442 und T1495. In Extrakten der beiden p53_{WT}-Linien (T1440, T1522) wurde unter den gewählten Bedingungen nur für die T1440-Linie eine schwache Phosphorylierung von Chk1 (10-mal geringer relativ zu T1447 cl4) in der Kontrolle

nachgewiesen. Eine Induktion der Phosphorylierung am Serylrest S317 bzw. einen Anstieg des basalen Levels wurde in allen SLGC-Linien außer T1522 beobachtet (Abb. 33 A). Dabei kam es in der p53_{WT}-Linie T1440 von Tag d1 bis Tag d4 zu einem kontinuierlichen Anstieg des pChk1^{Ser317}-Levels, sodass der Grad der Phosphorylierung am Tag d4 im Vergleich zur Kontrolle 14-fach höher war. Eine Reduktion des pChk1^{ser317}-Levels setzte erst am Tag d5 ein (-55%). Im Fall von T1442 war ein transienter, 2,5-facher Anstieg des pChk1^{Ser317}-Levels nach 6 h zu verzeichnen, gefolgt von einer Reduktion des Phosphorylierungsgrads über die nächsten fünf Tage auf ein Viertel des Ausgangswerts. Im Gegensatz dazu war für die zweite p53_{mut}-Linie T1447 cl4 ausschließlich eine Reduktion des pChk1^{Ser317}-Levels um 80% bis zum Tag d3 zu beobachten. Ähnliches war für die p53-GOF T1371 zu detektieren, in der es lediglich zu einem geringfügigen Anstieg der Phosphorylierung von Chk16 h nach der Bestrahlung kam (+25%), gefolgt von einer Reduktion des pChk1^{Ser317}-Levels bis zum Tag d3 auf ein Drittel des Levels der Kontrolle. In den folgenden zwei Tagen blieb das pChk1^{Ser317}-Level nahezu unverändert. Wiederum verschieden von den anderen drei p53_{mut}-Linien (T1442, T1447 cl4, T1371) verhielt sich T1495. In Extrakten von T1495 war das Maximum des pChk1^{Ser317}-Levels nach einem kontinuierlichen Anstieg der Phosphorylierung (6 h: 4,5-fach; d1: +35%) am Tag d2 erreicht, bevor eine kontinuierliche Reduktion des Phospho-Chk1 bis zum Tag d5 auf das 3,5-Fache der Kontrolle einsetzt.



Abb. 33: Veränderung des pChk1^{Ser317}- **bzw. pChk2**^{Ser19}-Levels nach Bestrahlung mit 5 Gy. Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung am Serylrest S317 der Kinase Chk1 (pChk1^{Ser317}) bzw. am Serylrest S19 der Kinase Chk2 (pChk2^{Ser19}) über fünf Tage nach einer Einzeitbestrahlung mit 5 Gy. Das pChk1^{Ser317}- (A) und das pChk2^{Ser19}- (B) Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen (C). – Chk1, *checkpoint kinase* 1; Chk2, *checkpoint kinase* 2; h, Stunde; d, Tag.

Insgesamt erreichten zwei der vier p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1442-R248W) bereits 6 h nach der Bestrahlung mit 5 Gy das Maximum der Phosphorylierung von Chk1, bei T1495-R273H wurde das maximale pChk1^{Ser317}-Level erst am Tag d2 erreicht und im Fall des Klons T1447 cl4-N239D kam es ausschließlich zu einer Reduktion des Phospho-Chk1. Das pChk1^{Ser317}-Level wurde bei T1442-R248W

und T1447 cl4-N239D innerhalb von 18 h halbiert, während eine vergleichbare Reduktion in T1371-R175H erst am Tag d3 festzustellen war. Die $p53_{WT}$ -Linie, in der die Phosphorylierung des Serylrests S317 nachweisbar war (T1440), zeigte ähnlich wie T1495-R273H eine verzögerte Induktion der Phosphorylierung und erreichte das Maximum erst am Tag d4.

Im Fall der p53_{mut}-Linien T1442, T1447 cl4 und T1371 war bereits eine geringe, basale Phosphorylierung von Chk2 nachweisbar, die sich zwischen den Linien kaum unterschied, während in T1495 und den beiden p53wT-Linien (T1440, T1522) das pChk2^{Ser19}-Signal bei identischen Bedingungen an der Nachweisgrenze des Antikörpers lag. In allen SLGC-Linien wurde eine strahleninduzierte Phosphorylierung von Chk2 detektiert, die allerdings in T1522 nur sehr gering ausfiel (Abb. 33 B). Im Detail zeigte T1440 innerhalb von 6 h einen 3,5-fachen Anstieg des pChk2^{Ser19}-Levels, blieb über die nächsten vier Tage unverändert und wies am Tag d5 einen erneuten, starken Anstieg auf das 20-Fache des Ausgangslevels auf. Aufgrund der sehr schwachen pChk2^{Ser19}-Signale in der T1522-Linie, können die Daten nur qualitativ ausgewertet werden. Das pChk2^{ser19}-Level stieg 6 h nach der Bestrahlung an und reduzierte sich ab Tag d1 kontinuierlich bis auf das Level der Kontrolle. Im Fall der p53-GOF T1442 stieg das pChk2^{ser19}-Level innerhalb von 6 h transient um das 4-Fache an, reduzierte sich direkt am Tag d1 auf das Ausgangsniveau und sank am Tag d3 um weitere 60%. Anschließend blieb das pChk2^{Ser19}-Level über die nächsten zwei Tage in etwa auf diesem, im Vergleich zur Kontrolle 65% geringeren, Niveau. Auch in Extrakten des Klons T1447 cl4 nahm nach 6 h die Phosphorylierung von Chk2 transient zu (5-fach), sank bis zum Tag d2 kontinuierlich (d1: -50%; d2: -50%) und erreichte ein Plateau, das 20% über dem Ausgangsniveau lag. In der zweiten p53-GOF-Linie T1371 war 6 h nach der Bestrahlung ein transienter Anstieg des pChk2^{Ser19}-Levels um das 10-Fache zu beobachten. Anschließend reduzierte sich das pChk2^{Ser19}-Level am Tag d1 um 25% und blieb bis zum Tag d5, bis auf den transienten Anstieg an Tag d4, unverändert. Am Tag d5 nach der Bestrahlung war die Phosphorylierung von Chk2 8-fach höher als in der Kontrolle. Im Fall der dritten p53-GOF T1495 stieg der Grad der Phosphorylierung von Chk2 innerhalb von 6 h drastisch an (55-fach), sank am Tag d1 um 30%, variierte bis zum Tag d4 um dieses Level, bevor es am Tag d5 zu einer weiteren Reduktion um 40% kam, sodass das pChk2^{Ser19}-Level fünf Tage nach der Bestrahlung 20-fach höher war als nach der Kontrollbehandlung.

Insgesamt wiesen alle SLGC-Linien innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung mit 5 Gy einen Anstieg des pChk2^{Ser19}-Levels auf, wobei die Induktion der Phosphorylierung am Serylrest S19 in beiden p53_{WT}-Linien (T1440, T1522) eher gering war. Allerdings stieg das pChk2^{Ser19}-Level im Fall von T1440 am Tag d5 stark an (5,5-fach), nachdem das niedrige pChk2^{Ser19}-Level des 6 h-Werts über mehrere Tage konstant aufrechterhalten wurde. In den p53_{mut}-Linien wurde in allen Fällen ein maximales pChk2^{Ser19}-Level nach 6 h erreicht. Während dieses in T1442-R248W und T1447 cl4-N239D innerhalb von 24 h (T1442) bzw. 48 h (T1447 cl4) auf ein ähnliches Level wie in den Kontrollen sank, blieb das erhöhte Level in T1371-R175H und T1495-R273H über fünf Tage erhalten.

Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, wiesen die $p53_{mut}$ -Linien T1442 und T1447 cl4 ein hohes, basales p53-Level auf. Dies traf auch auf die $p53_{mut}$ -Linien T1371 und T1495 zu. Während die p53-Expression in den beiden $p53_{mut}$ -Linien T1442 und T1447 cl4 innerhalb eines Tages nach Bestrahlung mit 5 Gy gesteigert werden konnte (85% in T1442; 3-fach in T1447 cl4), wurde im Fall von T1495 ein deutlich verzögerter Anstieg um das Doppelte festgestellt und im Fall von T1371 war dieser nicht nur verzögert, sondern auch geringer (+75% relativ zur Kontrolle; Abb. 34 A). Beide $p53_{wt}$ -Linien wiesen eine

deutliche Steigerung des geringen, basalen p53-Levels auf, die für T1522 nach 24 h das Maximum erreichte, für T1440 jedoch erst deutlich verzögert. So stieg bei T1440 das p53-Level innerhalb von 6 h um das 6-Fache an und nahm über die nächsten vier Tage stetig zu bis am Tag d4 ein Peak erreicht wurde (3-mal höher als der 6 h-Wert). Am Tag d5 wurde das p53-Level um 40% reduziert und war somit 10-mal höher als in der Kontrolle. Im Fall von T1522, der zweiten p53wT-Linie, war ein 3-facher Anstieg des p53-Levels innerhalb von 6 h zu beobachten, der am Tag d1 sein Maximum erreichte (+15% relativ zum 6 h-Wert), bevor es über die nächsten Tage zu einer kontinuierlichen Reduktion des p53-Levels kam (d2: -45%; d3: -35%; d4: -30%). Am Tag d5 war das Expressionslevel von p53 um 20% geringer als das der Kontrolle. In Extrakten der p53_{mut}-Linie T1442 erreichte die p53-Expression am Tag d1 das Maximum (+85% relativ zur Kontrolle), sank am Tag d3 auf das Ausgangsniveau und variierte in den folgenden zwei Tagen um dieses Level. Ähnlich verhielt sich der Klon T1447 cl4, in dem das p53-Level am Tag d1 (3-fach erhöht relativ zur Kontrolle) einen Peak erreichte und anschließend kontinuierlich bis zum Tag d3 auf das Level der Kontrolle fiel. In Extrakten der T1371-Linie stieg zwar das p53-Level 6 h nach der Bestrahlung um 50% an, veränderte sich allerdings kaum über die nächsten Tage, wobei die p53-Expression tendenziell anstieg und am Tag d5 75% höher war als das Ausgangslevel. Für die p53-GOF T1495 war eine stetige Zunahme des p53-Levels bis zum Erreichen eines Plateaus, mit einem Maximum am Tag d3 (2-mal höher als in der Kontrolle), festzustellen.

Insgesamt unterschieden sich die p53_{WT}- und p53_{mut}-Linien in der Fähigkeit die p53-Expression nach der Bestrahlung mit 5 Gy zu steigern. Dabei unterschieden sich die beiden p53_{WT}-Linien voneinander dahingehend, dass T1440 (nicht aber T1522) nach einem ersten, deutlichen Anstieg der p53-Expression erst zu einem späteren Zeitpunkt (Tag d4) ein deutlich höheres Maximum erreichte. Die p53_{mut}-Linien unterschieden sich in eine Gruppe mit frühem p53-Expressionsmaximum (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D) und einem späten (T1371-R175H, T1495-R273H), das zudem im Fall von T1371-R175H nur wenig über dem basalen p53-Level der Kontrolle lag.



Abb. 34: Veränderung des von p53- und p21^{Cip1/WAF1}-Levels nach Bestrahlung mit 5 Gy. Zeitlicher Verlauf des Expressionslevels von p53 und p21^{Cip1/WAF1} über fünf Tage nach einer Einzeitbestrahlung mit 5 Gy. Das p53- (A) und p21^{Cip1/WAF1}- (B) Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen (C). – p53, Tumorsuppressorprotein p53; p21, Zellzyklusregulator p21^{Cip1/WAF1}; h, Stunde; d, Tag.

In allen SLGC-Linien wurde eine basale p21^{Cip1/WAF1}-Expression detektiert, die im Fall von T1371 (p53_{mut}) und T1522 (p53wt) 2,5- bis 7-mal geringer war als in den anderen vier Linien. Dabei wies T1495 das höchste p21^{Cip1/WAF1}-Level auf. Nach der Bestrahlung mit 5 Gy zeigten alle Zelllinien, unabhängig vom p53-Status, innerhalb von 6 h bis 24 h einen Anstieg des p21^{Cip1/WAF1}-Levels (Abb. 34 B). Während sich in den p53_{mut}-Linien die p21^{Cip1/WAF1}-Expression über fünf Tage stark reduzierte und mit Ausnahme von T1371 unter dem Ausgangswert sank, blieb das p21^{Cip1/WAF1}-Level in den p53_{WT}-Linien (T1440, T1522) über den gesamten Zeitraum erhöht. So kam es in T1440 innerhalb von 6 h zu einem 3-fachen Anstieg der p21^{Cip1/WAF1}-Expression, die bis zum Tag d1 auf das Doppelte des Ausgangsniveaus sank und sich über die folgenden vier Tage nicht weiter reduzierte. In Extrakten der zweiten p53_{wt}-Linie T1522 stieg die p21^{Cip1/WAF1}-Expression nach 6 h um das 5,5-Fache, erreichte am Tag d1 ein Maximum und reduzierte sich zunehmend über die nächsten Tage auf ein Level, dass 75% höher war als das der Kontrolle. Im Fall der p53-GOF T1442 nahm die p21^{Cip1/WAF1}-Expression nach 6 h transient um das Doppelte zu, fiel bis zum Tag d3 kontinuierlich (d1: -30%; d2: -20%; d3: -70%) und verharrte auf einem im Vergleich zur Kontrolle 55% geringeren p21^{Cip1/WAF1}-Level. Im Klon T1447 cl4 war ein transienter, 2,5-facher Anstieg des p21^{Cip1/WAF1}-Levels erst am Tag d1 zu beobachten, das direkt am Tag d2 um 85% sank und bis zum Tag d3 unterhalb der Nachweisgrenze des Antikörpers fiel. Die dritte p53_{mut}-Linie T1371 wies einen Anstieg der p21^{Cip1/WAF1}-Expression um das 4-Fache auf, verblieb auf diesem hohen Niveau bis zum Tag d1 und sank am Tag d2 um 70%. Über die nächsten drei Tage stieg das p21^{Cip1/WAF1}-Level kontinuierlich (d3: +45%; d4: +25%; d5: +50%) bis auf ein Level, das dreimal höher war als in der Kontrolle. T1495 war die Zelllinie, die den geringsten Anstieg des p21^{Cip1/WAF1}-Levels aufwies (6 h: +15%). Nach Erreichen des Maximums war eine kontinuierliche Reduktion der p21^{cip1/WAF1}-Expression (d1: -10%; d2: -25%; d3: -10%; d4: -15%; d5: -15%) auf die Hälfte des Ausgangswerts zu verzeichnen.

Insgesamt zeigten beide p53_{WT}-Linien eine effiziente Induktion des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1/WAF1} mit dem Unterschied, dass diese im Fall der SLGC-Linie T1522 doppelt so stark ausfiel und das erhöhte p21^{Cip1/WAF1}-Level über fünf Tage stetig abnahm, dagegen im Fall von T1440 nahezu erhalten blieb. Auch die p53_{mut}-Linien reagierten auf die Behandlung mit 5 Gy mit einer Steigerung der p21^{Cip1/WAF1}-Expression. Dabei wurde in allen Fällen das maximale p21^{Cip1/WAF1}-Level nach 6 h bis 24 h erreicht (T1442-R248W (6 h); T1447 cl4-N239D (24 h); T1371-R175H (6 h); T1495-R273H (6 h)). Die Effizienz der Steigerung und die Änderung des p21^{Cip1/WAF1}-Levels nach dem Erreichen des Maximums waren verschieden. Kam es in T1442-R248W und T1447 cl4-N239D zu einer stetigen Senkung des p21^{Cip1/WAF1}-Levels über drei Tage, waren die Verläufe bei den anderen p53_{mut}-Linien anders. Im Fall von T1495-R273H sank das p21^{Cip1/WAF1}-Level nach dem Erreichen des gering erhöhten Expressionsmaximums stetig bis auf die Hälfte des Kontrollwerts, während der Verlauf der p21^{Cip1/WAF1}-Expression im Fall von T1371-R175H zwei deutliche Maxima aufwies, das erste nach 6 h/ 24 h und das zweite nach fünf Tagen.

Wie bereits im Kapitel 4.2.1. erwähnt, wiesen einige SLGC-Linien bereits in den Kontrollen eine Phosphorylierung des Serylrests S139 im Histon H2AX (γ H2AX) auf. Eine Steigerung des basalen Levels war durch die Bestrahlung mit 5 Gy in den p53_{wT}- und den p53_{mut}-Linien festzustellen (Abb. 35). So stieg in T1440 6 h nach der Bestrahlung das γ H2AX-Level um das 2-Fache und über die nächsten fünf Tage kontinuierlich weiter an (d1: +65%; d2: +30%; d3: +75%; d4: +10%; d5: +40%), sodass am Tag d5 nach der Bestrahlung 12-mal mehr γ H2AX als in der Kontrolle zu detektieren war. Im Fall von T1522 war bis zum Tag d2 ein kontinuierlicher Anstieg des γ H2AX-Levels zu beobachten (6 h: 3-fach; d1: +15%; d2: +35%). Über die folgenden drei Tage verblieb das γ H2AX-Level auf diesem, im Vergleich zur Kontrolle 4,5-fach erhöhten, Level. Dagegen erreichte die p53_{mut}-Linie T1442 bereits nach 6 h ein Maximum (4-fach höher als die Kontrolle) und wies über die folgenden fünf Tage eine geringe, aber stetige Reduktion des γ H2AX-Levels auf (d1: -25%; d2: -10%; d3: -40%; d4: -10%; d5: -10%), das am Tag d5 55% höher war als nach der Kontrollbehandlung. Im Fall von T1447 cl4 nahm die Phosphorylierung

des γ H2AX nach 6 h um 30% zu und erreichte am Tag d1 das Maximum (+30%), bevor es zu einer Reduktion des γ H2AX-Levels am Tag d2 kam. Von Tag d2 zu Tag d3 variierte das γ H2AX-Level kaum und lag 30% über dem Ausgangswert. Das γ H2AX-Level nahm im Fall der beiden p53-GOFs T1371 und T1495 nach der Bestrahlung über fünf Tage kontinuierlich zu. So wies T1371 nach 6 h einen 6,5-fachen Anstieg des γ H2AX-Levels auf, stieg am Tag d1 weiter um das 3,5-Fache, gefolgt von einem 80%igen Anstieg am Tag d2 und einer 90%igen Zunahme bis zum Tag d5, sodass das γ H2AX-Level nach fünf Tagen 75fach höher war als in der Kontrolle. Im Fall von T1495 war ein initialer Anstieg des γ H2AX-Levels um das 2,5-Fache zu beobachten, gefolgt von einer Zunahme um 85% am Tag d1, um 65% am Tag d2 und bis zum Tag d5 um weitere 90%. Dabei stieg das γ H2AX-Level fünf Tage nach der Bestrahlung auf das 15-fache des Ausgangswerts.



Abb. 35: Veränderung des γ H2AX-Levels nach Bestrahlung mit 5 Gy. Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung am Serylrest S139 des Histons H2AX (γ H2AX) über fünf Tage nach einer Einzeitbestrahlung mit 5 Gy. Das γ H2AX-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen (C). – h, Stunde; d, Tag.

Insgesamt wiesen beide $p53_{WT}$ und die $p53_{mut}$ -Linien innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung mit 5 Gy einen Anstieg des γ H2AX-Levels auf. Dabei wies die T1440-Linie eine stetige Zunahme der Phosphorylierung auf, während das γ H2AX-Level im Fall von T1522 nach 24 h ein Plateau erreichte. Auch die beiden $p53_{mut}$ -Linien T1371-R175H und T1495-R273H wiesen einen konstanten Anstieg auf, während die beiden anderen p53-Mutanten nach dem Erreichen des Maximums ein Plateau des γ H2AX-Levels (T1447 cl4-N239D) bzw. eine geringe, andauernde Senkung (T1442-R248W) zeigten.

Vergleich des Proteinphosphorylierungsgrads bzw. der Proteinexpression nach Bestrahlung mit 5 Gy oder der ED₅₀-Dosis

Es ließen sich Unterschiede in den strahleninduzierten Effekten nach der Behandlung mit 5 Gy bzw. Dosen, die sich an der ED₅₀ orientierten, in den einzelnen SLGC-Linien erkennen (Tab. 15). So erreichte das Level von pATM^{S1981} und p21^{Cip1/WAF1} nach Bestrahlung mit 5 Gy bzw. mit der ED₅₀ in T1440 innerhalb von 6 h das Maximum, wobei die Höhe der Induktion dosisunabhängig variierte. Zudem waren die Verläufe der Phosphorylierung bzw. der Expressionslevel zwischen den beiden Behandlungsmodalitäten nicht gleich. Ebenso war die Induktion der Phosphorylierung von Chk2, Chk1 und H2AX sowie der Expression von p53 in der p53_{WT}-Linie T1440 zwischen den Behandlungsmodalitäten deutlich verschieden. In den Extrakten der zweiten p53_{WT}-Linie T1522 waren deutlich höhere Anstiege des Phosphorylierungsgrads bzw. der Expression nach Bestrahlung mit der ED₅₀ im Vergleich zur Bestrahlung mit 5 Gy zu verzeichnen, wobei die Maxima, sofern ein Signal nachweisbar war, zur gleichen Zeit erreicht wurden und die Verläufe ähnlich waren (Ausnahme yH2AX). Nach der Bestrahlung mit 5 Gy konnte, anders als nach Bestrahlung mit der ED₅₀, in T1522 kein pATM^{S1981}-Signal detektiert werden. Für die p53-GOF T1371-R175H war der Phosphorylierungsgrad nach Bestrahlung mit der ED₅₀ im Fall von Chk1 und Chk2 sowie die Expression von p53 höher als nach der Behandlung mit 5 Gy, während es für die Phosphorylierung von H2AX und die Expression von p21^{Cip1/WAF1} umgekehrt war. Zudem wichen sowohl der Zeitpunkt der Maxima als auch die Verläufe voneinander ab. Im Vergleich dazu wurden im Fall von T1442-R248W nach der Bestrahlung mit 5 Gy bzw. der ED₅₀ die Maxima nach 6 h bis 24 h erreicht und die anschließenden Verläufe waren ähnlich. Nur die Höhe der Maxima war nach Bestrahlung mit der ED₅₀ höher als nach 5 Gy (Ausnahme pATM^{S1981}). Ähnliches war für den Klon T1447 cl4-N239D nach der Bestrahlung zu beobachten. Sowohl das Auftreten der maximalen Level als auch der Verlauf über die fünf Messtage wiesen Ähnlichkeiten auf. Die Phosphorylierung von Chk1 und Chk2 sowie die Expression von p21^{Cip1/WAF1} wurde durch die Bestrahlung mit der ED₅₀ stärker induziert als durch 5 Gy, hingegen war der Phosphorylierungsgrad von ATM bzw. das p53-Level nach der Bestrahlung mit 5 Gy stärker erhöht. Im Fall der p53-GOF-Mutante T1495-R273H waren, mit Ausnahme des Zeitpunkts der maximalen Chk2-Phosphorylierung, die Höhe der Induktion, das Erreichen der Maxima sowie die Verläufe über die fünf Tage zwischen den beiden Behandlungsmodalitäten verschieden.

In den p53_{wT}-Linien (T1440, T1522) war unabhängig von den Behandlungsmodalitäten nur die Induktion von p53 höher als in den p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H). Für die anderen, untersuchten Proteine konnte kein Zusammenhang zum p53-Status hinsichtlich der Stärke der Induktion der Phosphorylierung bzw. der Expression oder des Verlaufs über fünf Tage festgestellt werden. Die p53-GOF-Mutante T1495-R273H gehörte, unabhängig von der Behandlungsmodalität, zu den Linien mit dem höchsten Anstieg des Phosphorylierungsgrads von Chk1 und Chk2. Hingegen zeigte die zweite p53-GOF-Linie T1371-R175H besonders stark erhöhte γH2AX-Level und nur im Fall von Bestrahlung mit der ED₅₀ eine sehr starke Induktion der Phosphorylierung von Chk2. Im Vergleich dazu wies die dritte p53-GOF-Linie T1442-R248W den steilsten Anstieg des Phospho-Chk1-Levels nur nach der Bestrahlung mit der ED₅₀ auf und generell eine schnellere Löschung der Signale relativ zu T1371-R175H und T1495-R273H. Im Gegensatz zu den p53-GOF-Mutanten zeichnete sich der Klon T1447 cl4-N239D vor allem durch eine starke Induktion der ATM-Phosphorylierung und der p53-Expression nach Bestrahlung mit 5 Gy aus sowie die schnelle Reduktion der Level über die Messtage. Somit waren die strahleninduzierten Effekte, unabhängig von der verwendeten Strahlendosis, zwischen den p53_{mut}-Linien und sogar zwischen den drei p53-GOF-Linien verschieden, was möglicherweise mit der Position der Mutation im p53-Gen zusammenhängt.

		pATM		pChk2		pChk1		p53		p21		γΗ2ΑΧ	
		ED ₅₀	5Gy	ED ₅₀	5Gy	ED ₅₀	5Gy	ED ₅₀	5Gy	ED ₅₀	5Gy	ED ₅₀	5Gy
T1440	Max.	6h	6h	6h	d5	6h	d4	6h	d4	6h	6h	d1	d5
	Anst.	2x	16x	7x	20x	6x	14x	35x	17x	5,5x	Зx	50x	12x
	Red.	ע/ע	\downarrow/ \rightarrow	ע/ע	-	ע/ע	1	ע/ע	\checkmark	\checkmark	\rightarrow	\checkmark	-
T1522	Max.	6h	-	6h	(6h)	-	-	6h	6h	6h	6h/d1	d3	d2
	Anst.	5x	-	18x	(ビ)	-	-	20x	Зx	8,5x	5,5/6x	30x	5x
	Red.	Ы	-	Ы	-	-	-	К	Ы	Ы	И	\checkmark	\rightarrow
T1371	Max.	6h	d4	6h	6h/ d4	6h	6h	6h	d4	6h	6h	d5	d5
	Anst.	3,5x	4x	200x	11/ 13x	3,5x	+25%	2,5x	+70%	+65%	4x	30x	75x
	Red.	И	\rightarrow	\downarrow	\rightarrow/\downarrow	Ы	\checkmark	К	\rightarrow	К	ע/√	-	-
T1442	Max.	d1	6h	6h	6h	6h	6h	d1	d1	d1	6h	d1	6h
	Anst.	+65%	10x	10x	4x	14x	2,5x	3,5x	+85%	17x	2x	16x	4x
	Red.	\checkmark	Ы	Ы	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	К	Ы	→/ש	К
T1447 cl4	Max.	6h	6h	6h	6h	6h	-	d1	d1	6h/d1	d1	d1/ d4	d1
	Anst.	+85%	67x	20x	5x	2x	-	+55%	3x	5/6x	2,5x	+60/ 80%	+80%
	Red.	R	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\downarrow	(↓)	И	\checkmark	К	\checkmark	\rightarrow	R
T1495	Max.	6h	d4	6h	6h	6h	d2	d2	d3	d5	6h	d4	d5
	Anst.	2x	60x	70x	55x	10x	7,5x	16x	2x	6х	+15%	6,5x	14,5x
	Red.	\downarrow	\checkmark	\rightarrow	Ы	И	И	\rightarrow	\rightarrow	-	1	\downarrow	-

Tab. 15: Vergleich des Proteinphosphorylierungsgrads bzw. der Proteinexpression nach Bestrahlung mit 5 Gy oder der ED₅₀ in SLGC-Linien mit unterschiedlichem p53-Status.

Proteinphosphorylierungsgrads bzw. Proteinexpression nach Bestrahlung mit 5 Gy oder der ED₅₀-Dosis in p53_{WT}- (T1440, T1522) und p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H). – pATM, Phosphorylierung am Serylrest S1981 der Kinase ATM; pChk2, Phosphorylierung am Serylrest S317 der Kinase Chk2; pChk1, Phosphorylierung am Serylrest S19 der Kinase Chk1; p53, Tumorsuppressorprotein p53; p21, Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1/WAF1}; γ H2AX, Phosphorylierung am Serylrest S139 des Histons H2AX; ED₅₀, Strahlendosis, bei der die Proliferation um 50% reduziert wird; Max., Maximum; Anst., Anstieg relativ zur Kontrolle; Red., Reduktion nach Erreichen des Maximums; h, Stunde; d, Tag; \rightarrow , kaum/unverändert; \searrow , langsam; \checkmark , schnell; -, nicht vorhanden.

<u>Phosphorylierung in ATM, Chk1, Chk2 und γH2AX sowie Expression von p53 und p21 ^{Cip1/WAF1} nach</u> Behandlung mit 100 μM Temozolomid

Wie in Kapitel 4.2.2. beschrieben, war eine Detektion von pATM^{Ser1981} in der SLGC-Linie T1522 unter den gewählten Bedingungen nicht möglich, auch nicht nach Behandlung dieser Zelllinie mit TMZ (Abb. 36). In der anderen p53_{WT}-Linie T1440 und den p53_{mut}-Linien wurde die Phosphorylierung des Serylrests S1981 durch die Behandlung mit 100 μ M TMZ effizient induziert. Dabei stieg in T1440 das pATM^{Ser1981}-Level innerhalb von 6 h nach der Behandlung um das 8-Fache, erreichte am Tag d1 ein Maximum (d1: +20%) und sank bis zum Tag d4 kontinuierlich (d2: -35%; d3: -10%; d4: -25%) bevor es am Tag d5 zur einer erneuten Zunahme der Phosphorylierung von ATM kam (d5: pATM^{Ser1981}-Level 6fach erhöht relativ zur Kontrolle). Im Vergleich dazu war in Extrakten der T1442-Linie nach 6 h eine Zunahme des Phosphorylierungsgrad um das 4-Fache zu beobachten, in dessen Anschluss das pATM^{Ser1981}-Level bis zum Tag d2 auf diesem hohen Level verblieb und bis zum Tag d4 weiter auf ein Level anstieg, dass 6,5-mal höher war als das der Kontrolle. Im Gegensatz dazu wies die zweite $p53_{mut}$ -Linie T1447 cl4 einen transienten, 30-fachen Anstieg des pATM^{Ser1981}-Levels innerhalb von 6 h auf, gefolgt von einer starken Reduktion (d1: -55%; d2: -60%) bis das Signal am Tag d3 unterhalb der Nachweisgrenze des Antikörpers lag. Im Fall von T1371 war der Peak der ATM-Phosphorylierung erst am Tag d3 zu verzeichnen (relativ zur Kontrolle 7,5-mal erhöht), wobei auch hier der Phosphorylierungsgrad von ATM bereits nach 6 h anstieg (2-fach), bis zum Tag d2 leicht und vom Tag d2 zum Tag d3 sprunghaft zunahm. Nach dem transienten Anstieg wurde das Level über die nächsten zwei Tage kontinuierlich reduziert (d4: -45%; d5: -35%) und blieb relativ zum Ausgangswert 2,5-fach erhöht. Dagegen waren in der vierten $p53_{mut}$ -Linie T1495 zwei deutliche Maxima zu erkennen (nach 6 h und am Tag d4). Dabei stieg das pATM^{Ser1981}-Level nach 6 h um das 30-Fache und reduzierte sich zunehmend bis zum Tag d2 (d1: -45%; d2: -35%) bevor es in den folgenden zwei Tagen zu einem erneuten, stetigen Anstieg der Phosphorylierung kam (d3: 3-fach; d4: 2-fach), sodass das pATM^{Ser1981}-Level am Tag d4 nach der Behandlung 70-fach höher war als in der Kontrolle.



Abb. 36: Veränderung des pATM^{Ser1981}-Levels nach Behandlung mit Temozolomid. Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung am Serylrest S1981 der Kinase ATM (pATM^{Ser1981}) über fünf Tage nach der Behandlung mit 100 µM Temozolomid. Das pATM^{Ser1981}-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) bzw. Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen (C). – ATM, *Ataxia telangiectasia mutated*; h, Stunde; d, Tag.

Insgesamt zeigten T1440 sowie alle p53_{mut}-Linien eine Erhöhung (T1371-R175H, T1442-R248W) oder Induktion (T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) der Phosphorylierung am Serylrest S1981 der Kinase ATM bereits 6 h nach der Zugabe des Chemotherapeutikums. Die Induktion bzw. Zunahme der Phosphorylierung war im Fall von T1447 cl4-N239D nur transient, während sie im Fall der p53-Mutante T1442-R248W auf dem erhöhten Level persistierte und von Tag d2 bis Tag d4 um 50% stieg. Die p53-Mutante T1371-R175H zeigte eine stetige Zunahme des pATM^{Ser1981}-Levels bis zum Tag d3 (7,5-fach), gefolgt von einer linearen Reduktion auf das 2,5-Fache des Kontrollwerts, während T1495-R273 nach dem anfänglichen Anstieg des pATM^{Ser1981}-Levels eine transiente Reduktion der Phosphorylierung aufwies, die am Tag d4 in einem zweiten Maximum (2-mal höher als Maximum 1) mündete.

T1522 wurde als einzige SLGC-Linie identifiziert, in der keine strahleninduzierte Phosphorylierung von Chk1 auftrat und auch die Behandlung mit TMZ nicht dazu führte. Dagegen stieg der Phosphorylierungsgrad nach der Zugabe des Chemotherapeutikums in T1440 (p53_{WT}) und in den p53-

Mutanten an (Abb. 37 A). Im Detail stieg das pChk1^{Ser317}-Level in T1440 nach 6 h um das 10-Fache an, erreichte am Tag d1 eine Plateauphase mit einem Maximum am Tag d3 (relativ zur Kontrolle 19-fach erhöht) und sank am Tag d5 um 60% auf ein im Vergleich zur Kontrolle 8-fach erhöhtes Level. Im Fall der p53-GOF-Mutante T1442 nahm die Phosphorylierung von Chk1 kontinuierlich zu (6 h: +2,5-fach; d1: +90%), erreichte am Tag d2 ein Maximum (d2: +20%) und sank in den folgenden drei Tagen stetig (d3: -20%; d4: -10%; d5: -65%), sodass das pChk1^{Ser317}-Level am Tag d5 nach der Zugabe von TMZ 50% höher war als das Ausgangsniveau. Im Gegensatz dazu kam es in T1447 cl4 zu keinem Anstieg des Phosphorylierungsgrads von Chk1, sondern ab dem Tag d1 zu einer zunehmenden Reduktion des pChk1^{Ser317}-Levels über fünf Tage, sodass das Level am Tag d5 zwei Drittel geringer war als in der Kontrolle. Wiederum anders verhielten sich die p53_{mut}-Linien T1371 und T1495, die einen transienten Anstieg der Chk1-Phosphorylierung 6 h nach der Behandlung aufwiesen, gefolgt von einer Reduktion des pChk1^{Ser317}-Levels. So stieg die Phosphorylierung von Chk1 in T1371 innerhalb von 6 h um 75%, gefolgt von einer Reduktion auf das Kontrolllevel am Tag d1 und einer zunehmenden Senkung des Phosphorylierungsgrads über die nächsten vier Tage bis auf ein Level, das 85% geringer war als das der Kontrolle. Im Fall von T1495 nahm das pChk1^{Ser317}-Level nach 6 h transient zu (6-facher Anstieg), sank innerhalb von drei Tagen auf das Level der Kontrolle und fiel über die folgenden zwei Tage weiter, sodass das pChk1^{Ser317}-Level am Tag d5 nach der Behandlung ein Sechstel des Ausgangswerts betrug.



Abb. 37: Veränderung des pChk1^{Ser317}- bzw. pChk2^{Ser19}-Levels nach Behandlung mit Temozolomid. Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung am Serylrest S317 der Kinase Chk1 (pChk1^{Ser317}) bzw. am Serylrest S19 der Kinase Chk2 (pChk2^{Ser19}) über fünf Tage nach der Behandlung mit 100 μ M Temozolomid. Das pChk1^{Ser317}- (**A**) und das pChk2^{Ser19}- (**B**) Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen (C). – Chk1, *checkpoint kinase* 1; Chk2, *checkpoint kinase* 2; h, Stunde; d, Tag.

Insgesamt war in drei p53_{mut}- (T1371-R175H, T1442-R248W, T1495-R273H) und der p53_{wT}-Linie T1440 die Phosphorylierung am Serylrest S317 der Kinase Chk1 mit 100 μ M TMZ innerhalb von 6 h induzierbar (T1440, T1495-R273H) bzw. wurde deutlich erhöht (T1371-R175H, T1442-R248W).

Dagegen war im Fall von T1447 cl4-N239D ausschließlich eine zunehmende Senkung des Phosphorylierungsgrads über fünf Tage zu beobachten. Während T1371-R175H und T1495-R273H das maximale Phosphorylierungslevel von Chk1 nach 6 h erreichten, war dies für T1442-R248W erst nach 48 h der Fall. Nach dem Erreichen des Maximums erfolgte die Abnahme des pChk1^{Ser317}-Signals für T1371-R175H und T1495-R273H nahezu linear und erreichte am Tag d5 einen Wert, der nur ein Sechstel des Werts in den Kontrollproben betrug. Dagegen sank das pChk1^{Ser317}-Level im Fall von T1442-R248W bis zum Tag d5 auf einen, relativ zur Kontrolle, 50% erhöhten Wert. Die p53_{WT}-Linie T1440 erreichte die maximale Chk1-Phosphorylierung erst am Tag d3, wobei die Zunahme der Phosphorylierung vor allem in den ersten 24 h (16,5-facher Anstieg) erfolgte und der Phosphorylierungsgrad danach (Tag d1 bis d3) nur noch um 15% anstieg.

Im Gegensatz zur Phosphorylierung von Chk1 waren im Fall von T1522 schwache pChk2^{Ser19}-Signale nahe der Nachweisgrenze des Antikörpers detektierbar, sowohl nach der Bestrahlung als auch nach der Behandlung mit TMZ (vergleiche pChk1^{Ser317} und pChk2^{Ser19} in Abb. 33 und Abb. 37). Während T1371 lediglich eine Reduktion des pChk2^{ser19}-Levels zeigte, wiesen die zweite p53_{wT}-Linie (T1440) und drei p53_{mut}-Linien (T1442, T1447 cl4, T1495) nach der Zugabe von TMZ eine Induktion der Phosphorylierung von Chk2 auf (Abb. 37 B). Im Detail stieg in T1440 das pChk2^{ser19}-Level innerhalb von 6 h nach der Zugabe von TMZ um das 10-Fache und nahm bis zum Tag d5 stetig zu (d5: relativ zur Kontrolle 35-fach höher), während im Fall von T1522 keine Veränderung des pChk2^{Ser19}-Levels zu beobachten war (möglicherweise aufgrund der sehr geringen Signalstärke). Im Vergleich dazu nahm die Phosphorylierung von Chk2 in der p53_{mut}-Linie T1442 erst ab dem Tag d1 zu (+50%), erreichte am Tag d2 ein Maximum (+85%) und reduzierte sich bis zum Tag d3 auf das Level der Kontrolle. Über die nächsten zwei Tage sank das pChk2^{ser19}-Level, sodass in Extrakten vom Tag d5 nach der Behandlung der Grad der Phosphorylierung 40% geringer war als der Kontrollwert. Im Gegensatz dazu stieg das pChk2^{ser19}-Level der zweiten p53_{mut}-Linie T1447 cl4 innerhalb von 6 h auf das Doppelte an, erreichte ein Plateau und variierte auf diesem erhöhten Level in den nächsten fünf Tagen um weniger als 20%. Hingegen war im Fall von T1371 keine Induktion der Chk2-Phosphorylierung zu verzeichnen, sondern eher eine geringe Reduktion des pChk2^{Ser19}-Levels um 30% 6 h nach Zugabe des Chemotherapeutikums. Über die nächsten vier Tage wurde dieses pChk2^{Ser19}-Level, abgesehen von der transienten, geringfügigen Senkung am Tag d2, aufrechterhalten. Dagegen nahm im Fall der vierten p53-Mutante T1495 nach 6 h der Grad der Phosphorylierung von Chk2 um das 2,5-Fache zu, erreichte ein Plateau und wies am Tag d2 eine transiente Senkung des pChk2^{Ser19}-Levels auf (-30%) sowie am Tag d4 einen transienten Anstieg um 55% (relativ zum Tag d3). Am Tag d5 nach der Behandlung war das pChk2^{Ser19}-Level 2-fach höher als in der Kontrolle.

Insgesamt wurde die Phosphorylierung der Kinase Chk2 am Serylrest S19 in vier der untersuchten SLGC-Linien durch die Gabe von TMZ induziert (T1440) bzw. gesteigert (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H). Die p53_{mut}-Linie T1371-R175H zeigte über den gesamten Zeitraum des Experiments ein ähnliches pChk2^{Ser19}-Level, mit einer geringen Senkung am Tag d2 und einem etwas erhöhten Level in der Kontrolle. Auch im Fall von T1495-R273H variierte das pChk2^{Ser19}-Level über fünf Tage eher gering, war allerdings in diesem Fall im Vergleich zur Kontrolle um das Doppelte erhöht. Eine deutliche Zunahme des pChk2^{Ser19}-Levels wurde nur für eine p53_{WT}-Linie (T1440) beobachtet, wobei das pChk2^{Ser19}-Level nach dem starken, initialen Anstieg innerhalb von 6 h über die nächsten Tage stetig, aber geringer weiter zunahm.

Wie in Kapitel 4.2.1. beschrieben, wiesen die p53_{WT}-Linien ein geringes, basales p53-Level auf, zeigten allerdings die höchsten strahleninduzierten Anstiege des Levels. Nach der Behandlung mit TMZ traf das nur für T1440 zu, während die Induktion der p53-Expression in T1522 und den p53_{mut}-Linien ähnlich war (Abb. 38 A). So wies T1440 innerhalb von 6 h einen 7-fachen Anstieg des p53-Levels auf, der sich bis zum Tag d5 fortsetzte und ein Niveau erreichte, das 47-mal höher war als der Kontrollwert. Im Fall der zweiten p53_{wt}-Linie T1522 nahm das p53-Level nach 6 h um das Doppelte zu, erreichte am Tag d1 ein Maximum (d1: +20%) und sank bis zum Tag d2 um 40%. Bis zum Tag d3 stieg das p53-Level (d3: +30%) erneut und erreichte ein Plateau, das über die nächsten zwei Tage aufrechterhalten blieb und im Vergleich zur Kontrolle 2,5-mal höher lag. In Extrakten der p53-Mutante T1442 wurde das maximale p53-Level am Tag d2 erreicht (6 h: +90%; d1: +25%; d2: +30%), fiel bis zum Tag d3 um 65% auf etwa das Ausgangsniveau und variierte in den nächsten zwei Tagen um dieses Level. Im Gegensatz dazu kam es in Klon T1447 cl4 zu einem transienten Anstieg des p53-Levels um das 2-Fache nach 6 h und zu einer Reduktion über die nächsten fünf Tage bis auf das Ausgangslevel. Im Fall von T1371 variierte das p53-Level bis zum Tag d2 um den Ausgangswert (± 25%), erreichte am Tag d4 ein Maximum (relativ zur Kontrolle +65%) und fiel am Folgetag auf das Level der Kontrolle. Dagegen zeigte die vierte p53_{mut}-Linie T1495 nach 6 h einen Anstieg des p53-Levels um 70%, der sich bis zum Tag d2 fortsetzte (+50%), während über die nächsten drei Tage das p53-Level auf das Ausgangsniveau fiel.



Abb. 38: Veränderung des von p53- und p21^{Cip1/WAF1}-Levels nach Behandlung mit Temozolomid. Zeitlicher Verlauf des Expressionslevels von p53 und p21^{Cip1/WAF1} über fünf Tage nach der Behandlung mit 100 µM Temozolomid. Das p53- (**A**) und p21^{Cip1/WAF1}- (**B**) Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen (C). – p53, Tumorsuppressorprotein p53; p21^{Cip1/WAF1}, Zellzyklusregulator p21^{Cip1/WAF1}; h, Stunde; d, Tag.

Insgesamt wurde die p53-Expression in beiden p53_{wT}-Linien innerhalb von 6 h nach der TMZ-Behandlung gesteigert, besonders deutlich in T1440, und blieb im Fall von T1522, nicht aber T1440, über die folgenden fünf Tage stabil auf dem erhöhten Level. Statt einem Plateau wies der p53-blot der Zelllinie T1440 eine stetige Zunahme der Signalstärke vom Tag d1 bis zum Tag d5 auf. Eine effiziente Steigerung der p53-Level war für drei der p53_{mut}-Linien (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) zu verzeichnen, während im Fall von T1371-R175H das p53-Level eher um den Ausgangswert pendelte. Die maximale p53-Expression wurde für T1495-R273H und T1442-R248W am Tag d2 ermittelt, gefolgt von einer Reduktion auf ein ähnliches Niveau wie in den Kontrollen. Im Fall von T1447 cl4-N239D folgte nach der initialen Steigerung (innerhalb von 6 h) eine geringe, aber kontinuierliche Abnahme der p53-Expression auf den Wert in der Kontrolle.

Während es in allen SLGC-Linien nach Bestrahlung mit 5 Gy zu einer Induktion der p21^{Cip1/WAF1}-Expression kam, zeigten T1440 und T1442-R248W nach der Behandlung mit TMZ eine kontinuierliche Reduktion des p21^{Cip1/WAF1}-Levels, drei p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) eher geringe Anstiege der p21^{Cip1/WAF1}-Level und im Fall von T1522 kam es zu einer deutlichen Erhöhung der p21^{Cip1/WAF1}-Expression (Abb. 38 B). Im Detail wies T1440 innerhalb von 6 h eine 85%ige Reduktion des p21^{Cip1/WAF1}-Levels auf, gefolgt von einer weiteren Senkung bis zum Tag d2 auf ein Level, das an der Nachweisgrenze des Antikörpers lag. Im Gegensatz dazu kam es in der zweiten p53_{WT}-Linie T1522 nach 6 h zu einem 3-fachen Anstieg des p21^{Cip1/WAF1}-Levels, das am Tag d2 einen Peak erreichte (relativ zum 6 h – Wert 2-fach erhöht). Bis zum Tag d4 sank die p21^{Cip1/WAF1}-Expression auf ein Level, das relativ zum Kontrollwert 3-mal höher war, und blieb bis zum Folgetag unverändert. Die p53-GOF T1442 zeigte, ähnlich wie die p53_{wT}-Linie T1440, eine kontinuierliche Abnahme des p21^{Cip1/WAF1}-Levels nach der Behandlung mit TMZ bis am Tag d4 das Level nur noch ein Zwanzigstel des Ausgangswerts betrug. Im Vergleich dazu kam es in Klon T1447 cl4 innerhalb von 6 h ebenfalls zu einer starken Reduktion des p21^{Cip1/WAF1}-Levels auf ein Zehntel des Kontrollwerts. Allerdings stieg das p21^{Cip1/WAF1}-Level über die nächsten zwei Tage um das 5-Fache an, sank an den folgenden zwei Tage gering, nahm bis zum Tag d5 zu und erreichte nahezu den Ausgangswert der Kontrollen (relativ zur Kontrolle 20% geringer). Dagegen war in Extrakten der T1371-Linie nach 6 h ein 2,5-facher Anstieg des p21^{Cip1/WAF1}-Levels zu beobachten, das direkt am Tag d1 um 50% sank, von Tag d2 bis d4 erneut zunahm (d3: +70%; d4: +55%) und somit ein Level erreichte, das 4-mal höher war als in den Kontrollen. Im Fall der vierten p53_{mut}-Linie T1495 nahm das p21^{Cip1/WAF1}-Level erst am Tag d2 nach Behandlung zu (+70%), allerdings nur transient, sodass bis zum Tag d4 die p21^{Cip1/WAF1}-Expression bis auf den Wert der Kontrollen sank und am Folgetag geringfügig anstieg (d5: +35%).

Insgesamt wurde das p21^{Cip1/WAF1}-Level in den p53_{WT}- und den p53_{mut}-Linien unter TMZ-Behandlung verändert. Im Fall von T1440 und T1442-R248W wurde die stabile Reduktion des initial erhöhten p21^{Cip1/WAF1}-Levels beobachtet. Die anderen SLGC-Linien zeigten über den Behandlungszeitraum von fünf Tagen sowohl transiente Anstiege als auch Senkungen des p21^{Cip1/WAF1}-Levels. Im Fall von T1522, T1447 cl4-N239D und T1495-R273H wurde transient ein p21^{Cip1/WAF1}-Maximum am Tag d2 festgestellt, das für T1522 und T1495-R175H 6-fach (T1522) bzw. um 70% (T1495) über dem Niveau in den Kontrollen lag. Im Fall von T1447 cl4-N239D lag das Maximum 40% unter dem initialen Wert und steigerte sich nach einer geringen Senkung zu einem zweiten Maximum an Tag d5 (20% unter dem Kontrollwert).

Wie durch die Bestrahlung mit 5 Gy, wurde ebenfalls durch die Behandlung mit TMZ die Phosphorylierung am Serylrest S139 von H2AX induziert, jedoch mit deutlich unterschiedlicher Effizienz (Abb. 39). Dabei nahm der Grad an Phosphorylierung in T1440 erst nach 24 h zu (5,5-fach) und erreichte am Folgetag ein Maximum (relativ zur Kontrolle 23-fach erhöht), gefolgt von einer Halbierung des γ H2AX-Levels bis zum Tag d4. Von Tag d4 bis Tag d5 nahm die Phosphorylierung von H2AX um 20% zu und war im Vergleich zur Kontrolle 15-fach erhöht. Ein ähnlicher Verlauf wurde im Fall der zweiten p53_{WT}-Linie T1522 beobachtet, in der es innerhalb von 6 h zu einem 2,5-fachen Anstieg des γ H2AX-Levels kam, der ebenfalls am Tag d2 einen Peak des γ H2AX-Levels erreichte (5,5-fach höher als der Kontrollwert). In den nächsten zwei Tagen war eine Senkung des γ H2AX-Levels zu verzeichnen

(d3: -50%; d4: -25%), gefolgt von einer erneuten Zunahme des Phosphorylierungsgrads bis zum Tag d5 um das Doppelte auf ein Level, das 4,5-mal über dem Ausgangslevel lag. Im Fall der T1442-Linie nahm das γ H2AX-Level initial um 40% zu, stieg bis zum Tag d3 weiter (2,5-fach) und erreichte ein Plateau, das über die nächsten Tage erhalten blieb. Im Gegensatz dazu zeigte die p53-Mutante T1447 cl4 eine transiente Senkung des γ H2AX-Levels am Tag d1, gefolgt von einer Zunahme der Phosphorylierung bis zum Tag d2 (Maximum; 20% höher als das Ausgangsniveau) und einer Reduktion des γ H2AX-Levels auf ein Viertel innerhalb von weiteren 24 h. Bis zum Tag d5 fiel das γ H2AX-Level auf ein Fünftel des Ausgangswerts. Dagegen wies die dritte p53_{mut}-Linie T1371 initial nach 6 h einen 3-fachen Anstieg des γ H2AX-Levels auf, das über die nächsten vier Tage kontinuierlich weiter zunahm und am Tag d4 ein Maximum erreichte (relativ zur Kontrolle 30-fach erhöht). Am Tag d5 wurde das γ H2AX-Level um die Hälfte reduziert und war 15-mal höher als in der Kontrolle. In Extrakten der T1495-Linie war ein Anstieg des Phosphorylierungsgrads von H2AX über alle Tage zu verzeichnen bis am Tag d5 das γ H2AX-Level relativ zum Ausgangslevel 15-fach erhöht war.



Abb. 39: Veränderung des γ **H2AX-Levels nach Behandlung mit Temozolomid.** Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung am Serylrest S139 des Histons H2AX (γ H2AX) über fünf Tage nach der Behandlung mit 100 μ M Temozolomid. Das γ H2AX-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen (C). – h, Stunde; d, Tag.

Insgesamt wurde durch die TMZ-Behandlung die Phosphorylierung am Aminosäurerest S139 des Histons H2AX in den beiden p53_{WT}-Linien und allen p53-Mutanten induziert bzw. gesteigert. In einer der p53_{mut}-Linien (T1447 cl4-N239D) war der Anstieg des γ H2AX-Levels aber nur sehr gering (20%) und sank nach dem Tag d2 auf Werte unterhalb des initialen Phosphorylierungslevels. Die drei anderen p53_{mut}-Linien zeigten eine Zunahme des γ H2AX-Levels, wobei diese für T1495-R273H nahezu konstant über fünf Tage erfolgte, im Fall von T1442-R248W am Tag d3 in einem Plateau und im Fall von T1371-R175H in einem Peak am Tag d4 mündete. Die Änderungen des γ H2AX-Levels über die Zeit waren bei beiden p53_{WT}-Linien weniger konstant, wiesen ein sehr deutliches Maximum am Tag d2 und ein weniger ausgeprägtes Minimum am Tag d4 auf. <u>Phosphorylierung in ATM, Chk1, Chk2 und γ H2AX sowie Expression von p53 und p21 ^{Cip1/WAF1} nach</u> Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid

Nach den Einzelbehandlungen mit Bestrahlung (5 Gy) bzw. TMZ (100 μ M) wurden die Effekte einer kombinierten Behandlung (5 Gy + 100 μ M TMZ) in zwei p53_{WT}- und vier p53_{mut}-Linien untersucht. Dabei erfolgte die Zugabe des Chemotherapeutikums eine halbe bis maximal eine Stunde vor der Behandlung mit Photonenstrahlung. Im Fall von T1440 konnten allerdings nur Daten an den Zeitpunkten 6 h und 24 h erhoben werden, was die Interpretation dieser Daten stark einschränkt. Dennoch werden sie im Folgenden der Vollständigkeit halber beschrieben.

Wie in den Einzelbehandlungen und Kontrollen festgestellt, war eine Phosphorylierung der Kinase ATM am Serylrest S1981 in der SLGC-Linie T1522 auch nach der Doppelbehandlung mit 100 µM TMZ und 5 Gy nicht messbar. In allen übrigen SLGC-Linien wurde die Phosphorylierung dagegen induziert (Abb. 40). Dabei variierten sowohl die Effizienz der Phosphorylierung als auch deren zeitlicher Verlauf. So stieg in der p53_{wT}-Linie T1440 das pATM^{Ser1981}-Level innerhalb von 6 h nach der Doppelbehandlung um das 15-Fache und verblieb in den nächsten 18 h auf diesem Level. Im Fall der p53-GOF T1442 nahm der Grad der Phosphorylierung von ATM zu und erreichte am Tag d1 ein Maximum (6 h: 7-fach; d1: +35%), bevor das pATM^{Ser1981}-Level am Folgetag um die Hälfte reduziert wurde und ein Plateau erreichte, dass über die nächsten zwei Tage aufrecht erhalten blieb. Von Tag d4 zum Tag d5 sank das pATM^{Ser1981}-Level auf das 2,5-fache Level der Kontrollen. Im Vergleich dazu stieg die Phosphorylierung von ATM in T1447 cl4 nach 6 h transient an (65-fach), reduzierte sich jedoch bereits innerhalb eines Tages auf ein Sechstel und bis zum Folgetag in etwa auf das Ausgangsniveau und lag damit an der Nachweisgrenze des Antikörpers. Im Gegensatz dazu kam es in T1371 zu einem 2,5-fachen Anstieg des pATM^{Ser1981}-Levels 6 h nach der Doppelbehandlung, gefolgt von einer zunehmenden Phosphorylierung bis am Tag d4 ein Peak erreicht wurde (relativ zur Kontrolle 6-fach erhöht) und einer Senkung bis zum Tag d5 auf das 4,5-Fache des Ausgangsniveaus. Im Fall von T1495, der vierten p53-Mutante, stieg das pATM^{Ser1981}-Level innerhalb von 6 h drastisch (30-fach) und nahm, abgesehen von der geringen, transienten Senkung am Tag d2 (-35%), bis zum Tag d4 weiter zu und erreichte ein Level, das 70-fach höher war als in den Kontrollen.



Abb. 40: Veränderung des pATM^{Ser1981}-Levels nach der Doppelbehandlung mit Bestrahlung und Temozolomid. Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung am Serylrest S1981 der Kinase ATM (pATM^{Ser1981}) über fünf Tage nach der Doppelbehandlung mit 5 Gy Bestrahlung und 100 μ M Temozolomid. Das pATM^{Ser1981}-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) bzw. Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen (C). – ATM, Ataxia telangiectasia mutated; h, Stunde; d, Tag.

Insgesamt erreichte die Phosphorylierung von ATM nach der Doppelbehandlung in zwei der p53_{mut}-Linien (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D) innerhalb von 24 h ein Maximum, im Fall von T1447 cl4-N239D sogar bereits nach 6 h. Die anderen p53-Mutanten T1371-R175H und T1495-R273H wiesen eine deutlich verzögerte Phosphorylierung auf, die am Tag d4 ein Maximum erreichte, wobei im Fall von T1495-R273H bereits nach 6 h der Grad der Phosphorylierung um das 30-Fache anstieg. Über die p53_{WT}-Linie T1440 kann nur die Aussage getroffen werden, dass die Phosphorylierung von ATM nach 6 h effizient induziert wurde. Zu welchem Zeitpunkt in T1440 die ATM-Phosphorylierung maximal war, konnte aufgrund der geringen Materialmengen nicht bestimmt werden.

Wie nach der Einzeitbestrahlung oder der alleinigen Behandlung mit TMZ, wies T1522 auch nach der Doppelbehandlung keine nachweisbare Phosphorylierung am Serylrest S317 der Kinase Chk1 auf. Im Fall von T1447 cl4 wurde nach der Doppelbehandlung, anders als nach den Einzelbehandlungen, die Phosphorylierung von Chk1 induziert, wohingegen alle anderen SLGC-Linien sowohl nach den Einzelbehandlungen als auch nach der Doppelbehandlung eine Induktion der Phosphorylierung zeigten (Abb. 41 A). Im Detail war in T1440 nach 6 h ein 15-facher Anstieg des pChk1^{Ser317}-Levels zu beobachten, gefolgt von einem weiteren Anstieg bis zum Tag d1 um 25%. Im Fall von T1442 stieg der Phosphorylierungsgrad von Chk1 kontinuierlich an (6 h: 2,5-fach; d1: +50%; d2: +25%), erreichte am Tag d3 ein Maximum (relativ zur Kontrolle 5-fach erhöht) und sank über die nächsten zwei Tage bis auf das Ausgangslevel. Dagegen kam es in Extrakten des Klons T1447 cl4 zu einem geringen, transienten Anstieg der Phosphorylierung von Chk1 mit einem Maximum nach 6 h (+25%), bevor das pChk1^{Ser317}-Level über die nächsten fünf Tage stetig abnahm und einen Wert erreichte, der ein Fünftel des Kontrollwerts betrug. Ähnlich waren die Verläufe in Extrakten von T1371 und T1495, in denen ein transienter Anstieg nach 6 h sowie eine anschließende Reduktion des pChk1^{Ser317}-Levels zu beobachten war. Im Detail stieg der Grad der Phosphorylierung in der p53-Mutante T1371 6 h nach der Doppelbehandlung um das 2,5-Fache, bevor sich das pChk1^{Ser317}-Level bis zum Tag d1 um 40% reduzierte, nach zwei weiteren Tage unterhalb des Ausgangslevel sank (-20%) und über die folgenden zwei Tage unverändert blieb. Im Fall der vierten $p53_{mut}$ -Linie T1495 folgte nach dem transienten Anstieg nach 6 h (6,5-fach) eine kontinuierliche Senkung des pChk1^{Ser317}-Levels über fünf Tage auf ein Sechstel des Kontrollwerts.

Insgesamt zeigten alle vier p53-Mutanten und die p53_{wT}-Linie T1440 eine effiziente Induktion bzw. Steigerung der Phosphorylierung der Kinase Chk1 am Serylrest S317 nach der Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M TMZ. Mit Ausnahme von T1442-R248W und T1440 erreichte die Phosphorylierung nach 6 h das Maximum, nahm über die folgenden Tage stetig ab und erreichte am Tag d4 ein Level das geringfügig (-20% in T1371-R175H) oder deutlich (-80% in T1447 cl4-N239D; -85% in T1495-R273H) unter dem initialen pChk1^{Ser317}-Level lag. Für die p53_{wT}-Linie T1440 wurde eine effiziente Induktion der Phosphorylierung von Chk1 beobachtet, die nach 6 h noch nicht maximal war, während pChk1^{Ser317} in T1522 unter dem Western blot-Bedingungen auch nach der Doppelbehandlung zu keinem Zeitpunkt nachweisbar war.



Abb. 41: Veränderung des pChk1^{ser317}- bzw. pChk2^{ser19}-Levels nach der Doppelbehandlung mit Bestrahlung und Temozolomid. Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung am Serylrest S317 der Kinase Chk1 (pChk1^{Ser317}) bzw. am Serylrest S19 der Kinase Chk2 (pChk2^{Ser19}) über fünf Tage nach der Doppelbehandlung mit 5 Gy Bestrahlung und 100 μM Temozolomid. Das pChk1^{Ser317}- (**A**) und das pChk2^{Ser19}- (**B**) Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen (C). – Chk1, *checkpoint kinase* 1; Chk2, *checkpoint kinase* 2; h, Stunde; d, Tag.

Die Doppelbehandlung führte in allen SLGC-Linien, mit Ausnahme der Zelllinie T1522, zu einem Anstieg der Phosphorylierung am Serylrest S19 der Kinase Chk2 (Abb. 41 B). Eine Zunahme des Phosphorylierungsgrads von Chk2 war in vier Linien (T1440, T1442, T1447 cl4, T1495) sowohl nach der alleinigen Bestrahlung als auch nach der Behandlung mit TMZ festzustellen, während es im Fall von T1371 nur nach der Bestrahlung zu einem Anstieg des pChk2^{Ser19}-Levels kam. Im Fall der p53_{wT}-Linie T1522 war eine Steigerung der Chk2-Phosphorylierung nach der Bestrahlung, aber nicht nach der Behandlung mit TMZ oder der Doppelbehandlung, zu beobachten. Im Detail stieg der Phosphorylierungsgrad von Chk2 in T1440 nach 6 h um das 7-Fache und innerhalb der nächsten 18 h weiter um das 6-Fache, sodass ein pChk2^{Ser19}-Level erreicht wurde, das 40-mal höher war als der Kontrollwert, während in Extrakten von T1522 keine Veränderung des pChk2^{Ser19}-Levels zu verzeichnen war (möglicherweise aufgrund der sehr geringen Signalstärke). Im Vergleich dazu nahm der Grad der Phosphorylierung von Chk2 in der p53-GOF T1442 nach 6 h um das 3-Fache zu, erreichte am Tag d1 ein Maximum (relativ zur Kontrolle 4,5-fach erhöht) und sank stetig bis zum Tag d5 auf ein relativ zum Ausgangswert um 60% höheres Level. Im Fall von T1447 cl4 wurde das maximale pChk2^{ser19}-Level nach 6 h erreicht (4,5-fach erhöht). Das pChk2^{Ser19}-Level sank über die folgenden vier Tage annähernd auf das Ausgangslevel und wies am Tag d5 einen geringfügigen, erneuten Anstieg auf. In Extrakten der p53-Mutante T1371 wurde die maximale Phosphorylierung nach 6 h detektiert (relativ zur Kontrolle 3fach erhöht). Anschließend sank das pChk2^{Ser19}-Level innerhalb der nächsten 18 h um die Hälfte, bevor am Tag d3 ein erneuter Anstieg um 60% auf ein Plateau zu verzeichnen war, das 2-fach über dem Ausgangswert lag. Im Fall der vierten p53_{mut}-Linie T1495 kam es innerhalb von 6 h nach der Doppelbehandlung zu einem drastischen, 20-fachen Anstieg des pChk2^{Ser19}-Levels, das am Tag d2 sein Maximum erreichte (relativ zur Kontrolle 24-fach erhöht) und am Folgetag um 60% fiel. Über die nächsten zwei Tage variierte das pChk2^{Ser19}-Level um einen, im Vergleich zum Ausgangsniveau, 10- bis 13-fach erhöhten Wert.

Insgesamt wurde die Phosphorylierung der Kinase Chk2 durch die Doppelbehandlung in allen p53_{mut}-Linien und der p53_{wT}-Linie T1440 induziert. Im Fall von T1442-R248W folgte auf den initial starken Anstieg der Phosphorylierung innerhalb von 6 h eine weitere, geringe Steigerung des pChk2^{Ser19}-Levels mit einer moderaten Senkung des Phosphorylierungslevels über die nächsten Tage. Im Gegensatz zu den anderen p53_{mut}-Linien fehlte hier ein klares Maximum der Phosphorylierung. Bei T1447 cl4-N239D und T1371-R175H wurde ein Maximum der Phosphorylierung nach 6 h beobachtet, bei T1495-R273H dagegen erst am Tag d2. Nach Erreichen des jeweiligen Maximums nahm das pChk2^{Ser19}-Level in den folgenden Tagen ab, wobei die Senkung des Phosphorylierungslevels keinen linearen Verlauf zeigte.

Wie oben beschrieben, wiesen die p53wT-Linien ein sehr niedriges p53-Level auf, während sich alle p53-Mutanten bereits initial durch eine hohe p53-Expression aufzeichneten. In allen SLGC-Linien wurde die p53-Expression durch die Doppelbehandlung gesteigert, wobei wie zuvor die Steigerung im Fall von T1371-R175H gering war (Abb. 42 A). In der p53_{w1}-Linie T1440 nahm das p53-Level innerhalb von 6 h nach der Doppelbehandlung um das 15-Fache zu und stieg während der nächsten 18 h um das Doppelte bis ein Plateau erreicht wurde, das bis zum Tag d3 aufrechterhalten blieb. Über die folgenden zwei Tage stieg die p53-Expression, relativ zur Kontrolle, weiter auf ein 40-fach höheres Level an. Im Fall der zweiten p53_{wt}-Linie T1522 kam es zu einem 3,5-fachen Anstieg des p53-Levels nach 6 h, gefolgt von einer transienten Reduktion der p53-Expression am Tag d2 um 40%, bevor das p53-Level über die nächsten drei Tage weiter kontinuierlich zunahm und am Tag d5 4,5-fach über dem Ausgangswert lag. In den Extrakten der T1442-Linie (p53-GOF) kam es ebenfalls innerhalb von 6 h zu einem Anstieg des p53-Levels (+60%), wobei die p53-Expression das Maximum am Tag d2 erreichte (relativ zur Kontrolle 3-fach erhöht), am Folgetag in etwa auf das Ausgangsniveau sank und über die nächsten zwei Tage geringfügig anstieg (relativ zur Kontrolle am Tag d5 35% erhöht). Im Vergleich dazu nahm das p53-Level in der zweiten p53_{mut}-Linie T1447 cl4 innerhalb von 6 h um das 2,5-Fache zu, zeigte einen Peak nach 24 h (relativ zur Kontrolle 3-fach erhöht), nahm über die folgenden vier Tage kontinuierlich ab und erreichte einen Wert, der 65% höher lag als der Kontrollwert. Die dritte p53_{mut}-Linie T1371 wies zwar auch innerhalb von 6 h einen Anstieg des p53-Levels auf (+80%), jedoch variierte das p53-Level über die nächsten drei Tage nur gering (± 15%), erreichte am Tag d4 ein Maximum (relativ zur Kontrolle 2-fach erhöht) und sank auf einen Wert, der 70% über dem Ausgangswert lag. Im Gegensatz dazu nahm das p53-Level in T1495 nach 6 h um 95% zu, stieg über die nächsten vier Tage weiter an und erreichte am Tag d4 ein Maximum (relativ zur Kontrolle 3-fach erhöht), bevor es am Tag d5 zu einer Reduktion des p53-Levels auf einen, relativ zum Ausgangsniveau, 2-fach erhöhten Wert kam.

Insgesamt wurde das p53-Level in den beiden p53_{WT}- und den vier p53_{mut}-Linien innerhalb von 6 h nach der Doppelbehandlung erhöht und lag nach fünf Tagen gering (T1371-R175H, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) bis sehr deutlich (T1522) über dem p53-Level der Kontrollen. In der p53_{WT}-Linie T1522 und den p53_{mut}-Linien T1371-R175H und T1495-R273H wurde die höchste p53-Expression jedoch erst am Tag d4 (T1371, T1495) bzw. d5 (T1522) gemessen. Im Gegensatz zur p53_{WT}-Linie T1522, die eine deutliche, transiente Reduktion des p53-Levels zeigte, nahm die Expression in T1371-R175H und T1495-R273H eher konstant zu. Die beiden anderen p53_{mut}-Linien zeigten eine kontinuierliche (T1447 cl4-N239D) bzw. dtastische Senkung des p53-Levels innerhalb von vier Tagen (T1447 cl4-N239D) bzw. 24 h (T1442-R248W).



Abb. 42: Veränderung des p53- und p21^{cip1/WAF1}-Levels nach der Doppelbehandlung mit Bestrahlung und Temozolomid. Zeitlicher Verlauf des Expressionslevels von p53 und p21^{Cip1/WAF1} über fünf Tage nach der Doppelbehandlung mit 5 Gy Bestrahlung und 100 μ M Temozolomid. Das p53- (A) und p21^{Cip1/WAF1}- (B) Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen (C). – p53, Tumorsuppressorprotein p53; p21^{Cip1/WAF1}, Zellzyklusregulator p21^{Cip1/WAF1}; h, Stunde; d, Tag.

Während nach der Bestrahlung mit 5 Gy das p21^{Cip1/WAF1}-Level aller SLGC-Linien anstieg, kam es nach der Einzelbehandlung mit TMZ zu einer Senkung des p21^{Cip1/WAF1}-Levels im Fall der p53_{WT}-Linie T1440 und der p53_{mut}-Linie T1442-R248W sowie initial im Fall des Klons T1447 cl4-N239D. Auch nach der Doppelbehandlung zeigten T1440, T1442-R248W und T1447 cl4-N239D eine Abnahme des p21^{Cip1/WAF1}-Signals, während T1522, T1371-R175H und T1495-R273H einen Anstieg des p21^{Cip1/WAF1}-Levels aufwiesen, wenn auch unterschiedlich effizient und zeitlich verschoben (Abb. 42 B). Im Detail sank das p21^{Cip1/WAF1}-Level in der p53_{WT}-Linie T1440 innerhalb von 6 h um die Hälfte und um weitere 85% innerhalb der nächsten 18 h, während das p21^{Cip1/WAF1}-Level im Fall von T1522 nach 6 h um das 10-Fache anstieg und nach 24 h das Maximum erreichte (relativ zur Kontrolle 12-fach erhöht). Anschließend fiel das p21^{Cip1/WAF1}-Level über die folgenden vier Tage auf einen Wert, der im Vergleich zum Kontrollwert 6,5-mal höher war. Dagegen wies die p53-GOF T1442 eine stetige Reduktion des p21^{Cip1/WAF1}-Levels über fünf Tage auf, bis dieses am Tag d5 unterhalb der Nachweisgrenze des Antikörpers lag. Im Fall der zweiten p53_{mut}-Linie T1447 cl4 fiel das p21^{Cip1/WAF1}-Level innerhalb von 6 h nach der Doppelbehandlung um 85%, nahm bis zum Tag d1 um das Doppelte zu und reduzierte sich über die nächsten vier Tage zunehmend, sodass das p21^{Cip1/WAF1}-Level am Tag d5 unterhalb der Nachweisgrenze des Antikörpers lag. In den Extrakten von T1371 war nach 6 h ein 2,5-facher Anstieg des p21^{Cip1/WAF1}-Levels zu beobachten, gefolgt von einer Senkung um 45% bis zum Tag d2, bevor am Tag d3 das p21^{Cip1/WAF1}-Level erneut um das Doppelte anstieg und über die nächsten zwei Tage auf diesem erhöhten Level verblieb (2,5-fach höher als der Kontrollwert). Im Vergleich dazu zeigte die vierte p53_{mut}-Linie T1495 lediglich nach 6 h eine geringfügige, transiente Senkung des p21^{Cip1/WAF1}-Levels um 30% und am Tag d2 einen transienten Anstieg des p21^{Cip1/WAF1}-Levels (relativ zur Kontrolle 2-fach erhöht), während das p21^{Cip1/WAF1}-Level an den übrigen Zeitpunkten um den Kontrollwert variierte.

Insgesamt wurde eine starke Induktion des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1/WAF1} nach der Doppelbehandlung nur in der p53_{WT}-Linie T1522 beobachtet, wobei das p21^{Cip1/WAF1}-Level über die nächsten Tage zwar sank, jedoch auf einem hohen Niveau blieb. Eine moderate Steigerung des p21^{Cip1/WAF1}-Levels war in T1371-R175H festzustellen (2,5-fach), wobei die p21^{Cip1/WAF1}-Expression in den nächsten Tagen geringfügig variierte. Die p53_{WT}-Linie T1440 sowie die p53-Mutante T1447 cl4-N239D zeigten dagegen eine drastische Reduktion des p21^{Cip1/WAF1}-Levels innerhalb von 24 h. Auch in T1442-R248W reduzierte sich die initial vorhandene p21^{Cip1/WAF1}-Expression, allerdings weniger drastisch, sodass das Minimum nach vier Tagen erreicht war. Die p53-Mutante T1495-R273H zeigte eine transiente, 2-fache Steigerung des p21^{Cip1/WAF1}-Levels am Tag d2.



Abb. 43: Veränderung des γ H2AX-Levels nach der Doppelbehandlung mit Bestrahlung und Temozolomid. Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung am Serylrest S139 des Histons H2AX (γ H2AX) über fünf Tage nach der Doppelbehandlung mit 5 Gy Bestrahlung und 100 μ M Temozolomid. Das γ H2AX-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen (C). – h, Stunde; d, Tag.

Wie bereits nach den Einzelbehandlungen mit 5 Gy bzw. 100 µM TMZ, stieg auch nach der Doppelbehandlung der Grad der Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139 in jeder SLGC-Linie an (Abb. 43). So nahm das γH2AX-Level in Extrakten der p53_{WT}-Linie T1440 innerhalb von 6 h nach der Doppelbehandlung um das 2,5-Fache zu und stieg bis zum Tag d1 auf das 19-Fache des Ausgangswerts. Im Fall der zweiten p53_{wT}-Linie T1522 stieg das γH2AX-Level nach 6 h um das 3-Fache, nahm über die nächsten zwei Tage geringfügig weiter zu und erreichte das Maximum am Tag d2 (relativ zur Kontrolle 4-fach erhöht), bevor der Grad der Phosphorylierung an den folgenden zwei Tagen um die Hälfte abnahm. Am Tag d5 stieg die Phosphorylierung von H2AX auf das 3-Fache des Ausgangswerts. In Extrakten der p53-Mutante T1442 wurde die maximale Phosphorylierung von H2AX, nach einem 3,5-fachen Anstieg des yH2AX-Levels nach 6 h, innerhalb von 24 h erreicht (relativ zur Kontrolle 4-fach erhöht). Anschließend nahm die Phosphorylierung von H2AX über die nächsten vier Tage kontinuierlich ab und lag am Tag d5 30% über dem Kontrollwert. Ähnlich verhielt sich die zweite p53_{mut}-Linie T1447 cl4, in der es zu einem transienten Anstieg des γH2AX-Levels nach 6 h kam (60%) sowie einer zunehmenden Reduktion der Phosphorylierung bis zum Tag d4 (6 h bis d4: -80%). Am Tag d5 nach der Doppelbehandlung war das γ H2AX-Level um 40% geringer als der Ausgangswert. Im Gegensatz dazu nahm die Phosphorylierung von H2AX in T1371 nach 6 h um das 6,5-Fache zu und stieg bis zum Tag d4 kontinuierlich weiter (relativ zur Mutterkultur 100-fach), bevor es am Folgetag zu einer Reduktion um 25% kam. Im Fall der vierten p53-Mutante T1495 stieg das γH2AX-Level nach 6 h um das 2,5-Fache und nahm sogar bis zum Tag d5 zu (relativ zur Kontrolle 16-fach erhöht).

Insgesamt zeigten zwei der p53-Mutanten (T1371-R175H, T1495-R273H) eine stetige Zunahme der Phosphorylierung des Histons H2AX über einen Zeitraum von vier (T1371-R175H) bzw. fünf (T1495-R273H) Tagen nach der Doppelbehandlung. Dagegen erreichte die Phosphorylierung des Histons im Fall der beiden anderen p53-Mutanten bereits nach 6 h (T1447 cl4-N239D) bzw. 24 h (T1442-R248W) das Maximum und nahm danach bis zum Tag d5 nahezu linear ab. Die Phosphorylierung von H2AX wurde auch in den beiden p53_{WT}-Linien T1440 und T1522 sehr effizient innerhalb von 6 h induziert und stieg während der ersten 24 h (T1440) bzw. bis zum zweiten Tag (T1522) weiter an. Dabei war der Anstieg für T1522 im Gegensatz zu T1440 nur noch gering. Über den weiteren Verlauf des γ H2AX-Levels konnte im Fall von T1440 keine Aussage getroffen werden; für T1522 kam es nach einer intermediären Senkung zu einem erneuten Anstieg, sodass die γ H2AX-Level an den Tagen d3 und d5 identisch waren.

Vergleich des Proteinphosphorylierungsgrads bzw. der Proteinexpression nach Einfach- und Doppelbehandlung

Nachdem oben im Detail beschrieben wurde, inwiefern sich die Phosphorylierung vom ATM, Chk1, Chk2 sowie H2AX und die Expressionslevel von p53 sowie dem p53-Zielgen p21^{Cip1/WAF1} in den einzelnen SLGC-Linien nach der Bestrahlung mit 5 Gy, der Behandlung mit 100 µM TMZ bzw. der Doppelbehandlung über einen Zeitraum von fünf Tagen verändern, werden die Resultate der Behandlungen in diesem Abschnitt miteinander verglichen. Dabei ist noch einmal zu bedenken, dass im Fall der p53_{WT}-Linie T1440 die Daten zur Doppelbehandlung nur bis zum Tag d1 erhoben wurden und im Fall der p53_{mut}-Linie T1447 cl4 nur Ergebnisse bis zum Tag d3 nach alleiniger Bestrahlung in die Betrachtung eingehen.

Mit Ausnahme der p53_{WT}-Linie T1522 konnte in allen SLGC-Linien eine Phosphorylierung der Kinase ATM am Servlrest S1981 durch die Behandlungen induziert werden. Dabei war im Fall der zweiten p53_{WT}-Linie T1440 der Anstieg der Phosphorylierung von ATM nach alleiniger Bestrahlung und der Doppelbehandlung ähnlich stark (16-fach nach 5 Gy; 15-fach nach Doppelbehandlung), während das pATM^{Ser1981}-Level nach der Behandlung mit TMZ im gleichen Zeitraum (6 h) um das 8-Fache anstieg. Allerdings war nach der Zugabe von TMZ der maximale Phosphorylierungsgrad erst nach 24 h erreicht und nicht wie im Fall der alleinigen Bestrahlung bereits nach 6 h. Zu welchem Zeitpunkt das maximale pATM^{Ser1981}-Level nach der Doppelbehandlung erreicht wurde, konnte nicht festgestellt werden (jedoch nicht nach 6 h). In der p53_{mut}-Linie T1442-R248W wurde die maximale Phosphorylierung von ATM im Fall der alleinigen Bestrahlung nach 6 h, im Fall der Doppelbehandlung nach 24 h und im Fall der Behandlung mit TMZ erst am Tag d4 erreicht, wobei der Anstieg der Phosphorylierung nach der Bestrahlung und der Doppelbehandlung ähnlich effizienten waren (10-fach erhöht), während am vierten Tag nach der Zugabe des TMZ die Phosphorylierung geringer ausfiel (6,5-fach erhöht; Abb. 44). In den Extrakten der zweiten p53-Mutante T1447 cl4-N239D waren die Veränderungen des pATM^{Ser1981}-Levels nach alleiniger Bestrahlung bzw. Doppelbehandlung nahezu identisch (Abb. 44). In beiden Fällen kam es zu einem etwa 65-fachen Anstieg des pATM^{Ser1981}-Levels innerhalb von 6 h, gefolgt von einer starken Reduktion innerhalb der nächsten 18 h, während nach der Behandlung mit TMZ die Induktion der Phosphorylierung von ATM zwar auch innerhalb von 6 h auftrat, jedoch nur halb so stark war (30-fach) und die Abnahme des pATM^{Ser1981}-Levels langsamer verlief. Die pATM^{Ser1981}-Level der dritten p53_{mut}-Linie T1371-R175H wiesen erst ab dem Tag d3 nach den Behandlungen deutliche Unterschiede auf. Dabei wurde das Maximum am Tag d3 nach der Zugabe von TMZ erreicht, jedoch erst am Tag d4 nach der Doppelbehandlung. Die alleinige Bestrahlung zeigte kein eindeutiges Maximum, allerdings mündete das pATM^{Ser1981}-Level am Tag d4 auf einem Plateau, dass 45% unter dem Maximum der Doppelbehandlung lag, wobei die maximale Phosphorylierung von ATM am Tag d3

nach der TMZ-Behandlung auftrat (25% höher als das maximale pATM^{Ser1981}-Level nach der Doppelbehandlung). Im Vergleich dazu war in T1495-R273H im Fall der alleinigen TMZ-Behandlung und der Doppelbehandlung sowohl nach 6 h als auch am Tag d4 ein Peak des pATM^{Ser1981}-Levels zu verzeichnen (von identischer Höhe), während nach der alleinigen Bestrahlung der erste Peak (hier am Tag d1) nahezu verschwand und das maximale pATM^{Ser1981}-Level am Tag d4 erreicht wurde, welches minimal unter dem Level der TMZ- bzw. der Doppelbehandlung lag (-10%). Die transiente Senkung des pATM^{Ser1981}-Levels war nach der Doppelbehandlung weniger ausgeprägt als nach der alleinigen TMZ-Behandlung.



Abb. 44: Vergleich des pATM-Levels nach Einfach- und Doppelbehandlung. Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung am Serylrest S1981 der Kinase ATM (pATM^{Ser1981}) über fünf Tage nach Bestrahlung mit 5 Gy (RT), Behandlung mit 100 μM Temozolomid (TMZ) bzw. der Doppelbehandlung (RT+TMZ). Das pATM^{Ser1981}-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) bzw. Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen. – ATM, *Ataxia telangiectasia mutated*.

Insgesamt war nur im Fall von T1447 cl4-N239D kaum ein Beitrag des TMZ zur Doppelbehandlung festzustellen. Im Fall von T1371-R175H konnte die Koapplikation von TMZ die ATM-Phosphorylierung erhöhen. In der p53_{WT}-Linie T1440 sowie in den anderen zwei p53-Mutanten (T1442-R248W, T1495-R273H) war ein Einfluss des TMZ in der Doppelbehandlung auf den Zeitpunkt der maximalen Phosphorylierung nachweisbar. Während im Fall von T1440 und T1442-R248W der Zeitpunkt des Maximums von 6 h auf 24 h verschoben wurde, war im Fall von T1495-R273H ein zusätzliches Maximum nach 6 h zu verzeichnen, dass nach alleiniger Bestrahlung nicht zu detektieren war. In Extrakten der Linien T1440, T1442-R248W und T1447 cl4-N239D wurde die Phosphorylierung von ATM durch Bestrahlung stärker induziert als durch die Behandlung mit TMZ, dagegen gab es im Fall der p53-Mutante T1495-R273H nur einen geringen Unterschied und im Fall von T1371-R175H war es umgekehrt.

Unabhängig von der Art der Behandlungen nahm die Phosphorylierung der Kinase Chk1 am Serylrest S317 in der p53_{wT}-Linie T1440 sowie die p53_{mut}-Linien T1371-R175H, T1442-R248W und T1495-R273H zu, wohingegen im Fall der zweiten p53_{wT}-Linie T1522 über den gesamten Zeitraum kein Signal nachgewiesen wurde und im Fall der p53-Mutante T1447 cl4-N239D nach alleiniger Bestrahlung mit 5 Gy bzw. der Behandlung mit 100 µM TMZ, nicht aber nach der Doppelbehandlung, ausschließlich eine Reduktion des pChk1^{Ser317}-Levels zu beobachten war. So wurde in den Extrakten der T1440-Linie nach der alleinigen Bestrahlung das maximale pChk1^{Ser317}-Level erst am Tag d4 erreicht, während es nach der Behandlung mit TMZ allein oder in Kombination mit Bestrahlung zu einem sofortigen Anstieg der Chk1-Phosphorylierung kam. Im Fall der TMZ-Einfachbehandlung wurde nach 24 h ein Plateau

erreicht und bis zum Tag d3 stieg das pChk1^{Ser317}-Level nur leicht an. Das maximale pChk1^{Ser317}-Level war nach der Bestrahlung mit 5 Gy 30% geringer als nach der Behandlung mit 100 µM TMZ. Dagegen kam es in der p53-GOF T1442-R248W durch die zusätzliche Gabe von TMZ zur Bestrahlung zu einer Verschiebung des maximalen pChk1^{Ser317}-Levels von 6 h nach alleiniger Bestrahlung hin zum Tag d3 in der Doppelbehandlung, wobei auch die Bestrahlung einen Einfluss auf den TMZ-Effekt ausübte, indem in diesem Fall der maximale Phosphorylierungsgrad von Tag d2 nach TMZ-Einfachbehandlung zum Tag d3 verschoben wurde (Abb. 45). Die maximale Phosphorylierung von Chk1 war zwar nach der Doppelbehandlung zweimal so hoch wie nach der alleinigen Bestrahlung (5-fach nach der Doppelbehandlung; 2,5-fach nach der Bestrahlung), jedoch im Vergleich zur TMZ-Behandlung geringer (6-fach). Im Gegensatz zu den Einzelbehandlungen wurde die Phosphorylierung von Chk1 in der p53-Mutante T1447 cl4-N239D durch die Doppelbehandlung erhöht und erreichte nach 6 h das Maximum, gefolgt von einer Reduktion des pChk1^{Ser317}-Levels über die folgenden fünf Tage auf ein ähnliches Level wie nach den Einzelbehandlungen (Abb. 45). Im Fall der dritten p53_{mut}-Linie T1371-R175H wurde die maximale Phosphorylierung von Chk1 nach jeder Behandlung innerhalb von 6 h erreicht, wobei die Zunahme der Phosphorylierung nach der alleinigen Bestrahlung am geringsten (+25%), nach der TMZ-Behandlung stärker (+75%) und im Fall der Doppelbehandlung am stärksten ausfiel (2,5-fach). Anschließend war nach allen Behandlungen eine ähnlich starke Reduktion des pChk1^{Ser317}-Levels vorhanden. In Extrakten der vierten p53-Mutante T1495-R273H waren die Verläufe des pChk1^{Ser317}-Levels nach der Behandlung mit TMZ bzw. der Doppelbehandlung nahezu gleich und zeigten ein Maximum nach 6 h, während nach der alleinigen Bestrahlung zwar die Phosphorylierung von Chk1 ebenfalls nach 6 h erhöht wurde, jedoch erst am Tag d2 maximal war und 20% höher lag als nach den anderen beiden Behandlungen.



Abb. 45: Vergleich des pChk1-Levels nach Einfach- und Doppelbehandlung. Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung am Serylrest S317 der Kinase Chk1 (pChk1^{Ser317}) über fünf Tage nach Bestrahlung mit 5 Gy (RT), Behandlung mit 100 μ M Temozolomid (TMZ) bzw. der Doppelbehandlung (RT+TMZ). Das pChk1^{Ser317}-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen. – pChk1, *checkpoint kinase* 1.

Insgesamt trugen sowohl die Bestrahlung als auch die Behandlung mit TMZ zum Effekt der Doppelbehandlung auf die Phosphorylierung von Chk1 in der p53_{wT}-Linie T1440 sowie den drei p53-Mutanten T1371-R175H, T1442-R248W und T1447 cl4-N239D bei. Nur im Fall von T1495-R273H war der Beitrag der Bestrahlung zur Doppelbehandlung minimal. Der maximale Anstieg der Phosphorylierung von Chk1 war nur in drei Zelllinien (T1440, T1371-R175H, T1447 cl4-N239D) nach der Doppelbehandlung höher als nach den Einfachbehandlungen, während im Fall von T1442-R248W das maximale pChk1^{Ser317}-Level nach alleiniger TMZ-Behandlung bzw. im Fall von T1495-R273H nach alleiniger Bestrahlung höher ausfiel als nach der Doppelbehandlung.

Eine Induktion der Phosphorylierung der Kinase Chk2 am Serylrest S19 wurde in allen SLGC-Linien nach jeder Art der Behandlung beobachtet, mit Ausnahme von T1371-R175H nach Behandlung mit TMZ und T1522 (p53_{WT}), in der lediglich sehr geringe pChk2^{Ser19}-Level detektiert wurden. Im Detail wies die p53_{WT}-Linie T1440 zwar nach jeder Behandlung innerhalb von 6 h einen Anstieg des pChk2^{ser19}-Levels auf, allerdings war die Induktion der Phosphorylierung von Chk2 nach Bestrahlung am geringsten (3,5fach) und nach der Behandlung mit TMZ am stärksten (10-fach); der Wert für die Doppelbehandlung lag dazwischen (7-fach). Dabei stieg am Tag d1 nach der Doppelbehandlung das pChk2^{Ser19}-Level so stark an, dass es nach 24 h höher war als das pChk2^{Ser19}-Level in Extrakten der Einfachbehandlungen nach dem Erreichen der Maxima am Tag d5 (Bestrahlung: 20-fach; TMZ: 35-fach). Im Vergleich dazu wurde die maximale Phosphorylierung von Chk2 in T1442-R248W nach der Bestrahlung innerhalb von 6 h, nach der TMZ-Behandlung nach 48 h und im Fall der Doppelbehandlung am Tag d1 erreicht (Abb. 46). Dabei war der maximale Grad der Phosphorylierung von Chk2 zwischen der Doppelbehandlung und der alleinigen Bestrahlung kaum verschieden (Doppelbehandlung: 4,5-fach; Bestrahlung: 4-fach), jedoch höher als nach der alleinigen Behandlung mit TMZ (2,5-fach). Dagegen wies die zweite p53_{mut}-Linie T1447 cl4-N239D 6 h nach der Bestrahlung bzw. der Doppelbehandlung die maximale Phosphorylierung von Chk2 auf, gefolgt von einer Reduktion des Phosphorylierungsgrads über drei (Bestrahlung) bzw. fünf (Doppelbehandlung) Tage, während das pChk2^{Ser19}-Level nach der TMZ-Behandlung zwar innerhalb von 6 h anstieg, sich jedoch bis zum Tag d3 geringfügig erhöhte und über die nächsten zwei Tage kaum veränderte (Abb. 46). Es waren ähnliche, maximale pChk2^{ser19}-Level nach der Bestrahlung und der Doppelbehandlung zu detektieren (Bestrahlung: 5-fach; Doppelbehandlung: 4,5-fach), die doppelt so hoch waren wie nach der Einfachbehandlung mit TMZ. In Extrakten der dritten p53-Mutante T1371-R175H waren die Verläufe nach der Bestrahlung bzw. der Doppelbehandlung ähnlich, mit einem Maximum nach 6 h im Gegensatz zur Reduktion des pChk2^{Ser19}-Levels nach der alleinigen Behandlung mit TMZ. Die Höhe der Zunahme der Phosphorylierung von Chk2 nach Bestrahlung bzw. Doppelbehandlung kann in diesem Fall nicht verglichen werden, da die Werte aus unterschiedlichen Western blot-Serien stammten. Im Fall der vierten p53_{mut}-Linie T1495-R273H wurde das maximale pChk2^{Ser19}-Level nach alleiniger Bestrahlung innerhalb von 6 h erreicht, während es nach der Behandlung mit TMZ bzw. der Doppelbehandlung zwar ebenfalls nach 6 h zu einem Peak kam, wurde das eigentliche Maximum im Fall der TMZ-Behandlung erst am Tag d4 und im Fall der Doppelbehandlung am Tag d2 beobachtet. Im Vergleich zur Einfachbehandlung mit TMZ nahm die Phosphorylierung von Chk2 nach der Doppelbehandlung drastisch zu (TMZ: maximal 3,5-fach; Doppelbehandlung: maximal 24-fach). Ein Vergleich zum pChk2^{Ser19}-Level der Extrakte nach der alleinigen Bestrahlung ist nicht möglich, da, wie im Fall von T1371-R175H, die Ergebnisse aus unterschiedlichen Western blot-Serien stammten.



Abb. 46: Vergleich des pChk2-Levels nach Einfach- und Doppelbehandlung. Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung am Serylrest S19 der Kinase Chk2 (pChk2^{Ser19}) über fünf Tage nach Bestrahlung mit 5 Gy (RT), Behandlung mit 100 μ M Temozolomid (TMZ) bzw. der Doppelbehandlung (RT+TMZ). Das pChk2^{Ser19}-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen. – pChk2, *checkpoint kinase* 2.

Insgesamt war das maximale pChk2^{Ser19}-Level in der p53_{WT}-Linie T1440 sowie allen p53_{mut}-Linien nach der Doppelbehandlung höher als nach der Einzelbehandlung mit TMZ und im Fall von T1442-R248W und T1447 cl4-N239D ähnlich hoch wie nach der alleinigen Bestrahlung mit 5 Gy (für T1371-R175H und T1495-R273H konnte dieser Vergleich nicht durchgeführt werden). Nur im Fall von T1440 war die Induktion der Phosphorylierung von Chk2 nach der alleinigen Bestrahlung geringer als nach der Einfachbehandlung mit TMZ.

Obwohl das basale Level von p53 in den p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) im Vergleich zu den p53_{WT}-Linien (T1440, T1522) bereits deutlich erhöht war, konnte das p53-Level in allen SLGC-Linien durch jede Behandlung gesteigert werden, wobei die effizienteste Steigerung in der p53_{wT}-Linie T1440 beobachtet wurde. So stieg das p53-Level in T1440 innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung bzw. Behandlung mit TMZ ähnlich stark an (durch Bestrahlung: 6-fach; durch TMZ: 7-fach), während es nach der Doppelbehandlung zu einem deutlich stärkeren Anstieg um das 15-Fache kam. Im Fall der alleinigen Bestrahlung wurde das Maximum am Tag d4 erreicht, im Fall der TMZ-Behandlung stieg das p53-Level bis zum Tag d5 stetig an und lag deutlich über dem Level nach der Bestrahlung (d4: 2,3-fach höher nach Behandlung mit TMZ). In Extrakten der zweiten p53_{WT}-Linie T1522 stieg das p53-Level 6 h nach der Behandlung mit TMZ 2-fach, nach der Bestrahlung 3-fach und nach der Doppelbehandlung 3,5-fach an. Während im Fall der Doppelbehandlung ein Peak nach 6 h erreicht war, stiegen die p53-Level nach der TMZ-Behandlung bzw. der Bestrahlung bis zum Tag d1 weiter leicht an, bevor es von Tag d1 zu Tag d2 zu einer Senkung des p53-Levels nach allen Behandlungen kam. Im Gegensatz zur Bestrahlung, nach der das p53-Level kontinuierlich fiel, kam es nach der Behandlung mit TMZ sowie der Doppelbehandlung nach der transienten Reduktion zu einer leichten (nach TMZ-Einfachbehandlung) bzw. starken (nach Doppelbehandlung) Zunahme des p53-Levels. Im Vergleich dazu war der Verlauf der p53-Expression über fünf Tage nach der Behandlung mit TMZ bzw. der Doppelbehandlung in der p53_{mut}-Linie T1442-R248W fast identisch und erreichte den maximalen Wert am Tag d2, während nach der alleinigen Bestrahlung das Maximum bereits nach 24 h erreicht wurde (Abb. 47). Zudem stieg das p53-Level nach der Bestrahlung weniger stark an als nach der Behandlung mit TMZ oder der Doppelbehandlung (nach Bestrahlung: max. +85%; nach TMZ/Doppelbehandlung: max. 3-fach). Das p53-Level stieg in T1447 cl4-N239D innerhalb von 6 h nach jeder Art der Behandlung ähnlich stark an (Abb. 47). Während jedoch das maximale p53-Level nach der Behandlung mit TMZ erreicht wurde, nahm das p53-Level nach der Bestrahlung und der Doppelbehandlung bis zum Tag d1 zu. Anschließend sank das p53-Level nach jeder Behandlung über die nächsten Tage, wobei die Abnahme nach der Bestrahlung am stärksten war und nach der Doppelbehandlung am geringsten. Im Fall der dritten p53-Mutante T1371-R175H wurde das p53-Level innerhalb von 6 h nach der Behandlung mit TMZ kaum (+25%), nach der alleinigen Bestrahlung stärker (+50%) und nach der Doppelbehandlung am stärksten (+80%) erhöht. Während das p53-Level nach der Bestrahlung von Tag d2 bis Tag d5 weiter leicht anstieg, war nach der Behandlung mit TMZ und der Doppelbehandlung ein zweiter Peak am Tag d4 zu beobachten, in dessen Anschluss das p53-Level sank. Im Vergleich dazu stieg das p53-Level 6 h nach der Behandlung in der vierten p53-Mutante T1495-R273H am geringsten nach der Bestrahlung (+45%) und am stärksten nach der Doppelbehandlung (+95%). Nach der alleinigen Bestrahlung wurde das maximale p53-Level nach drei Tagen erreicht, im Fall der TMZ-Einfachbehandlung war ein Peak nach 48 h festzustellen und im Fall der Doppelbehandlung war das p53-Level erst am Tag d4 maximal.



Abb. 47: Vergleich des p53-Levels nach Einfach- und Doppelbehandlung. Zeitlicher Verlauf des p53-Levels über fünf Tage nach Bestrahlung mit 5 Gy (RT), Behandlung mit 100 µM Temozolomid (TMZ) bzw. der Doppelbehandlung (RT+TMZ). Das p53-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen. – p53, Tumorsuppressor p53.

Insgesamt zeigten alle SLGC-Linien ein höheres bzw. gleich hohes (nur im Fall von T1442-R248W nach TMZ-Behandlung) p53-Level nach der Doppelbehandlung im Vergleich zu den Einzelbehandlungen. Während im Fall von T1522 und T1371-R175H die Bestrahlung innerhalb von 6 h zu einem höheren Anstieg des p53-Levels führte als die alleinige TMZ-Behandlung, war dies in den Linien T1440, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D und T1495-R273H umgekehrt.

Alle SLGC-Linien zeigten einen Anstieg des p21^{Cip1/WAF1}-Levels nach der Bestrahlung mit 5 Gy, wohingegen das p21^{Cip1/WAF1}-Level nach der Behandlung mit 100 µM TMZ und der Doppelbehandlung nur im Fall der p53wT-Linie T1522 und der p53-Mutante T1371-R175H zunahm, die Linien mit der geringsten, basalen p21^{cip1/WAF1}-Expression, und in der anderen p53_{WT}-Linie T1440 sowie den drei p53_{mut}-Linien T1442-R248W, T1447 cl4-N239D und T1495-R273H initial (T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) bzw. kontinuierlich (T1440, T1442-R248W) sank. Im Detail wies T1440 innerhalb von 6 h nach der Bestrahlung das maximale p21^{Cip1/WAF1}-Level auf und verharrte auf diesem hohen Level über die nächsten fünf Tage, während es nach der Behandlung mit TMZ und der Doppelbehandlung zu einer kontinuierlichen Senkung des p21^{Cip1/WAF1}-Levels kam, die im Fall der Doppelbehandlung langsamer war. Im Gegensatz dazu nahm das p21^{Cip1/WAF1}-Level in der zweiten p53_{WT}-Linie T1522 nach jeder Behandlung zu, innerhalb von 6 h nach der Behandlung mit TMZ am geringsten (3-fach), nach der Bestrahlung stärker (5,5-fach) und nach der Doppelbehandlung am stärksten (10-fach). Während nach der alleinigen Bestrahlung und der Doppelbehandlung das maximale p21^{Cip1/WAF1}-Level nach 24 h erreicht wurde, war dies im Fall der Behandlung mit TMZ erst nach 48 h festzustellen. Ähnlich wie T1440 verhielt sich die p53-Mutante T1442-R248W, in der die p21^{Cip1/WAF1}-Expression nach der Bestrahlung innerhalb von 6 h um das Doppelte anstieg, sich über die folgenden Tage allerdings reduzierte, und nach der Behandlung mit TMZ bzw. der Doppelbehandlung sank, wobei auch in dieser Linie die Abnahme des p21^{cip1/WAF1}-Levels nach der Doppelbehandlung geringer war als nach der TMZ-Einfachbehandlung (Abb. 48). Dagegen wurde das maximale p21^{Cip1/WAF1}-Level nach Bestrahlung in T1447 cl4-N239D nach 24 h beobachtet, gefolgt von einer drastischen Senkung des p21^{Cip1/WAF1}-Levels innerhalb von zwei Tagen (Abb. 48). Im Vergleich dazu kam es nach der Behandlung mit TMZ bzw. nach der Doppelbehandlung zu einer sofortigen, drastischen Reduktion des p21^{Cip1/WAF1}-Levels, welches im Fall der TMZ-Einfachbehandlung über die nächsten Tage erneut anstieg, jedoch im Fall der Doppelbehandlung über vier Tage weiter fiel. Dagegen stieg die p21^{Cip1/WAF1}-Expression in der p53_{mut}-Linie T1371-R175H nach allen Behandlungen innerhalb von 6 h, im Fall der TMZ- und der Doppelbehandlung um das 2,5-Fache und im Fall der alleinigen Bestrahlung um das 4-Fache. Nach jeder Behandlung wurde das p21^{Cip1/WAF1}-Level transient reduziert (ab Tag d1 nach TMZ- und Doppelbehandlung; ab Tag d2 nach Bestrahlung) und stieg ab Tag d3 erneut an, wobei der Anstieg 108
nach der TMZ-Einfachbehandlung am stärksten war (über zwei Tage um das 3,5-Fache). In Extrakten der p53-Mutante T1495-R273H war der Verlauf des p21^{Cip1/WAF1}-Levels nach der TMZ-Einfachbehandlung und der Doppelbehandlung über fünf Tage ähnlich, mit einer initialen Reduktion des p21-Levels nach 6 h, gefolgt von einem Peak am Tag d2, der nach der Doppelbehandlung etwas höher war (+15%). Im Gegensatz dazu führte die Bestrahlung zu einem geringen Anstieg des p21-Levels innerhalb von 6 h (+15%), bevor es über die nächsten Tage kontinuierlich abnahm.



Abb. 48: Vergleich des p21^{Cip1/WAF1}-Levels nach Einfach- und Doppelbehandlung. Zeitlicher Verlauf des p21^{Cip1/WAF1}-Levels über fünf Tage nach Bestrahlung mit 5 Gy (RT), Behandlung mit 100 μ M Temozolomid (TMZ) bzw. der Doppelbehandlung (RT+TMZ). Das p21^{Cip1/WAF1}-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen. – p21^{Cip1/WAF1}, Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1/WAF1}.

Insgesamt waren die p21^{Cip1/WAF1}-Level und die Verläufe der Level über fünf Tage nach der Behandlung mit TMZ und der Doppelbehandlung in der p53_{WT}-Linie T1440 sowie den p53-Mutanten T1442-R248W und T1495-R273H ähnlich, wohingegen sich im Fall der zweiten p53_{WT}-Linie T1522 zwar der Verlauf, nicht aber das Level, nach alleiniger Bestrahlung und Doppelbehandlung ähnelte. In den anderen zwei p53_{mut}-Linien T1371-R175H und T1447 cl4-N239D unterschieden sich die p21^{Cip1/WAF1}-Level und Verläufe deutlicher. Während in T1440, T1371-R175H, T1442-R248W sowie T1447 cl4-N239D die maximalen p21^{Cip1/WAF1}-Level durch die Bestrahlung induziert wurden, geschah dies im Fall von T1522 und T1495-R273H durch die Doppelbehandlung.

Jede Art der Behandlung führte in den SLGC-Linien zu einer Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139, wobei die Effizienz wiederum behandlungs- und zelllinienspezifisch war. So nahm die Phosphorylierung in T1440, einer p53_{WT}-Linie, innerhalb von 24 h um das 3,5-Fache zu, ähnlich wie nach der Einfachbehandlung mit TMZ, während das γH2AX-Level nach der Doppelbehandlung um das 18-Fache stieg. Nach der Behandlung mit TMZ wurde der maximale Phosphorylierungsgrad von H2AX nach 48 h erreicht, wohingegen das γH2AX-Level nach der Bestrahlung kontinuierlich über die nächsten Tage zunahm. Im Fall der zweiten p53_{WT}-Linie T1522 nahm die Phosphorylierung von H2AX innerhalb von 6 h ähnlich stark zu (Bestrahlung/ Doppelbehandlung: 3-fach; TMZ-Behandlung: 2,5fach) und erreichte das Maximum nach allen Behandlungen am Tag d2, wobei sich das maximale γH2AX-Level nach Bestrahlung bzw. Behandlung mit TMZ ähnelte (Bestrahlung: 5-fach; TMZ: 5,5-fach), aber nach der Doppelbehandlung geringer war (4-fach erhöht). Dagegen wurde im Fall der p53-Mutante T1442-R248W die maximale Phosphorylierung von H2AX nach 6 h beobachtet, während das Maximum nach der Doppelbehandlung erst nach 24 h festzustellen war und im Fall der TMZ-Einfachbehandlung sogar erst am Tag d3 (Abb. 49). Die maximale Induktion der Phosphorylierung war nach allen Behandlungen ähnlich (Bestrahlung/Doppelbehandlung: 4-fach; TMZ: 3,5-fach). Während nach der Bestrahlung und der Doppelbehandlung das yH2AX-Level über die folgenden Tage sank, verblieb das γH2AX-Level nach der TMZ-Behandlung nach Erreichen des Maximums auf dem erhöhten Level. Im Vergleich dazu war in der zweiten p53_{mut}-Linie T1447 cl4-N239D innerhalb von 6 h ein Anstieg des γ H2AX-Levels nach der Bestrahlung um 30% und nach der Doppelbehandlung von 60% zu beobachten, während die TMZ-Behandlung zu keiner Veränderung innerhalb dieser Zeit führte (Abb. 49). Im Fall der alleinigen Bestrahlung stieg das γH2AX-Level weiter und erreichte nach 24 h ein Maximum, bevor es zu einer zunehmenden Reduktion kam, während nach der Doppelbehandlung das γ H2AX-Level bereits innerhalb von 24 h deutlich reduziert wurde und über die nächsten Tage weiter abnahm. Im Gegensatz dazu kam es nach der alleinigen TMZ-Behandlung zu einer transienten Senkung des γH2AX-Levels nach 24 h sowie einer erneuten, starken Abnahme nach Tag d2, ähnlich wie nach der Doppelbehandlung. In Extrakten der dritten p53-Mutante T1371-R175H nahm der Grad der Phosphorylierung nach allen Behandlungen kontinuierlich zu und erreichte im Fall der TMZ- und der Doppelbehandlung ein Maximum am Tag d4, nach der alleinigen Bestrahlung erst am Tag d5. Das Maximum des γH2AX-Levels war nach der TMZ-Behandlung am geringsten (30-fach), nach der Bestrahlung stärker (75-fach) und nach der Doppelbehandlung am stärksten (100-fach). Im Fall der vierten p53_{mut}-Linie T1495 nahm die Phosphorylierung innerhalb von 6 h nach der Behandlung mit TMZ um 45% zu, während nach der alleinigen Bestrahlung bzw. der Doppelbehandlung das γH2AX-Level bereits um das 2,5-Fache gesteigert wurde. Im Gegensatz zur Bestrahlung, nach der das γH2AX-Level über fünf Tage stetig zunahm, stieg der Grad der Phosphorylierung nach der TMZ-Behandlung bis zum Tag d3 nur gering, zeigte jedoch über die folgenden zwei Tage einen drastischen Anstieg (von Tag d3 bis d5: 5-fach). Nach der Doppelbehandlung war in den ersten 48 h ein Anstieg des γH2AX-Levels zu beobachten, der analog zur alleinigen Bestrahlung war, erreichte dann ein Plateau und nahm erst nach zwei weiteren Tagen weiter zu. Der maximale Phosphorylierungsgrad nach den einzelnen Behandlungen unterschied sich kaum (Bestrahlung: 14,5-fach; TMZ: 17-fach; Doppelbehandlung: 16,5fach).



Abb. 49: Vergleich des γ **H2AX-Levels nach Einfach- und Doppelbehandlung.** Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung am Serylrest S139 des Histons H2AX (γ H2AX) über fünf Tage nach Bestrahlung mit 5 Gy (RT), Behandlung mit 100 μ M Temozolomid (TMZ) bzw. der Doppelbehandlung (RT+TMZ). Das γ H2AX-Level wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen.

Insgesamt war die Phosphorylierung von H2AX in der p53_{wT}-Linie T1522 und den p53-Mutanten T1442-R248W, T1447 cl4-N239D und T1495-R273H nach der Doppelbehandlung nicht höher als nach der "dominanten" Einzelbehandlung. Nur im Fall der p53_{mut}-Linie T1371-R175H war das maximale γ H2AX-Level nach der Doppelbehandlung höher. Für die p53_{wT}-Linie T1440 kann keine valide Aussage getroffen werden, wobei anhand des γ H2AX-Levels nach 24 h vermutet werden könnte, dass auch hier die Effizienz der Phosphorylierung von H2AX nach der Doppelbehandlung höher ist als nach den Einfachbehandlungen.

Fazit – Einfach- und Doppelbehandlung in SLGC-Linien

Die Effizienz der Induktion von Phosphorylierung bzw. Proteinexpression und die Verläufe über fünf Messtage waren sowohl zelllinien- als auch behandlungsspezifisch sowie für jedes untersuchte Protein verschieden. Dabei wiesen die p53wT-Linien T1440 und T1522 hinsichtlich der Effekte nach den Behandlungen deutliche Unterschiede auf. Während in T1440 die Induktion von Phosphorylierung bzw. Proteinexpression, mit Ausnahme von ATM, durch die Behandlung mit 100 µM TMZ deutlich effizienter induziert wurde als durch die Bestrahlung mit 5 Gy (im Fall von p21^{cip1/WAF1} reduziert), konnte solch ein Unterschied in T1522 nicht festgestellt werden, wobei in dieser Linie keine Phosphorylierung von ATM und Chk1 sowie eine äußerst schwache Phosphorylierung von Chk2 detektiert wurde. Im Gegensatz zu T1440, in der das p21^{Cip1/WAF1}-Level durch die Behandlung mit TMZ bzw. die Doppelbehandlung reduziert wurde, zeigte T1522 die höchste Induktion der p21^{Cip1/WAF1}-Expression nach jeder Art der Behandlung. Ebenso konnten zwischen den p53_{mut}-Linien nur geringe Ähnlichkeiten beobachtet werden. Dabei wiesen die beiden p53-GOFs T1371-R175H und T1495-R273H eine starke Induktion der Phosphorylierung von H2AX auf, die über vier bzw. fünf Tage stetig zunahm, während in T1442-R248W, der dritten p53-GOF, das γH2AX-Level nur moderat gesteigert (vergleichbar zur p53_{wT}-Linie T1522) und das Maximum früher erreicht wurde. Zudem gehörte T1495-R273H zu den Linien mit der höchsten Induktion von pATM^{Ser1981}, pChk1^{Ser317} und pChk2^{Ser19}, wobei das p53- und das p21^{Cip1/WAF1}-Level moderat (p53) bzw. eher gering (p21^{Cip1/WAF1}) zunahm. Im Gegensatz zu T1371-R175H und T1495-R273H, in dessen Extrakten das p21^{Cip1/WAF1}-Level nach jeder Behandlung anstieg, zeigte T1442-R248W (ähnlich wie T1440) nach der Behandlung mit TMZ bzw. der Doppelbehandlung eine Reduktion der p21^{Cip1/WAF1}-Expression über den gesamten Messzeitraum. Im Vergleich zu den p53-GOFs wurde die Phosphorylierung von Chk1 in der p53-missense Mutante T1447 cl4-N239D nicht (nach Bestrahlung und Behandlung mit TMZ) bzw. kaum (nach Doppelbehandlung) gesteigert. Ebenso stieg der Grad der Phosphorylierung von H2AX nur geringfügig (maximal 80% nach Bestrahlung). Der Klon T1447 cl4-N239D zeigte bereits basal hohe Level an pChk1^{Ser317} und γH2AX. Die bereits hohen, basalen p53-Level der p53_{mut}-Linien konnten nach den Behandlungen weiter gesteigert werden, ähnlich stark wie in der p53_{WT}-Linie T1522, aber deutlich geringer als in Extrakten der zweiten p53_{WT}-Linie T1440.

4.2.3. Untersuchung der yH2AX-Induktion auf Einzelzellniveau

Die Analyse des γ H2AX-Levels mittels Western blot zeigte, dass in einigen SLGC-Linien in den Extrakten der Kontrollen bereits ein Signal detektiert wurde (siehe Kapitel 4.2.1.). Dies könnte einerseits auf einer geringen Phosphorylierung des Histons H2AX in allen Zellen einer Kultur oder aber auf einer starken Phosphorylierung in wenigen Zellen zurückzuführen sein. Um diese Frage zu klären, wurden immunzytologische Färbungen mit einem anti- γ H2AX-Antikörper durchgeführt. Weiterhin wurde in den Western blot-Analysen festgestellt, dass die p53-Mutanten T1371-R175H und T1442-R248W innerhalb von 6 h nach der Behandlung die Phosphorylierung von H2AX effizienter induzierten als die zwei anderen p53_{mut}-Linien T1447 cl4-N239D und T1495-R273H, wobei die Induktion in T1447 cl4-N239D am geringsten war. Um die Induktion der Phosphorylierung von H2AX in der Frühphase nach der Behandlung mit 5 Gy und der Doppelbehandlung mit Photonenstrahlung und 100 μ M TMZ durchgeführt; für die alleinige TMZ-Behandlung erfolgten Färbungen nach 1 h und nach 24 h. Für die Quantifizierung wurden zunächst Kontrollfärbungen durchgeführt und die Einstellung am digitalen Mikroskop definiert, die es ermöglicht (bei optimierter *"signal-noise-ratio"*) zwischen schwachen und

starken Signalen zu unterscheiden. Ein Beispiel für eine solche immunzytologische Färbung ist in Abbildung 50 gezeigt. Die stark positiven Zellen wurden in zehn repräsentativen Mikrofotographien gezählt und der Mittelwert des Anteils γ H2AX-positiver Zellen graphisch dargestellt (Abb. 51). Eine statistische Auswertung wurde nicht durchgeführt, da vor allem nach der Doppelbehandlung Areale mit wenigen Zellen und solche mit vielen Zellen zu detektieren waren und eine Variation der Signalstärke zu beobachten war.



Abb. 50: H2AX-Phosphorylierung in T1442 zu frühen Zeitpunkten nach Einfach- und Doppelbehandlung. Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α – γ H2AX (rot) von behandelten T1442-Kulturen bzw. korrespondierenden Kontrollen (DMSO) 1 h, 2 h, 4 h, 8 h bzw. 24 h nach der Behandlung. TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Für die Quantifizierung wurden nur stark γ H2AX-positive (weiße Pfeile) und nicht schwach positive Zellkerne (grüne Pfeile) berücksichtigt. Die Expositionszeit wurde so gewählt, dass schwach γ H2AX-positive Zellkerne kaum zu detektieren waren. Messbalken, 50 μ m. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139; DMSO, Dimethylsulfoxid.

Zunächst wurde untersucht, inwiefern das basale γ H2AX-Level mit der Anzahl γ H2AX-positiver Zellen in SLGC-Kulturen korreliert. Es zeigte sich, dass im Fall der T1442-R248W-Kultur, welche ein moderates γ H2AX-Level aufwies (Abb. 31 B), vereinzelte Zellkerne ein deutlich stärkeres γ H2AX-Signal aufwiesen (3%; Abb. 50 und Abb. 51). Allerdings war ein schwaches γ H2AX-Signal in etwa 70% der Zellen zu beobachten, sodass sowohl stark γ H2AX-positive, aber vor allem schwach γ H2AX-positive Zellen zum basalen γ H2AX-Level der T1442-R248W-Kultur beitrugen. In Kulturen von T1371-R175H wiesen 1% der Zellen ein stärkeres γ H2AX-Signal auf, während das γ H2AX-Signal in etwa 80% der Zellen deutlich schwächer war. Somit trugen die stark γ H2AX-positiven Zellen, aber vor allem die schwach γ H2AXpositiven Zellen zum basalen γ H2AX-Level der T1371-R175H-Kultur bei. Im Vergleich dazu waren in T1495-R273H-Kulturen keine stark γ H2AX-positiven Zellen zu detektieren, während das basale γ H2AX-

Level jedoch im Vergleich zu T1442-R248W und T1371-R175H deutlich höher war. Im Fall von T1495-R273H müssen nahezu alle Zellen ein schwaches γ H2AX-Level aufgewiesen haben, das jedoch unter den gewählten Expositionszeiten an der Nachweisgrenze lag und somit nur sehr schwer zu detektieren war. Ähnlich wie im Fall der T1495-R273H-Kultur waren in Kulturen des Klons T1447 cl4-N239D weniger als 1% der Zellen stark γ H2AX-positiv. Das γ H2AX-Signal der Zellen lag unter den gewählten Bedingungen an der Nachweisgrenze, sodass schwach γ H2AX-positive Zellen kaum detektiert werden konnten. Da jedoch das basale γ H2AX-Level ähnlich hoch war wie in T1495-R273H-Kulturen, ließ sich vermuten, dass nahezu alle Zellen ein schwaches γ H2AX-Signal aufwiesen.

Insgesamt zeigte sich, dass stark γ H2AX-positive Zellen einen Tag nach dem Plattieren in allen SLGC-Linien selten sind (< 3%), auch wenn sich die basalen γ H2AX-Level deutlich unterschieden. Somit trugen vor allem die schwach γ H2AX-positiven Zellen zum basalen γ H2AX-Level bei.

Im Weiteren wurde analysiert, wie sich das γ H2AX-Level in der Frühphase nach der Behandlung ändert. Es zeigte sich, dass in den behandelten Kulturen der Anteil γ H2AX-positiver Zellen innerhalb von 24 deutlich anstieg. Aber auch die kontrollbehandelten Kulturen reagierten in dieser Zeit mit einer Zunahme des Anteils an γ H2AX-positiven Zellen, wobei die H2AX-Phosphorylierung in den Kontrollen deutlich unterhalb der in behandelten Kulturen blieb (Abb. 51). Hierbei stieg der Anteil γ H2AX-positiver Zellen in den Kontrollen für T1371-R175H von 1% auf 3%, für T1442-R248W von 3% auf 6%, für T1447 cl4-N239D von 1% auf 4% und für T1495-R273H von 0% auf 2% an und blieb somit für alle SLGC-Linien in den Kontrollen unter 6%.

Der Anstieg der Anzahl γ H2AX-positiver Zellen nach Behandlung mit 100 μ M TMZ und 5 Gy richtete sich nach der Art der Behandlung und variierte zwischen den SLGC-Linien (Abb. 51). Nach alleiniger Behandlung mit TMZ veränderte sich der Anteil γ H2AX-positiver Zellen innerhalb von 1 h kaum (T1371-R175H von 1% auf 3%, T1442-R248W von 3% auf 1%, T1447 cl4-N239D von 1% auf 2%, T1495-R273H von 0% auf 1%). In drei von vier Linien stieg der Anteil γ H2AX-positiver Zellen innerhalb von 24 h leicht an, blieb jedoch stets unter \leq 11%. So stieg der Anteil γ H2AX-positiver Zellen für T1371-R175H von 3% auf 6%, für T1447 cl4-N239D von 2% auf 11% und für T1495-R273H von 1% auf 7%. Dagegen betrug der Anteil γ H2AX-positiver Zellen in den T1442-R248W-Kulturen nach 24 h 40% im Gegensatz zu 1% nach einer Stunde.

Die alleinige Bestrahlung hatte einen deutlich stärkeren Effekt auf die Phosphorylierung des Histons H2AX als die alleinige TMZ-Behandlung (vergleiche TMZ nach 1 h mit RT nach 1 h in Abb. 51). Der Anteil γ H2AX-positiver Zellen veränderte sich innerhalb von 1 h nach der Bestrahlung mit 5 Gy im Fall von drei Linien nur leicht (T1371-R175H von 1% auf 2%, T1447 cl4-N239D von 1% auf 6%, T1495-R273H von 0% auf 2%). Nur in T1442-R248W-Kulturen kam es innerhalb von 1 h zu einem starken Anstieg γ H2AX-positiver Zellen auf 46%.

Im Fall von T1371-R175H war in Anwesenheit von TMZ der Anteil γ H2AX-positiver Zellen ähnlich (1 h: TMZ 3%; Doppelbehandlung 1%) dem nach der alleinigen Bestrahlung (2%). Nach zwei Stunden wurden für die alleinige Bestrahlung und die Doppelbehandlung 48% bzw. 57% γ H2AX-positive Zellen ermittelt. Danach nahm der Anteil an Zellen mit starker H2AX-Phosphorylierung kontinuierlich ab, wobei dies nach der Doppelbehandlung deutlich langsamer erfolgte als nach der alleinigen Bestrahlung. Sehr auffällig war, dass im Gegensatz zur alleinigen Bestrahlung nach der Doppelbehandlung nach 24 h wieder ein deutlicher Anstieg an γ H2AX-positiven Zellen auftrat. Dabei betrug dieser Anteil das 2,5-Fache des 24 h – Werts der TMZ-Einfachbehandlung.



Abb. 51: Veränderung des Anteils γ H2AX-positiver Zellen zu frühen Zeitpunkten nach Einfach- und Doppelbehandlung. Quantifizierung des Anteils stark positiver Zellen in immunzytologischen Präparaten zu frühen Zeitpunkten (1 h bis 24 h) nach Behandlung bzw. in den korrespondierenden Kontrollen (C). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Da insbesondere nach Doppelbehandlungen die Präparate reduzierte Zellzahlen aufwiesen und Areale mit wenigen und vielen Zellen vorkamen, wurde der systematische Fehler von 10% und nicht die Variation der Zellzahl angegeben. Aus den gleichen Gründen wurde keine statistische Analyse durchgeführt. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139.

In Kulturen der Linie T1442-R248W wurde der Anteil γ H2AX-positiver Zellen 1 h nach der Bestrahlung durch die zusätzliche Gabe von TMZ gesteigert (1 h: Bestrahlung 46%; Doppelbehandlung 55%). Während die Anzahl γ H2AX-positiver Zellen sich 2 h nach der alleinigen Bestrahlung drastisch um 80% reduzierte und über die nächsten sechs Stunden variierte, sank der Anteil an Zellen mit einer starken H2AX-Phosphorylierung nach der Doppelbehandlung deutlich langsamer auf etwa die Hälfte innerhalb von 8 h. Erneut zeigte sich nach 24 h vor allem nach der Doppelbehandlung ein deutlicher Anstieg des Anteils γ H2AX-positiver Zellen auf 46%, wobei der Anteil γ H2AX-positiver Zellen nach der alleinigen Behandlung mit TMZ 39% betrug.

Der Anteil γ H2AX-positiver Zellen in Kulturen von T1447 cl4-N239D war 1 h nach der Bestrahlung in An- und Abwesenheit von TMZ ähnlich (Bestrahlung: 6%, Doppelbehandlung: 5%) und stieg innerhalb der folgenden drei Stunden weiter an (Bestrahlung: 11%; Doppelbehandlung: 9%). Nach 8 h sank die Anzahl an γ H2AX-positiven Zellen transient auf 2%, bevor es 24 h nach der alleinigen Bestrahlung und der Doppelbehandlung zu einem erneuten Anstieg des Anteils γ H2AX-positiver Zellen auf 8% kam und sich somit gering von der Anzahl positiver Zellen nach der TMZ-Behandlung unterschied (11%).

Im Fall von Kulturen der vierten p53_{mut}-Linie T1495-R273H war die Anzahl an γH2AX-positiven Zellen nach alleiniger Bestrahlung und Doppelbehandlung ähnlich (Bestrahlung: 2%; Doppelbehandlung: 0,6%). Während der Anteil an Zellen mit einer starken H2AX-Phosphorylierung nach der alleinigen Bestrahlung innerhalb von 24 h lediglich gering variierte, nahm die Anzahl γH2AX-positiver Zellen nach zusätzlicher Gabe von TMZ nach 2 h zu und stieg auf 6%. Anschließend sank der Anteil γH2AX-positiver Zellen nach zwei weiteren Stunden transient, bevor bereits 8 h nach der Doppelbehandlung ein erneuter Anstieg positiver Zellen auf 13% zu beobachten war. 24 h nach der Doppelbehandlung war der Anteil γH2AX-positiver Zellen auf 26% gestiegen und war somit 13-mal höher als nach alleiniger Bestrahlung und 3,5-mal höher als nach der TMZ-Einfachbehandlung.

Insgesamt zeigte sich, dass alle SGCL-Linien die Phosphorylierung des Histons H2AX innerhalb von einer bis zwei Stunden nach Bestrahlung induzierten. Dabei erreichte der Anteil an γH2AX-positiven Zellen für T1442-R248W bereits nach 1 h das Maximum und sank dann deutlich ab. Die Zelllinien T1371-R175H und T1495-R273H induzierten die Phosphorylierung von H2AX verzögert, d.h. das Maximum wurde nach 2 h erreicht. Dabei war die Effizienz des Prozesses in T1371-R175H sehr hoch (48% γH2AXpositive Zellen) und bei T1495-R273H ineffizient (3% γH2AX-positive Zellen). Die Antwort erfolgte im Fall von T1447 cl4-N239D ebenfalls verzögert, allerdings in der Hinsicht, dass das Maximum erst nach 4 h feststellbar war, obwohl die Induktion der Phosphorylierung bereits innerhalb von 1 h erfolgte. Für T1371-R175H, T1495-R273H und T1442-R248W ergab sich durch die Koapplikation von 100 μ M TMZ eine deutliche Veränderung. Dabei war die Steigerung des Anteils γH2AX-positiver Zellen durch die Anwesenheit von TMZ zunächst gering oder abwesend. Nach 24 h, wenn die H2AX-Phosphorylierung in den einfachbestrahlten Kulturen bereits deutlich gesunken war, kam es in den doppelbehandelten Kulturen zu einem erneuten Anstieg des Anteils an γH2AX-positiven Zellen, der für T1495-R273H am deutlichsten ausfiel, gefolgt von T1442-R248W und T1371-R175H. Lediglich für T1447 cl4-N239D wurde die Phosphorylierung von H2AX in bestrahlten Kulturen durch die zusätzliche Gabe von TMZ nicht gesteigert.

Wie im Kapitel 4.2.2. beschrieben, zeigten die zwei p53_{mut}-Linien T1371-R175H und T1495-R273H eine progressive Zunahme der Phosphorylierung von H2AX über vier (T1371-R175H TMZ und Doppelbehandlung) bzw. fünf Tage (T1495-R273H alle Behandlungen; T1371-R175H Bestrahlung), während das γH2AX-Level im Fall der anderen beiden p53-Mutanten T1442-R248W und T1447 cl4-N239D nach 6 h (T1442-R248W Bestrahlung; T1447 cl4-N239D Doppelbehandlung (und TMZ)), am Tag d1 (T1442-R248W Doppelbehandlung; T1447 cl4-N239D Bestrahlung) bzw. am Tag d3 (T1442-R248W TMZ) das Maximum erreichte und bis zu Tag d5 stetig abnahm. Dabei war die Phosphorylierung von H2AX nur im Fall von T1371-R175H höher als nach den Einzelbehandlungen. Diese Beobachtungen könnten auf eine Zu- bzw. Abnahme der H2AX-Phosphorylierung einzelner Zellen beruhen oder auf eine Veränderung der Anzahl γH2AX-positiver Zellen. Um diese Frage zu klären, wurden Kulturen der vier p53_{mut}-Linien T1371-R175H, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D und T1495-R273H mit 5 Gy bestrahlt und/oder mit TMZ (EC₅₀) behandelt und mittels Immunzytochemie hinsichtlich der Anwesenheit von yH2AX auf Einzelzellniveau über fünf Tage untersucht. Es ist zu beachten, dass die Zellkulturen zunächst mit 5 Gy bestrahlt, am Folgetag in chamber slides plattiert sowie einen Tag später mit TMZ (EC₅₀) bzw. der Lösungsmittelkontrolle (1% DMSO (Dimethylsulfoxid)) behandelt wurden. Für die Quantifizierung des Anteils yH2AX-positiver Zellen wurden nur solche Zellen berücksichtigt, die ein starkes γH2AX-Signal aufwiesen. Eine statistische Auswertung wurde nicht durchgeführt, da vor allem nach der Doppelbehandlung die Zellzahl sehr gering war und die Zellzahl zwischen den Arealen zum Teil stark variierte.



Abb. 52: Veränderung des Anteils γ H2AX-positiver Zellen zu späteren Zeitpunkten nach Einfach- und Doppelbehandlung. Quantifizierung des Anteils stark positiver Zellen in immunzytologischen Präparaten an den Tagen d1 bis d5 nach Behandlung bzw. in den korrespondierenden Kontrollen (C). TMZ, Behandlung mit Temozolomid (EC₅₀); RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und Temozolomid (EC₅₀). Da insbesondere nach Doppelbehandlungen die Präparate reduzierte Zellzahlen aufwiesen und Areale mit wenigen und vielen Zellen vorkamen, wurde der systematische Fehler von 10% und nicht die Variation der Zellzahl angegeben. Aus den gleichen Gründen wurde keine statistische Analyse durchgeführt. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139.

Die immunzytologischen Analysen zeigten, dass der Anteil γ H2AX-positiver Zellen in den Kontrollkulturen am Tag d1 zwischen 1% (T1495-R273H) und 14% (T1442-R248W) variierte (Abb. 52). Dabei korrelierten die basalen γ H2AX-Level, die mittels Western blot-Analyse ermittelt wurde, nicht mit dem Anteil γ H2AX-positiver Zellen (vergleich T1442-R248W und T1447 cl4-N239D in Abb. 31 und Abb. 52).

Im Fall von T1371-R175H variierte der Anteil γH2AX-positiver Zellen über fünf Tage zwischen 5% und 14% (Abb. 52). So waren zu Beginn 12% der Zellen der kontrollbehandelten T1371-R175H-Kultur γ H2AX-positiv. Am Tag d3 und d5 nahm der Anteil γ H2AX-positiver Zellen auf 6% (d3) transient bzw. 5% (d5) ab, mit einem intermediären Anstieg des Anteils auf 14% am Tag d4. Die Behandlung mit 200 μM TMZ führte zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl γH2AX-positiver Zellen bereits am Tag d1 (44%), die bis zum Tag d2 weiter anstieg (52%). Während der Anteil γH2AX-positiver Zellen bis zum Tag d4 geringfügig sank (d4: 45%), waren am Tag d5 nach der TMZ-Behandlung 52% der Zellen γH2AXpositiv und somit 10-mal mehr als in der Kontrolle am Tag d5. (Der Wert für Tag d3 konnte aufgrund einer zu geringen Zellzahl nicht bestimmt werden.) Im Gegensatz dazu war ein Anstieg des Anteils γ H2AX-positiver Zellen nach der Bestrahlung mit 5 Gy erst am Tag d2 festzustellen (d2: 32%). Vom Tag d2 bis zum Tag d3 nahm die Anzahl yH2AX-positiver Zellen transient auf ein Fünftel ab (d3: 7%) und stieg bis zum Tag d4 um das 2-Fache an (d4: 16%). Am Tag d5 lag der Anteil γH2AX-positiver Zellen bei 19% und war somit 4-mal höher als in der Kontrolle. Durch die Doppelbehandlung stieg der Anteil γH2AX-positiver Zellen in den Kulturen innerhalb eines Tages auf 51% an und verblieb, mit Ausnahme der transienten Senkung am Tag d3 auf 37%, auf diesem hohen Niveau. Im Vergleich zur TMZ-Einfachbehandlung konnte die Doppelbehandlung den Effekt auf die Anzahl yH2AX-positiver Zellen nicht steigern. Die transiente Reduktion des Anteils γ H2AX-positiver Zellen am Tag d3 in allen Behandlungen könnte experimentell bedingt sein, da für die Tage d1 und d2 eine andere Zelldichte plattiert wurde als für Tag d3 bis d5. Während in den Western blot-Analysen beobachtet wurde, dass das γ H2AX-Level nach den Behandlungen über vier (TMZ und Doppelbehandlung) bzw. fünf Tage (Bestrahlung) zunahm, stieg der Anteil γ H2AX-positiver Zellen vor allem in Anwesenheit von TMZ zwar deutlich an, jedoch bereits am Tag d1 und veränderte sich über die Tage nur geringfügig (vergleiche Abb. 35, Abb. 39, Abb. 43 und Abb. 52).

In kontrollbehandelten T1442-R248W-Kulturen variierte der Anteil γH2AX-positiver Zellen zwischen 6% und 14% (Abb. 52 und Abb. 53). Dabei lag der Anteil γH2AX-positiver Zellen am Tag d1 bei 14%, der bis zum Tag d2 transient auf 6% sank und am Tag d3 wieder anstieg (d3: 11%). Über die nächsten zwei Tage variierte der Anteil nur gering (d4: 13%; d5: 9%). Die Behandlung mit 100 μM TMZ führte innerhalb von 24 Stunden zu einem geringen Anstieg des Anteils γH2AX-positiver Zellen (d1: 20%). Vom Tag d2 bis zum Tag d3 stieg die Anzahl γH2AX-positiver Zellen auf das Doppelte an (d2: 17%; d3: 33%), nahm bis zum Tag d4 weiter zu (d4: 48%) und verblieb bis zum Folgetag auf diesem hohen Niveau (d5: 46%). Somit war der Anteil γH2AX-positiver Zellen fünf Tage nach der TMZ-Behandlung um das 5-Fache höher als in der kontrollbehandelten Kultur. Im Vergleich dazu stieg der Anteil yH2AX-positiver Zellen nach der Bestrahlung mit 5 Gy zwar ebenfalls am Tag d1 geringfügig an (d1: 20%), nahm jedoch bis zum Tag d2 um die Hälfte ab (d2: 10%), blieb innerhalb des nächsten Tages nahezu unverändert und stieg von Tag d3 zu d4 auf 20% an. Bis zum Tag d5 nahm die Anzahl γH2AX-positiver Zellen weiter zu (d5: 28%) und war 3-mal höher als in der Kontrolle. Nach der Doppelbehandlung war die Anzahl γH2AXpositiver Zellen innerhalb des ersten Tages leicht reduziert (d1: 9%), stieg allerdings über vier Tage progressiv an (d2: 33%; d3: 44%; d4: 73%). Am Tag d5 nach der Doppelbehandlung waren 80% der Zellen yH2AX-positiv, 9-mal mehr als in der Kontrolle. Somit war der Effekt der Doppelbehandlung auf die Anzahl yH2AX-positiver Zellen deutlich höher als der der Einfachbehandlungen. Während in den Western blot-Analysen nach Bestrahlung und Doppelbehandlung nach Erreichen der maximalen γ H2AX-Level eine Senkung der H2AX-Phosphorylierung detektiert wurde, nahm der Anteil γ H2AXpositiver Zellen allerdings über vier (Bestrahlung) bzw. fünf Tage (Doppelbehandlung) zu, am stärksten nach der Doppelbehandlung (vergleiche Abb. 35, Abb. 43 und Abb. 52). Im Fall der TMZ-Einfachbehandlung waren die Ergebnisse der Western blot-Analyse und der Immunzytochemie ähnlicher. So wurde die maximale H2AX-Phosphorylierung erst am Tag d3 erreicht und veränderte sich über die nächsten zwei Tage kaum, während der Anteil γ H2AX-positiver Zellen ebenfalls nach drei Tagen deutlich anstieg, innerhalb des nächsten Tages erneut zunahm und anschließend nahezu konstant blieb (vergleiche Abb. 39 und Abb. 52).



Abb. 53: H2AX-Phosphorylierung in T1442 zu späteren Zeitpunkten nach Einfach- und Doppelbehandlung. Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α – γ H2AX (rot) von behandelten T1442-Kulturen bzw. korrespondierenden Kontrollen (DMSO) an den Tagen d1 bis d5 nach der Behandlung. TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Für die Quantifizierung wurden nur stark γ H2AX-positive (weiße Pfeile) und nicht schwach positive Zellkerne (grüne Pfeile) berücksichtigt. Die Expositionszeit wurde so gewählt, dass schwach γ H2AX-positive Zellkerne kaum zu detektieren waren. Messbalken, 50 μ m. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139; DMSO, Dimethylsulfoxid.

Die Kulturen des Klons T1447 cl4-N239D zeigten nach der Kontrollbehandlung, mit Ausnahme des transienten Anstiegs am Tag d4 auf 19%, kaum eine Veränderung des Anteils γH2AX-positiver Zellen über fünf Tage (d1/d2: 9%; d3/d5: 12%; Abb. 52). Nach der Behandlung mit 100 μ M TMZ nahm die Anzahl γH2AX-positiver Zellen innerhalb des ersten Tages geringfügig zu (d1: 13%), während der Anteil bis zum Tag d2 um das Doppelte zunahm (d2: 28%). Innerhalb der nächsten zwei Tage reduzierte sich der Anteil γH2AX-positiver Zellen zunehmend (d3: 17%; d4: 7%) und stieg bis zum Tag d5 erneut auf 13%. Somit enthielt die TMZ-behandelte Kultur am Tag d5 ähnlich viele γ H2AX-positive Zellen wie die kontrollbehandelte Kultur. Im Gegensatz dazu nahm der Anteil γH2AX-positiver Zellen erst am Tag d2 nach Bestrahlung mit 5 Gy zu (d2: 15%) und variierte über die nächsten zwei Tage um ± 4% (d3: 11%; d4: 17%). Vom Tag d4 bis zum Tag d5 stieg die Anzahl γH2AX-positiver Zellen auf 25%, das Doppelte des Anteils yH2AX-positiver Zellen in der Kontrollkultur. In den doppelbehandelten Kulturen stieg der Anteil γH2AX-positiver Zellen, analog zur TMZ-Einfachbehandlung, innerhalb des ersten Tages an (d1: 14%) und nahm bis zum Tag d2 weiter zu (d2: 25%). Allerdings blieb der Anteil γH2AX-positiver Zellen bis zum Tag d4 auf diesem Plateau. Ein Wert für den Tag d5 konnte aufgrund einer zu geringen Zellzahl nicht ermittelt werden. In den Western blot-Analysen der Extrakte TMZ-behandelter Kulturen waren nach 6 h und am Tag d2 Peaks der Phosphorylierung von H2AX zu beobachten, gefolgt von einer Reduktion des γ H2AX-Levels. Das korrelierte mit der maximalen Anzahl γ H2AX-positiver Zellen zwei Tage nach der TMZ-Behandlung und der anschließenden Abnahme des Anteils γ H2AX-positiver Zellen (vergleiche Abb. 39 und Abb. 52). Nach der Bestrahlung und der Doppelbehandlung war das maximale γ H2AX-Level nach 6 h (Doppelbehandlung) bzw. am Tag d1 (Bestrahlung) erreicht und wies anschließend eine Reduktion des γ H2AX-Levels auf. Hingegen nahm der Anteil γ H2AX-positiver Zellen im Fall der alleinigen Bestrahlung bis zum Tag d5 zu und im Fall der Doppelbehandlung stieg dieser besonders stark von Tag d1 zu d2 an und blieb anschließend nahezu konstant (vergleiche Abb. 35, Abb. 43 und Abb. 52).

Im Fall von T1495-R273H waren in der kontrollbehandelten Kultur am Tag d1 und d2 nahezu keine stark γH2AX-positiven Zellen zu detektieren (Abb. 52). Allerdings nahm von Tag d2 zu d3 der Anteil deutlich zu (d3: 9%) und stieg bis zum Tag d5 sogar weiter an (d5: 15%). Nach der Behandlung mit 100 μM TMZ waren innerhalb eines Tages fast ein Viertel der Zellen γH2AX-positiv (d1: 23%). Der Anteil γH2AX-positiver Zellen reduzierte sich bis zum Tag d2 um die Hälfte (d2: 11%), stieg allerdings bis zum Tag d5 erneut an (d3: 15%; d4: 16%; d5: 24%) und war im Vergleich zur Kontrolle geringfügig erhöht. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl yH2AX-positiver Zellen in mit 5 Gy bestrahlten-Kulturen innerhalb von 24 Stunden weniger stark an (d1: 13%) und variierte über die nächsten vier Tage kaum. Nach der Doppelbehandlung waren etwa ein Fünftel der Zellen innerhalb eines Tages stark γH2AX-positiv (d1: 18%). Der Anteil γH2AX-positiver Zellen blieb am Folgetag unverändert und nahm dann vom Tag d2 bis zum Tag d3 deutlich zu (d2: 19%; d3: 46%). Bis zum Tag d4 sank die Anzahl γH2AX-positiver Zellen geringfügig (d4: 37%) und blieb innerhalb des folgenden Tages nahezu unverändert (d5: 38%). Somit war der Anteil γH2AX-positiver Zellen fünf Tage nach der Doppelbehandlung 2,5-mal höher als in der Kontrolle und war im Vergleich zu den Einfachbehandlungen um 60% (relativ zur TMZ-Behandlung) bzw. 2-fach (relativ zur Bestrahlung) erhöht. Obwohl die Western blot-Analysen einen progressiven Anstieg des yH2AX-Levels nach Bestrahlung und nach Doppelbehandlung zeigten, war in den immunzytologischen Analysen im gleichen Zeitraum keine linear zunehmende Anzahl YH2AX-positiver Zellen zu verzeichnen (vergleiche Abb. 35, Abb. 43 und Abb. 52). In der Doppelbehandlung konnte am Tag d3 nur ein sprunghafter Anstieg des Anteils γH2AX-positiver Zellen festgestellt werden. Nach der Behandlung mit 100 μM TMZ wurde das γH2AX-Level erst ab dem Tag d4 deutlich gesteigert und nahm bis zum Tag d5 weiter zu. Allerdings nahm die Anzahl yH2AX-positiver Zellen in den TMZ-behandelten Kulturen nur vom Tag d4 bis zum Tag d5 stärker zu (vergleiche Abb. 39 und Abb. 52).

Insgesamt zeigte sich, dass der Anteil γ H2AX-positiver Zellen in allen p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D und T1495-R273H) durch jede Behandlung gesteigert werden konnte. Dabei nahm die Anzahl phosphorylierter Zellen in allen Linien innerhalb eines Tages nach der TMZ-Behandlung gering (T1442-R248W, T1447 cl4-N239) bzw. stark (T1371-R175H, T1495-R273H) zu, während nach der Bestrahlung die Anzahl γ H2AX-positiver Zellen nur im Fall von T1442-R248W und T1495-R273H innerhalb von 24 Stunden anstieg und im Fall von T1371-R175H und T1447 cl4-N239D erst verzögert am Tag d2. Nach der Doppelbehandlung waren in den Kulturen von T1442-R248W und T1495-R273H mehr Zellen γ H2AX-positiv als nach den Einfachbehandlungen, während für die Doppelbehandlung im Fall der Linien T1371-R175H und T1447 cl4-N239D hinsichtlich der maximalen Anzahl γ H2AX-positiver Zellen kein Unterschied zwischen den drei Behandlungen (T1447 cl4-N239D) bzw. zwischen der TMZ-Einfachbehandlung und der Doppelbehandlung (T1371-R175H) festzustellen war. Die höchste Anzahl γ H2AX-positiver Zellen war in Kulturen der T1442-R248W-Linie (maximal 80% am Tag d5 nach Doppelbehandlung) zu beobachten, gefolgt von T1371-R175H (maximal 53% d2 Doppelbehandlung). T1495-R273H (maximal 38% d5 Doppelbehandlung) und T1447 cl4-N239D (maximal 28% d2 TMZ). Im Fall der Linien T1442-R248W, T1447 cl4-N239D und T1495-R273H, nicht

aber für T1371-R175H, konnten Ähnlichkeiten bzw. Korrelationen zwischen dem ermittelten γ H2AX-Level in den Western blot-Analysen und dem Anteil γ H2AX-positiver Zellen festgestellt werden, jedoch nur nach der TMZ-Einfachbehandlung.

Wie unter 4.1. beschrieben, habe ich Evidenzen dafür gewonnen, dass die SLGC-Linien eine zelluläre und molekulare Heterogenität aufweisen. Beides, das Differenzierungsstadium einer Zelle und deren genetische und epigenetische Eigenschaften, kann die Responsivität gegenüber der Behandlung mit 5 Gy und TMZ bestimmen. Daher wurden im Folgenden Klone in die Analyse einbezogen, die sich von den SLGC-Linien ableiten. Ich untersuchte dabei nicht alle im Labor vorhandenen Klone, sondern eine Auswahl. Im Fall von T1447-N239D war bereits ein Klon (T1447 cl4-N239D) statt der Mutterkultur in die Analyse eingegangen.

4.2.4. Untersuchung der γH2AX-Induktion auf Einzelzellniveau in SLGC-Klonen

Die Untersuchung der γ H2AX-Induktion auf Einzelzellniveau erfolgte analog zum Kapitel 4.2.3.. Allerdings wurden für diese Analysen neben den stark γ H2AX-positiven Zellen auch solche mit einer moderaten γ H2AX-Expression einbezogen. Es wurden wiederum die p53-Mutanten T1371-R175H, T1442-R248W und T1447-N239D untersucht. In Hinblick auf T1447-N239D wurde der bereits untersuchte Klon T1447 cl4-N239D mit den T1447-Klonen cl1 und cl3 verglichen. Weiterhin wurden Klone der SLGC-Linie T1522 untersucht, die alle ein p53-Wildtypgen tragen.

Im Fall der $p53_{mut}$ -Linie T1371-R175H wurde die Induktion der H2AX-Phosphorylierung an Kulturen der Klone T1371 cl2, cl3, cl15 und cl16 analysiert. Während in den Kontrollen der Klone T1371 cl2, cl3 und cl16 nach 1 h der Anteil γ H2AX-positiver Zellen bei 10% (T1371 cl2) bzw. 20% (T1371 cl3 und cl16) lag, war die Anzahl positiver Zellen in Klon T1371 cl15 initial bereits deutlich erhöht (70%) (Abb. 54, Abb. 55 und Anhang Abb. 82). Im Gegensatz zum Klon T1371 cl2, in dem sich der Anteil γ H2AX-positiver Zellen innerhalb von 24 h kaum veränderte (Anhang Abb. 82), nahm die Phosphorylierung von H2AX im Fall des Klons T1371 cl3 von 4 h bis 24 h stetig zu (nach 8 h auf 50%; nach 24 h auf 75%), im Fall von T1371 cl16 nur transient nach 8 h (auf 70%) (Abb. 54). In der Kontrolle des Klons T1371 cl15 sank der Anteil γ H2AX-positiver Zellen nach 2 h transient, stieg jedoch nach 8 h erneut an und erreicht nach 24 h 80%.

Die alleinige Behandlung mit TMZ führte in allen untersuchten Klonkulturen der T1371-Linie zu einem Anstieg des Anteils γ H2AX-positiver Zellen, wobei der Anteil in Kulturen der Klone T1371 cl2, cl3 und cl15 nach 24 h auf 90% (T1371 cl2; Anhang Abb. 82) bzw. 100% (T1371 cl2 und cl15) zunahm, während die Anzahl γ H2AX-positiver Zellen für TMZ-behandelte Kulturen des Klons T1371 cl16 bei 50% lag. Die maximale Anzahl an Zellen mit einer H2AX-Phosphorylierung wurde im Fall von T1371 cl2 und cl15 nach 24 h erreicht, im Fall von T1371 cl3 bereits nach 8 h und im Fall des Klons T1371 cl16 nahm der Anteil γ H2AX-positiver Zellen von 4 h bis 24 h nicht weiter zu (Abb. 54).



Abb. 54: H2AX-Phosphorylierung in T1371 cl16 nach Einfach- und Doppelbehandlung. Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α - γ H2AX (rot) und α Nestin (grün) von behandelten Kulturen bzw. korrespondierenden Kontrollen (DMSO). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Für die Quantifizierung wurden stark und moderat γ H2AX-positive Zellkerne (weiße Pfeile) und nicht schwach positive bzw. negative Zellkerne (hellblaue Pfeile) berücksichtigt. Messbalken, 50 μ m. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139; DMSO, Dimethylsulfoxid.

Der Anteil γH2AX-positiver Zellen stieg innerhalb von 1 h nach der Bestrahlung in An- und Abwesenheit von TMZ in Kulturen der Klone T1371 cl2, cl3 und cl16 auf 100% (Abb. 55). Während in den Fällen der Klone T1371 cl2 und cl3 die Anzahl γH2AX-positiver Zellen innerhalb von 8 h nach alleiniger Bestrahlung auf 70% sank, variierte die Anzahl positiver Zellen nach der Doppelbehandlung innerhalb der ersten 8 h um maximal 10%. Der Anteil γH2AX-positiver Zellen nach 24 h wurde im Fall des Klons T1371 cl2 durch die zusätzliche Gabe von TMZ von 85% auf nahezu 100% gesteigert (Anhang Abb. 82), blieb jedoch im Fall von T1371 cl3 ähnlich. In Kulturen des Klons T1371 cl16 kam es nach alleiniger Bestrahlung zu einer starken, transienten Reduktion des Anteils yH2AX-positiver Zellen nach 4 h auf 40%, gefolgt von einem erneuten Anstieg nach 8 h auf 90% und einer erneuten Senkung der H2AX-Phosphorylierung innerhalb der nächsten 16 Stunden auf 60% (Abb. 54). Im Gegensatz dazu fiel der Anteil yH2AX-positiver Zellen nach der Doppelbehandlung innerhalb von 8 h nur gering (auf 80%) und stieg innerhalb der folgenden 16 Stunden auf 90%. Nur im Fall des Klons T1371 cl15 wurde die maximale Anzahl yH2AX-positiver Zellen nach alleiniger Bestrahlung innerhalb von 1 h, nach der Doppelbehandlung jedoch erst nach 2 h erreicht. Die Anwesenheit von TMZ in bestrahlten Kulturen des Klons T1371 cl15 erhöhte den Anteil γH2AX-positiver Zellen nur gering, wobei allerdings zu allen Zeitpunkten nahezu die gesamte Zellpopulation phosphoryliert war (Ausnahme: 4 h nach den Behandlungen).



Abb. 55: Veränderung des Anteils γ H2AX-positiver Zellen zu frühen Zeitpunkten in T1371-Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung. Quantifizierung des Anteils stark positiver Zellen in immunzytologischen Präparaten zu frühen Zeitpunkten (1 h bis 24 h) nach Behandlung bzw. in den korrespondierenden Kontrollen (C). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Da insbesondere nach Doppelbehandlungen die Präparate reduzierte Zellzahlen aufweisen und Areale mit wenigen und vielen Zellen vorkommen, wurde der systematische Fehler von 10% und nicht die Variation der Zellzahl angegeben. Aus den gleichen Gründen wurde keine statistische Analyse durchgeführt. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139.

Insgesamt zeigte sich, dass die Phosphorylierung des Histons H2AX selbst zwischen den Kontrollen der T1371-Klonkulturen variierte. Insbesondere der Klon T1371 cl15 wies initial einen hohen Anteil γ H2AX-positiver Zellen auf (70%), der nach den Behandlungen weiter zunahm. Nach der TMZ-Behandlung wurde die maximale Anzahl γ H2AX-positiver Zellen im Fall von T1371 cl16 innerhalb von 4 h, im Fall von T1371 cl3 innerhalb von 8 h und in den Klonkulturen von T1371 cl2 und cl15 erst nach 24 h erreicht, während die Bestrahlung in An- oder Abwesenheit von TMZ innerhalb von 1 h (spätestens nach 2 h im Fall des Klons T1371 cl15 nach Doppelbehandlung) zu einem Maximum führte. Im Gegensatz zum Anteil γ H2AX-positiver Zellen nach der Doppelbehandlung, der in den Klonkulturen durchaus vergleichbar war, zeigten sich klonspezifische Unterschiede in der Reduktion des Signals nach alleiniger Bestrahlung und viel deutlichere Variationen in der Effizienz der Phosphorylierung nach der Einfachbehandlung mit TMZ.



Abb. 56: H2AX-Phosphorylierung in T1442 cl13 nach Einfach- und Doppelbehandlung. Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α – γ H2AX (rot) und α Nestin (grün) von behandelten Kulturen bzw. korrespondierenden Kontrollen (DMSO). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Für die Quantifizierung wurden stark und moderat γ H2AX-positive Zellkerne (weiße Pfeile) und nicht schwach positive bzw. negative Zellkerne (hellblaue Pfeile) berücksichtigt. Messbalken, 50 μ m. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139; DMSO, Dimethylsulfoxid.

In den Klonkulturen T1442 cl13, cl14, cl15 und cl16 der zweiten p53-GOF (T1442-R248W) wiesen initial 30% (T1442 cl13 (Abb. 56) und cl15) bzw. 50% (T1442 cl14 und cl16 (Anhang Abb. 83)) der Zellen eine Phosphorylierung von H2AX auf (Abb. 57). Während sich der Anteil γ H2AX-positiver Zellen im Fall des Klons T1442 cl16 innerhalb von 24 h nicht veränderte, variierte die Anzahl γ H2AX-positiver Zellen in den Klonen T1442 cl13, cl14 und cl15. Dabei nahm der Anteil an γ H2AX-positiven Zellen in Klon T1442 cl13 von initial 30% auf 60% nach 8 h zu, in Kulturen von T1442 cl14 von 50% transient auf 80% nach 4 h und im Fall des Klons T1442 cl15 ebenfalls transient von 30% auf 60% nach 2 h.

Die Behandlung mit TMZ führte zu einem Anstieg γ H2AX-positiver Zellen in allen Kulturen der T1442-Klone (Abb. 57), wobei die maximale Anzahl γ H2AX-positiver Zellen innerhalb von 2 h in den Klonen T1442 cl13 (Abb. 56) und cl14 erreicht wurde, im Fall des Klons T1442 cl15 innerhalb von 4 h und im Fall von T1442 cl16 erst nach 24 h (Anhang Abb. 83). Die maximale Anzahl an Zellen mit einer Phosphorylierung von H2AX unterschied sich dabei eher gering und lag zwischen 80% (T1442 cl15) und 95% (T1442 cl16).

Nach der alleinigen Bestrahlung stieg der Anteil γ H2AX-positiver Zellen in den Klonen T1442 cl13, cl14 und cl16 innerhalb von 1 h auf 100%, während im Fall des Klons T1442 cl15 der Anteil bei 90% lag und erst nach 2 h eine H2AX-Phosphorylierung in der gesamten Zellpopulation festzustellen war (Abb. 57). In bestrahlten Kulturen der Klone T1442 cl13, cl14 und cl16 sank die Anzahl γ H2AX-positiver Zellen nach 24 h auf 70% (T1442 cl14) bzw. 80% (T1442 cl13 (Abb. 56) und cl16 (Anhang Abb. 83)). Im Gegensatz dazu blieb die Phosphorylierung in den Zellen des Klons T1442 cl15 nach Erreichen des Maximums erhalten. Die zusätzliche Anwesenheit von TMZ in bestrahlten Kulturen der T1442-Klone führte dazu, dass die Phosphorylierung von H2AX in den Klonen T1442 cl14, cl15 und cl16 über den gesamten Messzeitraum von 24 h in nahezu der gesamten Zellpopulation erhalten blieb, während sich der Anteil γH2AX-positiver Zellen im Fall des Klons T1442 cl13 nach 24 h auf 80% reduzierte (Abb. 56).



Abb. 57: Veränderung des Anteils γ H2AX-positiver Zellen zu frühen Zeitpunkten in T1442-Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung. Quantifizierung des Anteils stark positiver Zellen in immunzytologischen Präparaten zu frühen Zeitpunkten (1 h bis 24 h) nach Behandlung bzw. in den korrespondierenden Kontrollen (C). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Da insbesondere nach Doppelbehandlungen die Präparate reduzierte Zellzahlen aufweisen und Areale mit wenigen und vielen Zellen vorkommen, wurde der systematische Fehler von 10% und nicht die Variation der Zellzahl angegeben. Aus den gleichen Gründen wurde keine statistische Analyse durchgeführt. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139.

Insgesamt zeigten bereits initial zwischen 30% (T1442 cl13 und cl15) bzw. 50% (T1442 cl14 und cl16) der Zellen der T1442-Klonkulturen eine Phosphorylierung des Histons H2AX, die durch jede Art der Behandlung gesteigert wurde. Dabei führte die Einfachbehandlung mit TMZ zu einer deutlichen Zunahme des Anteils an Zellen mit einer H2AX-Phosphorylierung auf 80% (T1442 cl15) bis 95% (T1442 cl16), wobei dieser innerhalb von 2 h (T1442 cl13 und cl14) bis 24 h (T1442 cl16) ein Maximum erreichte. Im Gegensatz dazu war nach Bestrahlung in An- und Abwesenheit von TMZ die gesamte Kultur innerhalb von 1 h (T1442 cl13, cl14, cl16) bzw. maximal 2 h (T1442 cl15 nach alleiniger Bestrahlung) im Histon H2AX phosphoryliert. Die Koapplikation von TMZ zur Bestrahlung führte in T1442 cl14 und cl16 dazu, dass die Reduktion des Anteils γ H2AX-positiver Zellen, die nach alleiniger Bestrahlung beobachtete wurde, ausblieb. Nur im Fall des Klons T1442 cl13 sank der Anteil γ H2AX-positiver Zellen nach 24 h auf 80%.



Abb. 58: H2AX-Phosphorylierung in T1447 cl3 nach Einfach- und Doppelbehandlung. Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α – γ H2AX (rot) und α Nestin (grün) von behandelten Kulturen bzw. korrespondierenden Kontrollen (DMSO). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Für die Quantifizierung wurden stark und moderat γ H2AX-positive Zellkerne (weiße Pfeile) und nicht schwach positive bzw. negative Zellkerne (hellblaue Pfeile) berücksichtigt. Messbalken, 50 μ m. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139; DMSO, Dimethylsulfoxid.

In den Kontrollkulturen der T1447-Klone, deren Mutterkultur eine p53-*missense* Mutation aufweist, wies nur ein sehr geringer Anteil an Zellen eine Phosphorylierung des Histons H2AX auf (2% im Fall des Klons T1447 cl3 (Abb. 58); 10% im Fall der Klone T1447 cl1 (Anhang Abb. 84) und cl4), der sich über einen Zeitraum von 24 h nicht deutlich veränderte (Abb. 59).

Im Gegensatz zu den Klonen T1447 cl3 und cl4, in denen der Anteil γ H2AX-positiver Zellen erst 24 h nach der TMZ-Behandlung zunahm (auf 30% in Kulturen von T1447 cl4; auf 40% in T1442 cl3 (Abb. 58, Abb. 59 und Anhang Abb. 84), stieg die Anzahl γ H2AX-positiver Zellen in TMZ-behandelten Kulturen des Klons T1442 cl1 bereits nach 2 h drastisch an (auf 50%), zeigte eine transiente Senkung des Anteils phosphorylierter Zellen auf 20% und stieg nach 24 h erneut drastisch auf 80% an.

Durch die alleinige Bestrahlung kam es in 90% der Zellen der Klone T1447 cl1 und cl4 innerhalb von 1 h zu einer Phosphorylierung von H2AX, während im Fall des Klons T1447 cl3 in dieser Zeit nur 60% der Zellen γ H2AX-positiv waren (Abb. 58, Abb. 59 und Anhang Abb. 84). Während sich der Anteil γ H2AXpositiver Zellen in Klon T1447 cl1 über die nächsten 23 Stunden reduzierte, nahm die Anzahl positiver Zellen in Klon T1447 cl3 innerhalb der folgenden Stunde weiter zu (auf 80%). Im Fall des Klons T1447 cl4 waren 4 h nach der Bestrahlung alle Zellen der Kultur im Histon H2AX phosphoryliert. Nachdem das Maximum erreicht wurde, fiel der Anteil γ H2AX-positiver Zellen innerhalb der nächsten Stunden. Eine zusätzliche Applikation von TMZ führte im Fall des Klons T1447 cl3 zu einer verzögerten Reduktion des Anteils γ H2AX-positiver Zellen (Abb. 58), während in den Klonen T1447 cl1 und cl3 nicht nur die Reduktion verzögert war, sondern auch die Anzahl γ H2AX-positiver Zellen nach 24 h erneut auf 80% (T1447 cl1) bzw. 90% (T1447 cl4) anstieg.



Abb. 59: Veränderung des Anteils γ H2AX-positiver Zellen zu frühen Zeitpunkten in T1447-Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung. Quantifizierung des Anteils stark positiver Zellen in immunzytologischen Präparaten zu frühen Zeitpunkten (1 h bis 24 h) nach Behandlung bzw. in den korrespondierenden Kontrollen (C). TMZ, Behandlung mit 100 µM Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 µM Temozolomid. Da insbesondere nach Doppelbehandlungen die Präparate reduzierte Zellzahlen aufweisen und Areale mit wenigen und vielen Zellen vorkommen, wurde der systematische Fehler von 10% und nicht die Variation der Zellzahl angegeben. Aus den gleichen Gründen wurde keine statistische Analyse durchgeführt. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139.

Insgesamt waren in den T1447-Klonkulturen initial nur wenige Zellen im Histon H2AX phosphoryliert, wobei sich die Anzahl γH2AX-positiver Zellen durch jede Behandlung deutlich steigern ließ. Die TMZbehandelten Kulturen wiesen, mit Ausnahme von T1447 cl1, erst nach 24 h eine deutliche Zunahme des Anteils γH2AX-positiver Zellen auf. Im Fall des Klons T1447 cl1 stieg die Phosphorylierung bereits nach 2 h transient an. Im Vergleich dazu wurde der Anteil an Zellen mit einer H2AX-Phosphorylierung durch die Bestrahlung, in An- oder Abwesenheit von TMZ, bereits innerhalb von 1 h drastisch erhöht, jedoch das Maximum in den Klonen zeitversetzt erreicht (1 h T1447 cl1; 2 h T1447 cl3, 4 h T1447 cl4). Während die Anzahl im Histon H2AX phosphorylierter Zellen nach alleiniger Bestrahlung nach Erreichen des Maximums sank, wurde die Reduktion durch die Anwesenheit von TMZ verzögert und führte in den Klonen T1447 cl1 und cl4 zu einem erneuten Anstieg nach 24 h.



Abb. 60: H2AX-Phosphorylierung in T1522 cl10 nach Einfach- und Doppelbehandlung. Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α – γ H2AX (rot) und α Nestin (grün) von behandelten Kulturen bzw. korrespondierenden Kontrollen (DMSO). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Für die Quantifizierung wurden stark und moderat γ H2AX-positive Zellkerne (weiße Pfeile) und nicht schwach positive bzw. negative Zellkerne (hellblaue Pfeile) berücksichtigt. Messbalken, 50 μ m. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139; DMSO, Dimethylsulfoxid.

Im Fall der Klonkulturen der p53_{WT}-Linie T1522 waren initial 10% (T1522 cl1; Anhang Abb. 85) bzw. 20% (T1522 cl4, cl7, cl10 (Abb. 60)) der Zellen bereits im Histon H2AX phosphoryliert (Abb. 61). Während der Anteil γ H2AX-positiver Zellen in den Kontrollkulturen auf 40% (T1522 cl1 und cl7) bzw. 80% (T1522 cl10) nach 8 h (T1522 cl1) bzw. 24 h (T1522 cl7 und cl10) zunahm, kam es im Fall des Klons T1522 cl4 nach 8 h zu einem transienten Anstieg des Anteils γ H2AX-positiver Zellen auf 50%.

Die TMZ-Einfachbehandlung führte zu einem Anstieg des Anteils γ H2AX-positiver Zellen in allen T1522-Klonen, wobei im Fall des Klons T1522 cl1 die Anzahl γ H2AX-positiver Zellen bereits innerhalb von 4 h stark anstieg (von 10% auf 50%) und innerhalb der nächsten 20 Stunden weiter zunahm (auf 90%; Anhang Abb. 85). Während in den Klonen T1522 cl7 und cl10 (Abb. 60) die Anzahl γ H2AX-positiver Zellen erst nach 24 h deutlich zunahm und die maximale Anzahl phosphorylierter Zellen erreichte (von 20% auf 70%), wurde in Kulturen des Klons T1522 cl4 bereits nach 8 h ein Maximum von 80% beobachtet (Abb. 61).

Innerhalb von 1 h nach der Bestrahlung, ob in An- oder Abwesenheit von TMZ, war jede Klonkultur zur 100% γ H2AX-positiv (Abb. 61). Anschließend reduzierte sich der Anteil γ H2AX-positiver Zellen in den Klonen nach alleiniger Bestrahlung, wobei die Anzahl positiver Zellen nur in T1522 cl1 zunehmend sank (Abb. 61 und Anhang Abb. 85). Im Fall der Klone T1522 cl4 und cl10 (Abb. 60) nahm der Anteil γ H2AX-positiver Zellen 24 h nach der alleinigen Bestrahlung wieder zu; im Fall des Klons T1522 cl7 sank die Anzahl H2AX-phosphorylierter Zellen nach 4 h transient und nach 24 h erneut. Durch die Zugabe von

TMZ zu den bestrahlten Kulturen wurde die Reduktion des Anteils γ H2AX-positiver Zellen in den Klonen T1522 cl4, cl7 und cl10 (Abb. 60) verzögert und im Fall des Klons T1522 cl1 sogar verhindert (Anhang Abb. 85), sodass 24 h nach der Doppelbehandlung mehr Zellen γ H2AX-positiv waren als nach der alleinigen Bestrahlung (Abb. 61).



Abb. 61: Veränderung des Anteils γ H2AX-positiver Zellen zu frühen Zeitpunkten in T1522-Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung. Quantifizierung des Anteils stark positiver Zellen in immunzytologischen Präparaten zu frühen Zeitpunkten (1 h bis 24 h) nach Behandlung bzw. in den korrespondierenden Kontrollen (C). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Da insbesondere nach Doppelbehandlungen die Präparate reduzierte Zellzahlen aufweisen und Areale mit wenigen und vielen Zellen vorkommen, wurde der systematische Fehler von 10% und nicht die Variation der Zellzahl angegeben. Aus den gleichen Gründen wurde keine statistische Analyse durchgeführt. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139.

Insgesamt wiesen ein Zehntel (T1522 cl1) bis ein Fünftel (T1522 cl4, cl7 und cl10) der Zellen der T1522-Klonkulturen bereits eine basale Phosphorylierung des Histons H2AX auf, die durch die Behandlungen effizient gesteigert wurde. Dabei nahm der Anteil γH2AX-positiver Zellen nach der Einfachbehandlung mit TMZ erst nach 8 h (T1522 cl1 und cl4) bzw. 24 h (T1522 cl7 und cl10) drastisch zu, wohingegen es in allen Klonen nach der alleinigen Bestrahlung sowie der Doppelbehandlung innerhalb von 1 h zu einer Phosphorylierung der gesamten Kultur kam. Die Koapplikation von TMZ führte in allen Klonen zu einer verzögerten Senkung der H2AX-Phosphorylierung.

Zelllinie	Klon	Veränderung	RT	RT+TMZ	TMZ
T1371-R175H	cl2	Max.	1 h	1 h	24 h
		pos.	100%	100%	90%
		Red.	Ы	~	-
	cl3	Max.	1 h	1 h	8 h
		pos.	100%	100%	100%
		Red.	Ы	И	\rightarrow
	cl15	Max.	1 h	2 h	24 h
		pos.	100%	100%	100%
		Red.	$\nabla \Delta$	Z Z	-
	cl16	Max.	1 h	1 h	4 h
		pos.	100%	100%	50%
		Red.	\checkmark 7	Z Z	\rightarrow
T1442-R248W	cl13	Max.	1 h	1 h	2 h
		pos.	100%	95%	90%
		Red.	R	И	~
	cl14	Max.	1 h	1 h	2 h
		pos.	100%	100%	90%
		Red.	Ъ	\rightarrow	\rightarrow
	cl15	Max.	2 h	1 h	4 h
		pos.	100%	100%	80%
		Red.	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow
	cl16	Max.	1 h	1 h/2 h	24 h
		pos.	100%	95/100%	95%
		Red.	R	\rightarrow	-
T1447-N239D	cl1	Max.	1 h	1 h	24 h
		pos.	90%	100%	80%
		Red.	\checkmark	\checkmark	-
	cl3	Max.	2 h	2 h	24 h
		pos.	80%	80%	40%
		Red.	\checkmark	\checkmark	-
	cl4	Max.	4 h	4 h	24 h
		pos.	100%	90%	30%
		Red.	\checkmark	Z Z	-
T1522	cl1	Max.	1 h	1 h	24 h
		pos.	100%	100%	90%
		Red.	\checkmark	\rightarrow	-
	cl4	Max.	1 h	1 h	8 h
		pos.	100%	100%	80%
		Red.	\checkmark 7	И	\rightarrow
	cl7	Max.	1 h	1 h	24 h
		pos.	100%	100%	70%
		Red.	\checkmark 7	\checkmark	-
	cl10	Max.	1 h	1 h	24 h
		pos.	100%	100%	70%
		Red.	\checkmark	\checkmark 7	-

Tab. 16: Vergleich des Anteils γ H2AX-positiver Zellen in Klonen nach Bestrahlung mit 5 Gy, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid oder Doppelbehandlung

 γ H2AX, Phosphorylierung am Serylrest S139 des Histons H2AX; Max., Zeit bis zum Erreichen des Maximums; pos., Anteil positiver Zellen; Red., Reduktion nach Erreichen des Maximums; h, Stunde; \rightarrow , unverändert; \sim , maximal um 10% verändert; \searrow , maximal um 30%; \downarrow , mehr als 30%; \neg , erneuter Anstieg; -, nicht vorhanden; R175H, Arginin 175 durch Histidin ersetzt; R273H, Arginin 273 durch Histidin ersetzt; R248W, Arginin 248 durch Tryptophan ersetzt; N239D, Asparagin 239 durch Aspartat ersetzt.

Fazit – yH2AX in Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung

Es zeigte sich in allen Klonen, unabhängig vom p53-Status der Mutterkultur und der basalen Phosphorylierung des Histons H2AX, eine drastische Erhöhung der H2AX-Phosphorylierung innerhalb von einer Stunde nach der Bestrahlung, in Ab- und Abwesenheit von TMZ, wobei in allen T1371-, T1442-, T1522-Klonen 95% bis 100% der Zellen innerhalb von 1 h bis maximal 2 h eine Phosphorylierung von H2AX aufwiesen. Nur in den Klonkulturen der T1447-Linie war im Fall der Klone T1447 cl1 und cl3 nicht die gesamte Zellpopulation im H2AX phosphoryliert (T1447 cl1: 90% nach 1 h; T1447 cl3: 80% nach 2 h) und im Fall des Klons T1447 cl4 wurde die maximale Phosphorylierung erst nach 4 h erreicht. Die Koapplikation von TMZ führte in allen T1371-, T1447- und T1522-Klonen zu einer verzögerten Reduktion der Phosphorylierung von H2AX, wohingegen diese Verzögerung im Fall der T1442-Linie nur in den Klonen T1442 cl14 und cl16 beobachtet wurde. Zudem wurde durch die Doppelbehandlung der Anteil phosphorylierter Zellen in den Klonen T1447 cl1 und cl4 sowie T1522 cl7 und cl10 nach 24 h erneut erhöht. Während nach der Bestrahlung, mit oder ohne TMZ, zwischen 80% und 100% der Zellen yH2AX-positiv waren, variierte die maximale Phosphorylierung nach der TMZ-Einfachbehandlung zwischen 30% (T1447 cl4) und 100% (T1371 cl3 und cl15). Die Effizienz der Induktion der H2AX-Phosphorylierung in TMZ-behandelten Kulturen war in den Klonen T1371 cl16, T1447 cl3 und cl4 gering (30% für T1447 cl4; 40% für T1447 cl3; 50% für T1371 cl16), im Fall der Klone T1442 cl15, T1447 cl1 und T1522 cl4, cl7 sowie cl10 moderat (70% bis 80%) und in den Kulturen der Klone T1371 cl2, cl3 und cl15, T1442 cl13, cl14 und cl16 sowie T1522 cl1 hoch (≥ 90%). Dabei wurden die Maxima, mit Ausnahme von T1442 cl13 und cl14, frühestens nach 4 h (T1371 cl16, T1442 cl15), aber eher 8 h (T1371 cl3, T1522 cl4) bis 24 h nach der TMZ-Behandlung erreicht.

4.2.5. Auswirkung der Radio- und Chemotherapie auf die Zellvitalität und die Apoptose

Ob die Zellvitalität der SLGC-Linien unterschiedlich von TMZ und Photonenstrahlung oder der Doppelbehandlung beeinflusst wird, wurde mittels MTT-Test und TUNEL-Analyse untersucht. Für die folgenden Analysen wurden die p53-Mutanten T1371-R175H, T1447-N239D und T1495-R273H und zusätzlich einige von diesen abgeleitete Klone eingesetzt. Weiterhin wurde der Klon T1452 cl10 (p53-*splice*-Mutation) sowie die etablierte Gliomzelllinie U87MG (p53-Wildtypgen) in diese Analyse einbezogen. Weitere Mutterkulturen und Klone wurden von Kollegen im Labor untersucht, worauf in der Diskussion Bezug genommen wird. Für diese Experimente wurden TMZ-Konzentrationen eingesetzt, die der EC₅₀ entsprachen, und unabhängig von der jeweiligen ED₅₀ (siehe oben) eine definierte Strahlendosis von 5 Gy. Dabei wurden die Zellkulturen zunächst bestrahlt, am Folgetag in einer definierten Zelldichte plattiert, einen Tag später mit TMZ behandelt und am Tag d4 bzw. d5 nach der TMZ- bzw. Kontrollbehandlung analysiert.

Sowohl die Behandlung mit TMZ, die Bestrahlung als auch die Doppelbehandlung mit Bestrahlung und TMZ führte in allen vier SLGC-Linien sowie der etablierten Gliomzelllinie U87MG zu einer signifikanten Reduktion der Vitalität (Abb. 62, links). Allerdings waren die Effekte auf die Vitalität behandlungsspezifisch und variierten zwischen den Zelllinien und zum Teil auch zwischen Klonen ein und derselben SLGC-Mutterkultur.



Abb. 62: Einfluss von Radio- und Chemosensitivität auf die Vitalität von SLGCs und abgeleiteten Klonen. Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Assay am Tag d4 bzw. im Fall von T1495 und T1495 cl13 am Tag d5. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen, optischen Dichte (OD) von mindestens 16 parallelen Einzelwerten sowie die Standardabweichung. Die Mittelwerte wurden gegen die Kontrollproben normiert, deren OD (Mittelwert) als 1 definiert wurde. Die unterschiedlichen Behandlungen sind durch verschiedene Farbtöne repräsentiert. Die Signifikanzen sind als * (p < 0,05), ** (p < 0,01) und als *** (p < 0,001) angegeben und die Bezugswerte durch Klammern verbunden. – C, Kontrollbehandlung; TMZ, Temozolomid-Behandlung mit EC_{50} ; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy/EC₅₀ Temozolomid; MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid.

Die Vitalität von T1371-R175H und T1495-R273H sank signifikant stärker nach der Behandlung mit der EC₅₀ von TMZ (T1371: -39%, T1495: -31%) als nach der Bestrahlung mit 5 Gy (T1371: -16%, T1495: -17%; Anhang Abb. 86). Eine zusätzliche Reduktion der Vitalität nach der Doppelbehandlung war im Vergleich zur Behandlung mit TMZ allein nicht zu beobachten. Im Gegensatz zur T1495-Mutterkultur sank die Vitalität im Fall des Klons T1495 cl13 nach der alleinigen TMZ-Behandlung, der Bestrahlung sowie der Doppelbehandlung ähnlich stark (TMZ: -14%; 5 Gy: -13%; Doppelbehandlung: -17%; Abb. 62, rechts). Somit wurde die Vitalität der Zellen im Fall des Klons T1495 cl13 durch die TMZ-Behandlung bzw. die Doppelbehandlung weniger effizient gesenkt als in der Mutterkultur (TMZ, Mutterkultur: -31%, T1495 cl13: -14%; Doppelbehandlung, Mutterkultur: -28%, T1495 cl13: -17%), während die Reduktion der Vitalität nach der alleinigen Bestrahlung ähnlich hoch ausfiel (Mutterkultur: -17%, T1495 cl13: -13%).

Im Fall von T1447-N239D wurden vier Klone untersucht (Abb. 62). In Kulturen des Klons T1447 cl4 reduzierte die Behandlung mit TMZ die Vitalität signifikant um 23%. Die anderen drei Klone reagierten weniger sensitiv. So wurde die Vitalität nach der TMZ-Einfachbehandlung im Fall des Klons T1447 cl9 um 16% und im Fall von T1447 cl12 um 5% signifikant reduziert, während es in Klon T1447 cl2 zu keiner signifikanten Senkung kam. Die alleinige Bestrahlung führte in Klon T1447 cl4 zu einer signifikant stärkeren Reduktion der Vitalität als die Einfachbehandlung mit TMZ (Bestrahlung: -28%; TMZ: -23%). Auch nach der alleinigen Bestrahlung wiesen die anderen T1447-Klone eine geringere Sensitivität auf. Im Detail fiel die Vitalität in den Klonen T1447 cl9 und cl12 signifikant (T1447 cl 9: -12%; cl12: -8%), während sich die Vitalität im Fall des Klons T1447 cl2 nicht signifikant veränderte. Ebenso erwies sich der Klon T1447 cl4 als sensitiver gegenüber der Doppelbehandlung als die anderen drei Klonkulturen. So wurde im Fall des Klons T1447 cl4 die Vitalität nach der Doppelbehandlung um 32% reduziert, wohingegen die Vitalität in den Klonkulturen von T1447 cl9 und cl12 um 14% (cl9) bzw. 11% (cl12) sank und im Fall des Klons T1442 cl2 keine signifikante Reduktion der Vitalität zu beobachten war.

Die Vitalität des Klons T1452 cl10 (p53-*splice*-Mutante) und der etablierten Gliomzelllinie U87MG (p53_{wT}) nahm nach jeder Art der Behandlung nur gering, jedoch signifikant ab (Abb. 62). Dabei wurde

im Fall des Klons T1452 cl10 die Vitalität durch die alleinige TMZ-Behandlung um 8%, durch die Bestrahlung um 7% und durch die Doppelbehandlung um 10% gesenkt, während die Vitalität in Kulturen der U87MG-Linie nach der Einfachbehandlung mit TMZ sowie der Doppelbehandlung um 5% und nach alleiniger Bestrahlung um 7% reduziert wurde.



Abb. 63: Induktion von Apoptose nach Behandlung mit Temozolomid und/oder Bestrahlung. Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Methode am Tag d4 bzw. im Fall von T1495 und T1452 cl10 am Tag d5 in einer Behandlungsserie. Der Anteil FITC-positiver Zellen sowie ein systematischer Fehler von 10% ist angegeben. Die unterschiedlichen Behandlungen sind durch verschiedene Farbtöne repräsentiert. – C, Kontrollbehandlung; TMZ, Temozolomid-Behandlung mit EC₅₀; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy/EC₅₀ Temozolomid; TUNEL, *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*; FITC, Fluoresceinisothiocyanat.

Das TUNEL-Assay wurde mit den Mutterkulturen T1371-R175H und T1495-R273H sowie den Klonen T1447 cl4-N239D und T1452 cl10 (*splice*-Mutante) durchgeführt. Die Messung erfolgte am Tag d4 (für T1371 und T1447 cl4) bzw. d5 (für T1495 und T1452 cl10) nach der TMZ- bzw. Kontrollbehandlung. In T1371-Kulturen stieg der Anteil an apoptotischen Zellen nach der TMZ-Behandlung relativ zur Kontrolle um das 2,2-Fache (Kontrolle: 21%; TMZ: 46%), während nach der alleinigen Bestrahlung der Anteil um das Doppelte zunahm (Bestrahlung: 41%) und nach der Doppelbehandlung um das 2,6-Fache (Doppelbehandlung: 54%; Abb. 63). Somit führte die Doppelbehandlung mit 5 Gy und 200 μ M TMZ im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung zu einem weiteren, jedoch nicht additiven, Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen um 30%.

Im Fall von T1495 nahm der Anteil apoptotischer Zellen nach der Einfachbehandlung mit TMZ relativ zur Kontrolle um 65% zu und stieg auf 8% (Kontrolle: 5%), während die alleinige Bestrahlung zu einem Anstieg um das 2,4-Fache führte (Bestrahlung: 12%; Abb. 63). Nach der Doppelbehandlung waren im Vergleich zur Kontrolle 2,2-mal mehr Zellen apoptotisch (Doppelbehandlung: 11%). Somit stieg der Anteil an apoptotischen Zellen nach der Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 µM TMZ im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung nicht weiter an.

In TMZ-behandelten Kulturen des Klons T1447 cl4 waren, im Vergleich zur Kontrollbehandlung, 4-mal mehr Zellen apoptotisch (Kontrolle: 5%; TMZ: 20%; Abb. 63). Im Gegensatz dazu wurde die Apoptose durch die Bestrahlung deutlich effizienter induziert. Dabei stieg der Anteil apoptotischer Zellen relativ zur Kontrolle nach alleiniger Bestrahlung um das 10-Fache (Bestrahlung: 50%) und nach der Doppelbehandlung sogar um das 14-Fache (Doppelbehandlung: 68%). Somit wurde der Anteil apoptotischer Zellen durch die Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M TMZ im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung um 35% gesteigert, wobei der Effekt von 5 Gy und 100 μ M TMZ additiv war.

Der Anteil an apoptotischen Zellen stieg in Kulturen des Klons T1452 cl10 durch die TMZ-Einfachbehandlung auf 23% (Kontrolle: 0%), während es durch die alleinige Bestrahlung zu einem Anstieg auf 10% kam (Abb. 63). Durch die Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M TMZ wurde in 26% der Zellen die Apoptose induziert, sodass relativ zur Einfachbehandlung mit TMZ der Anteil apoptotischer Zellen nur geringfügig zunahm.

<u>Fazit – Vitalität und Apoptose in SLGC-Linien, Klonen und U87MG nach Einfach- und Doppelbehandlung</u> Die verschiedenen p53-Mutanten T1371-R175H, T1495-R273H, T1447-N239D (hier Klon cl4), T1452 (hier Klon cl10; *splice*-Mutante) sowie die etablierte Gliomzelllinie U87MG (p53_{WT}) zeigten am Tag d4 bzw. d5 (T1495, T1452 cl10) nach der Einfach- und Doppelbehandlung eine statistisch signifikante Reduktion der Zellvitalität, die für die Doppelbehandlung in vergleichbaren Größenordnungen lag (Senkung um 5% bis 42%). Dabei wurde die Vitalität nur in einer Zelllinie (T1447 cl4) durch die Doppelbehandlung signifikant stärker reduziert als durch die Einzelbehandlungen. Im Gegensatz zur T1495-Mutterkultur und dem Klon T1495 cl13, waren die Unterschiede zwischen den Effekten der Einfach- und Doppelbehandlung auf die T1447-Klone primär quantitativer Art, wobei die Effektivität von Klon T1447 cl2 über cl12 über cl9 zu cl4 zunahm. Der Anteil apoptotischer Zellen stieg nach den Behandlungen in Kulturen von T1371, T1495, T1447 cl4 und T1452 cl10, aber nur im Fall von T1447 cl4 wurde ein additiver Effekt von TMZ und Bestrahlung beobachtet.

4.2.6. Auswirkung der Radio- und Chemotherapie auf den Zellzyklus

Für die SLGC-Linien, die mittels MTT- und TUNEL-Assay untersucht wurden (mit Ausnahme von T1452 cl10), wurde weiterhin geprüft, ob die Radio- und Chemotherapie Auswirkungen auf den Zellzyklus hat. Hierfür wurde die DNA der Zellen mit Propidiumiodid (PI) markiert und der DNA-Gehalt anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Die PI-Markierung fand, wie im Fall der MTT- und TUNEL-Analysen, am Tag d4 bzw. d5 (für T1495) nach der TMZ- bzw. Kontrollbehandlung statt.

In der kontrollbehandelten T1371-Kultur befanden sich am Tag d4 44% der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus, 12% in der Synthese- (S-) Phase und 27% in der G2-Phase (Abb. 64). In 17% der T1371-Zellen war der DNA-Gehalt höher als bei einem tetraploiden Chromosomensatz (>4n). Nach der Behandlung mit 200 µM TMZ war ein Anstieg des Anteils an Zellen in der G0/G1-Phase um ein Drittel auf 60% zu verzeichnen. Der Anteil der Zellen in der S-Phase halbierte sich auf 6% und der Anteil an Zellen in der G2-Phase sank auf 17%. Hingegen blieb der Anteil an Zellen mit einem DNA-Gehalt >4n mit 17% nach der Behandlung mit TMZ unverändert. Nach der Bestrahlung mit 5 Gy war der Anteil in G0/G1-befindlicher Zellen nur leicht erhöht (49%) und der in der S-Phase-befindlichen Zellen auf 8% reduziert. Der Anteil von Zellen in der G2-Phase (25%) und von Zellen mit einen höheren DNA-Gehalt (18%) wurde durch die Bestrahlung kaum verändert. Die Verteilung der Zellen im Zellzyklus nach der Doppelbehandlung entsprach der nach der TMZ-Einfachbehandlung (Anstieg des Anteils von Zellen in G1/G0). Somit schien es bei T1371 zu einem TMZ-vermittelten, partiellen G1-Arrest zu kommen.



Abb. 64: Einfluss von Radio- und Chemosensitivität auf den Zellzyklus von SLGCs. Bestimmung der Zellzyklusverteilung mittels PI- (Propidiumiodid-) Markierung am Tag d4 bzw. d5 (für T1495) nach der Behandlung mit TMZ (EC_{50} Temozolomid), RT (Bestrahlung mit 5 Gy) oder RT+TMZ (Doppelbehandlung 5 Gy/ EC_{50} TMZ). Dargestellt ist der Anteil PI-positiver Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2n (G1/G0), 2n-4n (S-Phase), 4n (G2) und >4n einer repräsentativen Behandlungsserie. Der systematische Fehler von 10% ist angegeben. Die unterschiedlichen Zellzyklusphasen sind durch verschiedene Farbtöne repräsentiert. – C, Kontrollbehandlung.

In der kontrollbehandelten Kultur des Klons T1447 cl4 waren 44% der Zellen in der GO/G1-Phase, 11% in der S-Phase sowie 32% in der G2-Phase (Abb. 64). 13% der Zellen wiesen einen DNA-Gehalt von >4n auf. Die Behandlung mit 100 µM TMZ führte zu einer leichten Anreicherung von Zellen mit einem DNA-Gehalt >4n (18%). Hierbei sank der Anteil der Zellen in der G0/G1- (40%) und der G2-Phase (30%) nur wenig und der Anteil an Zellen in der S-Phase blieb nahezu unverändert (12%). Die Bestrahlung mit 5 Gy führte zu einer deutlichen Anreicherung von Zellen in der G2-Phase (40%) und einem starken Anstieg von Zellen mit einem DNA-Gehalt >4n (44%). Der Anteil an Zellen in der S-Phase wurde durch die Bestrahlung nur leicht auf 8% gesenkt. Hingegen sank der Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase deutlich, von 45% in der Kontrollkultur auf 8% in der bestrahlten Kultur. Nach der Doppelbehandlung mit Bestrahlung und TMZ wurde der Zellzyklus analog zur alleinigen Bestrahlung verändert. Es waren 8% der Zellen in der G0/G1-Phase, 7% der Zellen in der S-Phase und 37% der Zellen in der G2-Phase. Somit bewirkten die alleinige Bestrahlung und die Doppelbehandlung einen partiellen G2-Arrest. Der Anteil an Zellen mit einem höheren DNA-Gehalt stieg nach der Doppelbehandlung verglichen zur alleinigen Bestrahlung leicht an (48%).

48% der Zellen der kontrollbehandelten T1495-Kultur waren in der G0/G1-Phase, 11% in der S-Phase und 31% in der G2-Phase (Abb. 64). Der Anteil von Zellen mit einem DNA-Gehalt >4n lag bei 10%. Die Behandlung mit 100 μM TMZ führte zu einem leichten Anstieg der Zellen in der S-Phase (16%), während der Anteil von Zellen in der G0/G1-Phase nahezu unverändert war (48%). Die Anteile an Zellen in der G2-Phase (28%) und mit einem höheren DNA-Gehalt (8%) waren verglichen zur Kontrolle leicht reduziert. Nach der Bestrahlung mit 5 Gy sank der Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase auf 40%. Zudem wurde der Anteil Zellen in der S-Phase auf 6% reduziert und der Anteil an Zellen in der G2-Phase stieg leicht von 31% auf 37%. Die Bestrahlung führte zusätzlich zu einem Anstieg der Zellen mit einem DNA-Gehalt von >4n auf 17%. Nach der Doppelbehandlung ergab sich ein ähnliches Bild wie nach alleiniger Bestrahlung (G0/G1: 37%; S: 7%; G2: 35%; >4n: 21%). Somit lösten weder 100 μM TMZ noch 5 Gy einen deutlichen Arrest der T1495-Zellen am Restriktionspunkt G1 oder G2 aus.

In der etablierten Gliomzelllinie U87MG befanden sich in der kontrollbehandelten Kultur nahezu alle Zellen in der G0/G1-Phase (92%), während die übrigen Zellen in der S- (5%) und G2-Phase (3%) waren (Abb. 64). Die Einfachbehandlung mit 100 μ M TMZ führte zu einer deutlichen Abnahme des Anteils Zellen in der G0/G1-Phase (von 92% auf 19%), während der Anteil an Zellen in der S-Phase (10%) und mit einem DNA-Gehalt >4n (10%) gering und in der G2-Phase (von 3% auf 67%) stark anstieg. Im Gegensatz dazu ergab sich nach der alleinigen Bestrahlung mit 5 Gy ein nahezu identisches Bild wie nach der Kontrollbehandlung (G0/G1: 91%; S: 5%; G2: 3%; >4n: 1%). Die Doppelbehandlung führte im Vergleich zur Kontrollbehandlung zu einer starken Reduktion der Zellen in G0/G1 (von 92% auf 43%), zu einem geringen Anstieg an Zellen in der S-Phase (11%) und >4n (3%) sowie einer deutlichen Zunahme an Zellen in der G2-Phase (von 3% auf 43%). Somit löste die Anwesenheit von 100 μ M TMZ einen partiellen G2-Arrest aus, wobei die Effizienz in Kulturen, die ausschließlich mit TMZ behandelt wurden, höher war als in doppeltbehandelten Kulturen.

Fazit – Proliferation in SLGC-Linien und Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung

Die Doppelbehandlungen mit TMZ (EC₅₀) und Bestrahlung (5 Gy) lösten in zwei von drei SLGC-Linien sowie der etablierten Gliomzelllinie U87MG einen zumindest partiellen Zellzyklusarrest aus. Dieser betraf im Fall von T1371-R175H den Restriktionspunkt G1 und war durch TMZ induziert, wie die Einfachbehandlungen belegen. Im Fall des Klons T1447 cl4-N239D wurde durch die Bestrahlung ein G2-Arrest induziert, während 100 μ M TMZ keinen Zellzyklusarrest bewirkten. Im Gegensatz dazu wurde der G2-Arrest im Fall von U87MG durch TMZ induziert, während die Bestrahlung keinen Einfluss auf den Zellzyklus nahm. Nur im Fall von T1495-R273H blieb der Zellzyklus nach den Behandlungen nahezu unbeeinflusst.

4.2.7. Auswirkung der Radio- und Chemotherapie auf den Anteil CD133-positiver Zellen

Ob die Behandlung mit TMZ (EC_{50}) oder die Bestrahlung mit 5 Gy in den Einfach- und Doppelbehandlungen zu einer Anreicherung des Anteils CD133-positiver Zellen führt, wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Zusätzlich wurde am Beispiel von T1495 die *cd133*-mRNA-Expression von behandelten Kulturen (100 μ M TMZ/20 Gy) an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt.



Abb. 65: Anteil CD133-positiver Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit Temozolomid und/oder der Bestrahlung. Durchflusszytometrische Analysen mit einem Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD133/Prominin-1 am Tag d4 bzw. d5 (für T1495 und T1452 cl10) nach der Temozolomid- bzw. Kontrollbehandlung. Aufgetragen ist der Anteil CD133-positiver Zellen einer repräsentativen Behandlungsserie. Der systematische Fehler von 10% ist angegeben. – C, Kontrollbehandlung; TMZ, Temozolomid-Behandlung mit EC₅₀; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, 5 Gy/EC₅₀ Temozolomid.

In T1371-Kulturen betrug der Anteil CD133-positiver Zellen in den Kontrollen 9,4% (Abb. 65). Nach der Behandlung mit 200 μ M TMZ nahm der Anteil stark um 75% ab und lag nur noch bei 2,5%. Durch die Bestrahlung mit 5 Gy wurde der Anteil CD133-positiver Zellen ähnlich stark reduziert (Senkung von 65% auf 3,3%). Die Doppelbehandlung führte zu einer noch stärkeren Abnahme des Anteils CD133positiver Zellen im Vergleich zu den Einzelbehandlungen (auf 1,4%). Somit reduzierten sowohl 200 μ M TMZ als auch 5 Gy die Anzahl CD133-positiver Zellen, wobei die Doppelbehandlung CD133-positive Zellen am effektivsten eliminierte.

In kontrollbehandelten Kulturen der T1442-Linie betrug der Anteil CD133-positiver Zellen 28,8% (Abb. 65). Während der Anteil CD133-positiver Zellen nach der Behandlung mit 100 μ M TMZ stark um 75% sank (von 28,8% auf 7,2%), nahm der Anteil nach der Bestrahlung mit 5 Gy nur gering ab (auf 22,9%). Im Vergleich zu den Einfachbehandlungen reduzierte sich der Anteil CD133-positiver Zellen nach der Doppelbehandlung am stärksten (auf 3,6%). Somit wurde die Anzahl CD133-positiver Zellen durch 100 μ M TMZ effizient eliminiert, durch die Doppelbehandlung sogar noch stärker, während die alleinige Bestrahlung den Anteil kaum verringerte.

Im Fall des Klons T1447 cl4 reduzierte die Einfachbehandlung mit 100 μ M TMZ den Anteil CD133positiver Zellen um 35% (von 15,1% in der Kontrolle auf 9,6%) und die Bestrahlung mit 5 Gy um 25% (auf 11,1%; Abb. 65). Durch die Doppelbehandlung wurde der Anteil CD133-positiver Zellen noch stärker reduziert (auf 7,1%). Somit nahm der Anteil CD133-positiver sowohl nach Einfach- als auch Doppelbehandlung mit 100 μ M TMZ und 5 Gy ab, wobei die Effizienz der Eliminierung nach der Doppelbehandlung additiv war.

Der Anteil CD133-positiver Zellen betrug in kontrollbehandelten T1495-Kulturen 25,2% (Abb. 65). Sowohl die Behandlung mit 100 μ M TMZ als auch die Bestrahlung mit 5 Gy reduzierten die Anzahl CD133-positiver Zellen nur geringfügig (TMZ: auf 21,4%; Bestrahlung: auf 22,1%). Nach der Doppelbehandlung nahm der Anteil CD133-positiver Zellen etwas stärker ab (auf 17,8%). Somit wurde die Anzahl CD133-positiver Zellen sowohl durch 100 μ M TMZ als auch durch 5 Gy eliminiert, allerdings mit geringer Effizienz. Nach der Doppelhandlung war ein additiver Effekt der Einfachbehandlungen zu beobachten.

Im Fall des Klons T1452 cl10 waren 64,3% der Zellen in den Kontrollkulturen CD133-positiv (Abb. 65). Während der Anteil CD133-positiver Zellen nach der Behandlung mit 100 μ M TMZ nur gering sank (auf 59,2%), fiel die Anzahl positiver Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy stärker (auf 46,6%). Die Reduktion des Anteils CD133-positiver Zellen fiel nach der Doppelbehandlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung geringer aus (Bestrahlung: 46,6%; Doppelbehandlung: 54,8%). Somit reduzierten sowohl 100 μ M TMZ als auch 5 Gy die Anzahl CD133-positiver Zellen, wobei die alleinige Bestrahlung die CD133-positiven Zellen effizienter eliminierte.

<u>Fazit – Anteil CD133-positiver Zellen in SLGC-Linien und Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung</u> Die durchflusszytometrische Analyse zeigte in keiner der untersuchten SLGC-Linien eine Anreicherung von CD133-positiven Zellen nach Behandlung mit TMZ (EC₅₀) oder 5 Gy. In zwei SLGC-Linien (T1371 und T1442) wurden sogar drastische Reduktionen des Anteils an CD133-positiver Zellen festgestellt, in drei Zelllinien geringe (T1495 und T1452 cl10) bis moderate (T1447 cl4) Senkungen an CD133-positiven Zellen. In Kulturen von T1371, T1442, T1447 cl4 und T1495 konnte die Doppelbehandlung die CD133positiven Zellen am effizientesten eliminieren und die alleinige Bestrahlung mit 5 Gy zeigte die geringsten Effekte. Dabei variierte der Effekt der Einfachbestrahlung zwischen den Zelllinien deutlich. Im Fall des Klons T1452 cl10 wurden CD133-positive Zellen durch die alleinige Bestrahlung mit 5 Gy effizienter eliminiert als in Anwesenheit von TMZ.

Um die Frage zu beantworten, ob die Reduktion der Anzahl CD133-positiver Zellen durch TMZ (EC₅₀) und Bestrahlung mit der transkriptionellen Aktivität des cd133-Gens korreliert, wurde im Fall von T1495-R273H eine Analyse der cd133-mRNA-Expression über drei Tage durchgeführt. Da die Bestrahlung mit 5 Gy im durchflusszytometrischen Experiment den Anteil CD133-positiver Zellen eher gering reduzierte, wurden für die Real-Time PCR- (qRT-PCR-) Analyse Kulturen eingesetzt, die mit 20 Gy bestrahlt wurden. Allerdings wich zusätzlich das Behandlungsschema von den durchflusszytometrischen Experimenten ab. In diesem Fall wurden die T1495-Kulturen am gleichen Tag innerhalb von einer Stunde mit 100 μ M TMZ behandelt und mit 20 Gy bestrahlt.



Abb. 66: Expression von *cd133*-mRNA nach der Behandlung mit 100 μ M Temozolomid und/oder Bestrahlung mit 20 Gy. Real-Time PCR-Analyse. Die Expressionslevel von *cd133/prominin-1* wurden gegen diejenigen von drei Referenzgenen (*gapdh*, *ubc*, 18S *r-rna*) normalisiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte eines Triplikats von Reaktionen sowie die Standardabweichung. Statistisch signifikante Abweichungen sind mit ** = p < 0,01 bzw. *** = p < 0,001 markiert und die Bezugsgrößen durch Klammern gekennzeichnet. Die unterschiedlichen Behandlungen sind durch verschiedene Farbtöne repräsentiert. – CD133, Prominin 1; C, Kontrollbehandlung; TMZ, 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 20 Gy; RT+TMZ, 20 Gy/100 μ M Temozolomid; *gapdh*, Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase; *ubc*, Ubiquitin Ligase C; *r-rna*, ribosomale Ribonukleinsäure.

Die Kontrollen zeigten einen Anstieg der *cd133*-mRNA-Expression vom Tag d3 bis zum Tag d5 in den T1495-Kulturen (Abb. 66). Beide Einzelbehandlungen und die Doppelbehandlung induzierten übereinstimmend eine Reduktion der *cd133*-mRNA-Expression. So nahm am Tag d3 nach der Behandlung mit 100 μ M TMZ die *cd133*-Expression im Vergleich zur Kontrolle um 50% ab, am Tag d4 um 45% und am Tag d5 ebenfalls um 45% relativ zur Kontrolle am Tag d3. Somit blieb die *cd133*-Expression nach TMZ-Behandlung über drei Tage unverändert. Nach der Bestrahlung mit 20 Gy nahm die *cd133*-Expression im Vergleich zur Kontrolle am Tag d3 um 50% ab, am Tag d4 um weitere 55% und am Tag d5 um zusätzliche 50%. Somit induzierte die einmalige Bestrahlung mit 20 Gy eine progressive Reduktion der *cd133*-mRNA-Expression über mehrere Tage, die auf eine drastische Eliminierung CD133-positiver Zellen hinweist. Die Doppelbehandlung mit 100 μ M TMZ und 20 Gy erwies sich als effizienter als die alleinige Bestrahlung. Im Detail sank das *cd133*-Expressionslevel am Tag d3 nach der Doppelbehandlung relativ zur Kontrolle um 75%, nahm am Tag d4 um weitere 25% ab und reduzierte sich am Tag d5 um zusätzliche 35%. Somit induzierte die Doppelbehandlung, ebenso wie die alleinige Bestrahlung, eine zunehmende Reduktion der *cd133*-Expression über d133-Expression über d133-Expression d13-Expression d13-Expression d13-Expression zusätzliche 35%. Somit induzierte d133-Expression zusätzliche 25% ab und reduzierte sich am Tag d5 um zusätzliche 35%. Somit induzierte d133-Expression zusätzliche 25% ab und reduzierte sich am Tag d5 um zusätzliche 35%. Somit induzierte d133-Expression zusätzliche 35% ab und reduzierte sich am Tag d5 um zusätzliche 35%. Somit induzierte d133-Expression zusätzliche 35% ab und reduzierte sich am Tag d5 um zusätzliche 35%. Somit induzierte d133-Expression zusätzliche 25% ab und reduzierte sich am Tag d5 um zusätzliche 35%.

Doppelbehandlung nur am Tag d3 höher, jedoch nicht statistisch signifikant, war als die der alleinigen Bestrahlung (Anhang Abb. 87).

Insgesamt zeigte sich, dass die Behandlung mit 100 µM TMZ in T1495-R273H-Kulturen zu einer einmaligen Reduktion der *cd133*-mRNA-Expression führt, wohingegen nach der Bestrahlung mit 20 Gy bzw. der Doppelbehandlung die *cd133*-Expression stetig abnahm. Somit weisen die Ergebnisse auf eine Eliminierung von CD133-positiven Zellen sowohl nach der TMZ-Behandlung als auch nach der Bestrahlung hin, was die Beobachtungen der durchflusszytometrischen Analyse unterstützt.

4.2.8. Auswirkung der Radio- und Chemotherapie auf die Sox2-Expression

Ob die alleinige Bestrahlung, die TMZ-Behandlung oder die Doppelbehandlung mit 5 Gy/TMZ Auswirkungen auf die Sox2-Expression hat, wurde mittels Western blot-Analysen untersucht. Zusätzlich wurde mittels Immunzytochemie analysiert, ob sich der Anteil Sox2-positiver Zellen in den Kulturen durch die Behandlungen verändert. Die Sox2-positiven Zellen wurden auf zehn repräsentativen Mikrofotographien ausgezählt (siehe Beispiele in Abb. 70) und graphisch dargestellt (Abb. 69). Da die Zellzahl insbesondere nach der Doppelbehandlung sehr gering war und Areale mit wenigen und solche mit vielen Zellen zu beobachten waren, wurde für die Immunzytochemie keine statistische Auswertung durchgeführt.

Es ist zu beachten, dass sich die Behandlungsschemata beider Analysemethoden unterschieden. Während die Kulturen für die Western blot-Analyse am gleichen Tag mit 100 μ M TMZ und 5 Gy behandelt wurden (analog zu den Analysen in Kapitel 4.2.2.), wurden die Kulturen für die Immunzytochemie parallel zu den MTT-, TUNEL-, Zellzyklus- und durchflusszytometrischen Analysen durchgeführt (Kapitel 4.2.5., 4.2.6. und 4.2.7.) und wurden somit zunächst mit 5 Gy bestrahlt, am Folgetag plattiert und wiederum einen Tag später mit TMZ (EC₅₀) behandelt.

Der Effekt der Einfach- und Doppelbehandlungen wurde für die p53-Mutanten T1442-R248W, T1371-R175H, T1495-R273H, T1447 cl4-N239D und T1452 cl10 (*splice*-Mutante) sowie zwei p53_{WT}-Linien (T1440, T1522) über einen Zeitraum von fünf Tagen untersucht. Dabei wurde die erste Bestimmung nach 6 h durchgeführt. Aufgrund der geringen Materialmengen konnte für die T1440-Serie die Expression in den doppeltbehandelten Proben am Tag d4 und d5 und für die T1447 cl4-Serie in den behandelten Proben am Tag d4 (nur für Bestrahlung) und d5 (für alle Behandlungen) nicht ermittelt werden.

Der Sox2-Antikörper erkannte in den Extrakten aller untersuchten SLGC-Linien eine Bande von 34 kDa, was der Größe des Sox2-Proteins entspricht. Eine Auswahl typischer Western blots ist in Abbildung 67 gezeigt. Das höchste Sox2-Level wiesen T1452 cl10 und T1442-R248W auf, gefolgt von T1440, T1371-R175H, T1447 cl4-N239D, T1522 und T1495-R273H.

Die p53_{WT}-Linie T1440 zeigte nach Behandlung mit 100 µM TMZ am Tag d1 einen Anstieg der Sox2-Expression relativ zur Kontrolle (Abb. 68). Das Sox2-Level nahm bis zum Tag d4 nahezu linear zu (d2: +15%, d3: +10%, d4: +20%) und stieg vom Tag d4 bis zum Tag d5 noch einmal um 55%. Im Vergleich zur kontrollbehandelten Kultur war die Sox2-Expression am Tag d5 um das 2,5-Fache höher, was auf eine generelle Steigerung des Stammzellcharakters der Zellen oder einer Anreicherung von Sox2positiven Zellen in der Kultur hinweisen könnte. Nach Bestrahlung mit 5 Gy wies T1440 ebenfalls eine Steigerung der Sox2-Expression auf. Dabei wurde am Tag d5 ein höheres Sox2-Level ermittelt als für die TMZ-Behandlung (5 Gy: 3,5-fach relativ zur Kontrolle). Allerdings wurde ein Anstieg der Sox2-Expression nach Bestrahlung erst am Tag d2 festgestellt. Die Doppelbehandlung führte analog zur TMZ- Einfachbehandlung zu einer erhöhten Sox2-Expression am Tag d1. Bis zum Tag d2 wurde die Sox2-Expression zunächst leicht erhöht (d2: 35% relativ zur Kontrolle) und von Tag d2 nach d3 um 15% reduziert. Im Vergleich zur Kontrollkultur war das Sox2-Level um 20% erhöht. Ob es am Tag d5 zu einer ähnlichen Erhöhung wie im Fall der Einfachbehandlungen kommt, konnte wegen zu geringer Materialmengen für diese Serie nicht ermittelt werden. Eine Bestimmung des Anteils Sox2-positiver Zellen nach den Behandlungen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht.



Abb. 67: Sox2-Expression nach Behandlung mit Temozolomid und/oder der Bestrahlung. Exemplarische Western blot-Analyse der Sox2-Proteinexpression über fünf Tage in T1371- und T1495-Kulturen (links) nach alleiniger Bestrahlung mit 5 Gy bzw. in T1522 (rechts) nach Behandlung mit 100 μ M TMZ (T), Bestrahlung mit 5 Gy (RT) oder der Doppelbehandlung (RT+T). Aktin bzw. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. – C, Kontrollbehandlung (6 h-Wert); C_{d5}, Kontrollbehandlung (Wert am Tag d5); Sox2, sex determining region Y-box 2.

Im Fall der zweiten $p53_{WT}$ -Linie T1522 nahm die Sox2-Expression nach Behandlung mit 100 μ M TMZ transient um 50% zu. Am Tag d1 war die Sox2-Expression relativ zur Kontrolle um 35% erhöht und stieg bis zum Tag d2 um weitere 10% (Abb. 68). Bis zum Tag d4 sank die Sox2-Expression zunächst um 30% und stieg bis zum Tag d5 wieder an. Somit war die Sox2-Expression am Tag d5 nach der Behandlung mit TMZ 30% höher als in der kontrollbehandelten Kultur. Nach Bestrahlung mit 5 Gy wurde ebenfalls eine transiente Steigerung der Sox2-Expression festgestellt, allerdings mit einem deutlichen Peak am Tag d2. Bis zum Tag d1 stieg die Sox2-Expression relativ zur Kontrolle nicht maßgeblich an, nahm aber bis zum Tag d2 um 75% zu. Am Tag d3 war die Sox2-Expression wieder auf das Level von Tag d1 gesunken und blieb bis zum Tag d5 nahezu unverändert. Somit war die Sox2-Expression am Tag d5 nach der Bestrahlung relativ zur kontrollbehandelten Kultur nur geringfügig (20%) erhöht. Nach der Doppelbehandlung zeigte die Sox2-Expression bis zum Tag d3 ein ähnliches Profil wie nach alleiniger Bestrahlung. Das heißt, nach anfänglich unveränderter Expression kam es am Tag d2 zu einem Anstieg des Sox2-Levels um 60%. Vom Tag d2 zum Tag d3 sank die Sox2-Expression zunächst um 15%, dann um weitere 15% (Tag d4) und blieb danach unverändert. Im Vergleich zur Kontrolle war das Sox2-Level am Tag d5 nur um 20% erhöht, was darauf hinweist, dass eher keine Anreicherung von Sox2-positiven Zellen in T1522-Kulturen erfolgte. Wie bereits für T1440 wurde auch für T1522 der Anteil Sox2positiver Zellen nach den Behandlungen nicht bestimmt.



Abb. 68: Veränderung der Sox2-Proteinexpression nach Behandlung mit Temozolomid und/oder Bestrahlung. Die Sox2-Expression wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Western blot-Analyse mit den Proteinextrakten einer behandelten Serie und den zugehörigen Kontrollen (C). – Sox2, *sex determining region Y-box* 2; TMZ, 100 μM Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, 5 Gy/100 μM Temozolomid.

Im Fall der p53-Mutante T1442 wurde eine nahezu lineare Zunahme der Sox2-Expression nach Behandlung mit 100 μ M TMZ festgestellt (Abb. 68). So stieg die Sox2-Expression bis zum Tag d1 um 50%. Zwar war die Sox2-Expression am Tag d2 relativ zum Tag d1 um 30% reduziert, nahm dann aber bis zum Tag d4 konstant zu. Relativ zum Tag d4 nahm die Sox2-Expression am Tag d5 wieder geringfügig (um 20%) ab. Am Tag d5 nach der Behandlung mit TMZ war die Sox2-Expression verglichen zur Kontrolle um das 3-Fache erhöht, was auf eine generelle Steigerung der Sox2-Expression oder eine Zunahme der Anzahl Sox2-positiver Zellen hinweisen könnte. In der Tat nahm die Anzahl Sox2-positiver Zellen über fünf Tage nach Zugabe von 100 μ M TMZ sogar um 16% ab, was in der Kontrolle nicht zu beobachten war (Abb. 69). Die Western blot-Analysen der bestrahlten T1442-Extrakte zeigten eine deutliche Zunahme der Sox2-Expression über fünf Tage (Abb. 68). So führte die Bestrahlung mit 5 Gy innerhalb der ersten drei Tage zu einem Anstieg der Sox2-Expression um 55%. Dabei waren die Expressionslevel bereits nach 6 h leicht erhöht und nach 6 h und 24 h nahezu identisch. Vom Tag d3 zum Tag d4 kam es zu einem weiteren Anstieg der Sox2-Expression auf das 3-Fache relativ zur Kontrolle und bis zum Tag d5 stieg die Sox2-Expression nur noch minimal (10%). Somit war die Sox2-Expression am Tag d5 nach der Bestrahlung im Vergleich zur kontrollbehandelten Kultur 3,3-mal höher, was wiederum auf eine Steigerung der Sox2-Expression in positiven Zellen oder eine Steigerung der Anzahl Sox2-positiver Zellen hinweist. Die Analysen der immunzytochemischen Präparate wiesen nicht auf einen Anstieg der Anzahl an Sox2-positiven Zellen hin (Abb. 69). Die Western blot-Analysen der Extrakte der doppelbehandelten Zellen zeigten eine nahezu lineare Zunahme der Sox2-Expression über fünf Tage (Abb. 68). So nahm das Sox2-Level zunächst um 30% (6 h) und dann bis zum Tag d1 um weitere 20% zu. Bis zum Tag d3 stieg das Sox2-Level um weitere 35% an und nahm von Tag d3 zum Tag d4 noch einmal um 35% zu. Bis zum Tag d5 sank das Sox2-Level minimal. Im Vergleich zur kontrollbehandelten Kultur war am Tag d5 nach der Doppelbehandlung das Sox2-Level um das 3-Fache erhöht. Die Bestimmung des Anteils Sox2-positiver Zellen ergab wie bei der Einfachbehandlung mit 100 µM TMZ und 5 Gy keine Zunahme der Anzahl Sox2-positiver Zellen. Somit scheint eine generelle Steigerung der Sox2-Expression vorzuliegen und keine Selektion Sox2-positiver Zellen.

Die Kulturen der p53_{mut}-Linie T1371 zeigten nach der Behandlung mit 100 µM TMZ bis zum Tag d1 eine Zunahme der Sox2-Expression relativ zur Kontrolle von 45% (Abb. 68). Vom Tag d1 zum Tag d2 reduzierte sich das Sox2-Level um 45%, stieg am Tag d3 transient geringfügig an und sank anschließend bis zum Tag d5, sodass die Sox2-Expression am Tag d5 um 40% geringer war als in der kontrollbehandelten Kultur. Somit könnte es durch die TMZ-Behandlung zu einer generellen Abnahme des Stammzellcharakters in den Zellen oder zu einer Eliminierung Sox2-positiver Zellen kommen. In der Tat nahm der Anteil Sox2-positiver Zellen bis zum Tag d4 um 63%, in diesem Fall nach Behandlung mit 200 μM TMZ, ab, während der Anteil in der Kontrolle über fünf Tage unverändert blieb (Abb. 69). In den Western blot-Analysen variierte die Sox2-Expression nach der Bestrahlung mit 5 Gy innerhalb der ersten zwei Tage kaum (6 h: +25% relativ zur Kontrolle; Abb. 68). Vom Tag d2 bis zum Tag d4 sank das Sox2-Level stark (d3: -50%; d4: -30%), bevor die Sox2-Expression bis zum Tag d5 erneut anstieg. Am Tag d5 nach der Bestrahlung lag das Sox2-Level 30% unter der kontrollbehandelten Kultur, was auf eine generelle Senkung der Sox2-Expression oder auf eine Eliminierung Sox2-positiver Zellen zurückzuführen sein kann. In der Tat deuten die immunzytochemischen Analysen darauf hin, dass es transient zu einer Reduktion der Anzahl Sox2-positiver Zellen nach der Behandlung kam (Abb. 69; beachte, dass die Bestrahlung in Kulturen für die Immunzytochemie zwei Tage zuvor erfolgte, wodurch der Tag d3 nach Bestrahlung im Western blot dem Tag d1 in der Immunzytochemie entspricht). Die Western blot-Analysen der doppelbehandelten T1371-Kultur ergaben, dass die Sox2-Expression innerhalb der ersten 24 h nahezu unverändert blieb und vom Tag d1 bis d4 stetig sank (d2: -15%; d3: -10%; d4: -30%), bevor die Sox2-Expression erneut auf das Level vom Tag d3 anstieg (Abb. 68). Somit war das Sox2-Level im Vergleich zur Kontrolle nur geringfügig reduziert (-20%). Die transiente Reduktion der Sox2-Expression könnte auf eine generelle Veränderung der Sox2-Expression hindeuten oder auf eine Eliminierung Sox2-positiver Zellen. In der Tat wiesen die immunzytologischen Analysen auf eine Reduktion Sox2-positiver Zellen nach der Doppelbehandlung hin, wobei der Anteil positiver Zellen über fünf Tage keinen Anstieg aufwies, sondern fiel (Abb. 69). Somit schien die Reduktion der Sox2-Expression nach Behandlung mit TMZ und/oder Bestrahlung mit einer Eliminierung Sox2positiver Zellen zu korrelieren.



Abb. 69: Anteil Sox2-positiver Zellen in SLGC-Kulturen nach Behandlung mit Temozolomid und/oder Bestrahlung. Die Anzahl Sox2-positiver Zellen wurde auf zehn repräsentativen Mikrofotographien ausgezählt, die unter den im Labor empirisch ermittelten Expositionszeiten aufgenommen wurden. Bei der Bestimmung des Anteils Sox2-positiver Zellen wurden moderat bis stark Sox2-positive Zellen berücksichtigt. Die Bestimmung der Expressionsstärke erfolgte im Vergleich zu Referenzaufnahmen des Labors (nicht gezeigt). Aufgetragen wurde der prozentuale Anteil Sox2-positiver Zellen. Da insbesondere nach Doppelbehandlungen die Präparate reduzierte Zellzahlen aufweisen und Areale mit wenigen und vielen Zellen vorkommen, wurde der systematische Fehler von 10% und nicht die Variation der Zellzahl angegeben. Aus den gleichen Gründen wurde keine statistische Analyse durchgeführt. – Sox2, *sex determining region Y-box* 2; d, Tag; TMZ, Temozolomid-Behandlung mit EC₅₀; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, 5 Gy/EC₅₀ Temozolomid.

Im Fall der $p53_{mut}$ -Linie T1495 kam es innerhalb von 6 h nach der Behandlung mit 100 μ M TMZ zu einem Anstieg der Sox2-Expression im Vergleich zur Kontrolle um 70% (Abb. 68). Während die Sox2-Expression bis zum Tag d1 nahezu unverändert blieb, nahm das Sox2-Level vom Tag d1 zu d2 um 35% ab. Eine weitere, starke Senkung des Sox2-Levels auf ein Fünftel relativ zur Kontrolle wurde am Tag d5 beobachtet. Die Reduktion der Sox2-Expression könnte auf eine Abnahme des Stammzellcharakters der Zellen hindeuten oder auf eine Eliminierung von Sox2-positiven Zellen. In der Tat war der Anteil Sox2-positiver Zellen nach der Behandlung mit 100 μ M TMZ über fünf Tage im Vergleich zur Kontrollkultur erhöht und zeigte keine starke Reduktion (Abb. 69 und Abb. 70). Die Western blot-Analysen der Extrakte der mit 5 Gy bestrahlten Kulturen zeigten einen stetigen Anstieg der Sox2-Expression bis zum Tag d2 auf das 2-Fache relativ zur Kontrolle. Vom Tag d2 zum Tag d3 sank das Sox2-Level auf das Ausgangslevel und wies am Tag d5 eine erneute, starke Reduktion auf. Im Vergleich zur kontrollbehandelten Kultur war das Sox2-Level fünf Tage nach der Bestrahlung um 60% geringer. Somit könnte die Bestrahlung zu einer generellen Veränderung der Sox2-Expression führen oder zu einem

direkten Effekt auf die Anzahl Sox2-positiver Zellen. In der Tat variierte der Anteil Sox2-positiver Zellen über fünf Tage nur gering (Abb. 69 und Abb. 70). Die Western blot-Analysen der doppelbehandelten Kulturen zeigten einen transienten Anstieg der Sox2-Expression mit einem Maximum am Tag d1 (relativ zur Kontrolle 2-fach erhöht), gefolgt von einer kontinuierlichen Reduktion des Sox2-Levels über die nächsten vier Tage (d2: -15%, d3: -15%, d4: -35%, d5: -70%; Abb. 68). Am Tag d5 war die Sox2-Expression 70% geringer als in der Kontrollkultur, was auf eine generelle Senkung des Sox2-Levels hindeuten könnte oder auf eine Eliminierung von Sox2-positiven Zellen. In der Tat nahm der Anteil Sox2-positiver Zellen über fünf Tage sogar zu (Abb. 69 und Abb. 70). Somit schienen die Veränderungen im Sox2-Level eher auf eine generelle Regulierung der Sox2-Expression hinzudeuten als mit einer Eliminierung oder Anreicherung Sox2-positiver Zellen zu korrelieren.



Abb. 70: Nestin- und Sox2-Expression in T1495 nach Einfach- und Doppelbehandlung. Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α -Sox2 (rot) und α Nestin (grün) von behandelten Kulturen bzw. korrespondierenden Kontrollen (DMSO). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Für die Quantifizierung wurden stark und moderat Sox2-positive Zellkerne (weiße Pfeile) und nicht schwach positive bzw. negative Zellkerne (hellblaue Pfeile) berücksichtigt. Für die Anzahl Nestin-positiver Zellen wurden moderat bis stark positive Zellen (hellgelbe Pfeile) und nicht schwach positive Zellen (hellrote Pfeile) quantifiziert. Messbalken, 50 μ m. – d, Tag; DMSO, Dimethylsulfoxid; Sox2, sex determining region Y-box 2.

In mit 100 μ M TMZ behandelten Kulturen der p53_{mut}-Linie T1447 cl4 nahm die Sox2-Expression innerhalb von 6 h relativ zur Kontrolle um 60% zu (Abb. 68). Von 6 h bis zum Tag d4 sank die Sox2-Expression auf ein Level, das sich kaum von der kontrollbehandelten Kultur unterschied (-15%). Dieser transiente Anstieg könnte durch eine Veränderung der Sox2-Expression an sich oder durch eine Veränderung der Anzahl Sox2-positiver Zellen bedingt sein. In der Tat war ein Anstieg des Anteils Sox2-positiver Zellen in den mit 100 μ M TMZ behandelten Kulturen bis zum Tag d3 festzustellen, gefolgt von

einer Reduktion am Tag d5 (Abb. 69). Allerdings nahm auch der Anteil Sox2-positiver Zellen in der Kontrolle über fünf Tage zu und verlief, mit Ausnahme vom Tag d3 und d4, parallel zur Zunahme Sox2positiver Zellen in den TMZ-behandelten Kulturen. (Der Anteil Sox2-positiver Zellen am Tag d3 nach TMZ-Behandlung ist nicht valide, da nur sehr wenige Zellen in den behandelten Kulturen detektiert wurden.) Somit schienen die Veränderungen des Sox2-Levels in der Western blot-Analyse eher auf eine Regulierung der Sox2-Expression zurückzuführen zu sein als auf eine Selektion Sox2-positiver Zellen. Nach der Bestrahlung mit 5 Gy nahm das Sox2-Level nach 6 h nur geringfügig zu (+20% relativ zur Kontrolle), wies jedoch von 6 h bis zum Tag d1 eine starke Reduktion der Sox2-Expression auf (-50%; Abb. 68). Bis zum Tag d2 war eine weitere Abnahme des Sox2-Levels zu beobachten (-30%), während am Tag d3 das Sox2-Level erneut um 65% zunahm und somit 25% geringer war als in der kontrollbehandelten Kultur. Aufgrund der zu geringen Materialmengen konnte die Sox2-Expression an den Tagen d4 und d5 nicht ermittelt werden. Die deutliche Reduktion des Sox2-Levels kann auf eine generelle Senkung des Stammzellcharakters oder eine Eliminierung Sox2-positiver Zellen hindeuten. Da die Bestrahlung der Kulturen für die immunzytochemische Analyse zwei Tage früher stattfand als die Behandlung mit TMZ bzw. die Kontrollbehandlung, entspricht Tag d1 der immunzytologischen Analyse dem Tag d3 in Extrakten der Western blot-Analyse. Da jedoch die Western blot-Analysen nur mit Extrakten bis zum Tag d3 möglich waren, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden, ob die transiente Abnahme der Sox2-Expression mit einer Eliminierung Sox2-positiver Zellen korrelierte. Allerdings ist der Anteil Sox2-positiver Zellen am Tag d1 geringfügig höher als in der Kontrolle, wohingegen am Tag d3 der Western blot-Analyse die Sox2-Expression nach Bestrahlung etwas geringer war (vergleiche Abb. 68 Tag d3 und Abb. 69 Tag d1). In Extrakten der doppelbehandelten Kulturen ähnelte die Sox2-Expression bis zum Tag d1 dem Profil nach alleiniger TMZ-Behandlung (Abb. 68). So war ein 55% iger Anstieg der Sox2-Expression relativ zur Kontrolle innerhalb von 6 h zu verzeichnen, gefolgt von einer geringfügigen Senkung bis zum Tag d1 (-15%). Allerdings sank im Fall der Doppelbehandlung das Sox2-Level vom Tag d1 zum Tag d2 transient (-40%), stieg bis zum Tag d3 auf das Level der kontrollbehandelten Kultur und blieb bis zum Tag d4 unverändert. Die eher geringen Variationen des Sox2-Levels innerhalb von vier Tagen nach der Doppelbehandlung deuten eher auf eine Regulierung der Sox2-Expression als auf eine Selektion Sox2-positiver Zellen hin. In der Tat nahm der Anteil Sox2-positiver Zellen über vier Tage sogar zu (Abb. 69). Somit schien die Behandlung mit TMZ und/oder Bestrahlung eher die Sox2-Expression zu beeinflussen als zu einer Selektion Sox2positiver Zellen zu führen.

Im Fall der p53-Mutante T1452 cl10 wurde die Sox2-Expression innerhalb von 6 h nach der Behandlung mit 100 µM TMZ um 55% gesteigert, sank jedoch bis zum Tag d2 auf das Niveau der Kontrolle und blieb über die nächsten drei Tage unverändert (Abb. 68). Während die Anzahl Sox2-positiver Zellen in den kontrollbehandelten Kulturen über fünf Tage nahezu konstant blieb, nahm der Anteil Sox2-positiver Zellen nach der Behandlung mit 100 µM TMZ ab (am Tag d4: von 94% in der Kontrolle auf 80% nach der TMZ-Behandlung; Abb. 69). Nach der Bestrahlung mit 5 Gy sank das Sox2-Level innerhalb von 6 h geringfügig (-25% relativ zur Kontrolle) und variierte bis zum Tag d3 kaum (Abb. 68). Vom Tag d3 zum Tag d4 stieg die Sox2-Expression um 55% an und nahm bis zum Tag d4 weiter zu (+35%). Während die Sox2-Expression ab Tag d3 zunahm, sank der Anteil Sox2-positiver Zellen nach der Bestrahlung (am Tag d4: von 94% in der Kontrolle auf 82% nach Bestrahlung; Abb. 69), was auf eine Zunahme der Sox2-Expression in den Zellen hindeutet. Die Doppelbehandlung führte, ähnlich wie die Bestrahlung, zu einer geringen Reduktion des Sox2-Levels bis zum Tag d3, gefolgt von einer Zunahme der Sox2-Expression bis zum Tag d5 (Abb. 68). Allerdings fiel der Anstieg im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung geringer aus (relativ zur Kontrolle: nach Bestrahlung +60%, nach Doppelbehandlung +25%). Wie nach den Einfachbehandlungen nahm der Anteil Sox2-positiver Zellen auch nach der Doppelbehandlung über fünf Tage ab (Abb. 69). Somit induzierten sowohl TMZ als auch die Bestrahlung eine geringe Reduktion
des Anteils Sox2-positiver Zellen und führten zu einer Variation der Sox2-Expression, die nicht mit der Abnahme der Anzahl Sox2-positiver Zellen korrelierte.

Fazit – Sox2 in SLGC-Linien und Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung

Bei den zwei SLGC-Linien T1440 und T1442-R248W zeigte sich eine nahezu lineare Zunahme der Sox2-Proteinexpression über fünf Tage. Diese wurde für T1440 nach der Einfachbehandlung mit 100 µM TMZ und 5 Gy beobachtet (Doppelbehandlungsdaten von d4 und d5 fehlen wegen Materialproblemen) und betrug das 2,5-Fache (100 µM TMZ) bzw. 3,5-Fache (5 Gy). Ob dies mit einer Zunahme Sox2positiver Zellen auf Einzelzellniveau assoziiert war, wurde nicht bestimmt. Für T1442-R248W wurde das maximale Sox2-Level am Tag d4 (100 μM TMZ, 5 Gy/100 μM TMZ) bzw. Tag d5 (5 Gy) gemessen. Die Zunahme der Sox2-Expression im Western blot war jedoch mit einer geringen Senkung der Anzahl Sox2-positiver Zellen (100 μM: 16%; 5 Gy: 10%; 5 Gy/100 μM: 15%) assoziiert. Die p53-Mutante T1495-R273H zeigte einen transienten Anstieg der Sox2-Expression mit einem sehr deutlichen Peak nach der Bestrahlung und Doppelbehandlung (5 Gy/d2: 2-fach; 5 Gy/100 µM/d1: 2-fach) und einem weniger klaren Maximum nach der TMZ-Einfachbehandlung (100 μM/d1: 85%). Die Peaks korrelierten nur bedingt mit einer Zunahme des Anteils Sox2-positiver Zellen in den Kulturen. Für die p53_{mut}-Linie T1371-R175H wurde in der Western blot-Analyse lediglich eine Steigerung des Sox2-Levels am Tag d1 nach der TMZ-Behandlung detektiert, nicht aber nach Bestrahlung oder Doppelbehandlung. Auf Einzelzellniveau wurde sogar eine Abnahme der Anzahl Sox2-positiver Zellen, insbesondere in Anwesenheit von TMZ, verzeichnet. Im Fall von T1447 cl4-N239D nahm die Sox2-Proteinexpression nach Behandlung mit TMZ bzw. Doppelbehandlung transient zu (Maximum nach 6 h; TMZ: +60%, Doppelbehandlung: 55%), während nach alleiniger Bestrahlung eine transiente Reduktion zu beobachten war (Minimum am Tag d2: -55%). Auf Einzelzellniveau nahm die Anzahl Sox2-positiver Zellen nach jeder Behandlung (sogar nach der Kontrollbehandlung) zu. Das Sox2-Level der p53_{mut}-Linie T1452 cl10 stieg 6 h nach der Behandlung mit TMZ transient an (+55%), wohingegen die bestrahlten und die doppelbehandelten Kulturen ab Tag d4 eine Zunahme der Sox2-Expression aufwiesen. Der Anstieg des Sox2-Levels fiel nach der Doppelbehandlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung geringer aus (5 Gy/d5: +60%; 5 Gy+100 µM TMZ: +25%). Die Peaks korrelierten nicht mit einer Zunahme Sox2-positiver Zellen. So sank sogar der Anteil Sox2-positiver Zellen geringfügig nach der Behandlung mit TMZ und/oder Bestrahlung (100 μM: 9%; 5 Gy: 10%; 5 Gy/100 μM: 20%). Im Fall der p53_{WT}-Linie T1522 wurde eine transiente Steigerung des Sox2-Proteinlevels am Tag d2 festgestellt, die nur nach Bestrahlung deutlich erkennbar war. Ob das mit Veränderungen auf Einzelzellniveau assoziiert war, wurde nicht geprüft.

4.2.9. Auswirkung der Radio- und Chemotherapie auf die Anzahl Nestin-positiver Zellen

Die Untersuchung der Sox2-Expression auf Einzelzellniveau erfolgte als Doppelfärbung in Anwesenheit eines zweiten Primärantikörpers (α Nestin; siehe Auswahl an Mikrofotographien in Abb. 70 und Abb. 88 im Anhang). Das Intermediärfilament Nestin ist ein Marker für unreife, neurale Zellen und undifferenzierte Gliomzellen (Chen et al., 2010; Choschzick et al., 2014; Michalczyk and Ziman, 2005) und sollte in dieser Arbeit weitere Hinweise auf die Effekte der Radio- und Chemotherapie auf SLGC-Linien geben. Die SLGC-Linien T1371-R175H, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1452 cl10-*splice*-Mutante und T1495-R273H wurden mit 5 Gy bestrahlt, am Folgetag in *chamber slides* plattiert und wiederum am nächsten Tag mit TMZ (EC₅₀) behandelt. Die Anzahl der Nestin-positiven Zellen wurde für alle SLGC-Linien in denselben Mikrofotografien ermittelt, die zuvor auf die Anwesenheit von Sox2positiven Zellen untersucht worden waren.

In den T1371-Kulturen lag der Anteil Nestin-positiver Zellen bei fast 100% (Abb. 71). In den Kontrollen änderte sich daran über fünf Tage nichts. Die Behandlung mit 200 μM TMZ führte dagegen am Tag d1 zu einer Reduktion des Anteils Nestin-positiver Zellen auf 86%. Der Anteil Nestin-positiver Zellen nahm bis zum Tag d4 kontinuierlich ab (d2: auf 69%, d3: auf 59%, d4: auf 35%). Vom Tag d4 bis zum Tag d5 sank der Anteil Nestin-positiver Zellen nicht weiter (d5: 37%). Die Bestrahlung mit 5 Gy induzierte dagegen keine progressive Senkung des Anteils Nestin-positiver Zellen. Zwar nahm der Anteil Nestinpositiver Zellen innerhalb der ersten 24 h Stunden nach der Bestrahlung von 100% auf 87% ab, variierte dann aber bis zum Tag d5 nur noch um ± 5%. Der Effekt der Doppelbehandlung erschien als eine Summe der Einzeleffekte. So nahm der Anteil Nestin-positiver Zellen über fünf Tage progressiv ab, der Verlauf unterschied sich aber von dem der Einzelbehandlung. Zunächst wurde der Anteil Nestinpositiver Zellen innerhalb des ersten Tages auf 82% (d1) reduziert. Bis zum Tag d2 nahm der Anteil weiter auf 64% ab und am Tag d3 betrug der Anteil Nestin-positiver Zellen 68%. Danach sank der Anteil bis zum Tag d4 auf 28% und lag am Tag d5 wieder deutlich höher (d5: 54%). Damit waren die Verläufe der Anzahl Sox2- und Nestin-positiver Zellen ähnlich. Sowohl die Anzahl Sox2-positiver als auch die Anzahl Nestin-positiver Zellen zeigte nach TMZ-Behandlung eine progressive Senkung über fünf Tage, während die alleinige Bestrahlung mit 5 Gy nahezu keinen Effekt hatte. Allerdings sank die Anzahl Sox2-positiver Zellen nach der Doppelbehandlung stärker als die Anzahl Nestin-positiver Zellen (vergleiche Abb. 69 und Abb. 71).

Im Fall der T1442-Linie waren in der Kultur nahezu 100% der Zellen Nestin-positiv (Abb. 71). Während sich der Anteil Nestin-positiver Zellen in der Kontrolle über fünf Tage nicht veränderte, sank die Anzahl positiver Zellen nach der Behandlung mit 100 μM TMZ. So nahm der Anteil positiver Zellen bis zum Tag d2 nur geringfügig ab (von 99% in der Kontrolle auf 92% nach TMZ-Behandlung), wurde jedoch bis zum Tag d3 deutlich stärker reduziert (d3: 75%). Vom Tag d3 bis zum Tag d4 fiel die Anzahl Nestin-positiver Zellen weiter (d4: 51%) und stieg bis zum Tag d5 geringfügig an (d5: 59%). Hingegen variierte der Anteil Nestin-positiver Zellen nur gering in mit 5 Gy bestrahlten Kulturen und lag zwischen 96% (d1) und 89% (d2, d5). Die Doppelbehandlung induzierte eine progressive Reduktion Nestin-positiver Zellen. Dabei war der Anteil Nestin-positiver Zellen erst ab dem Tag d2 deutlich reduziert (d2: 85%) und nahm über die nächsten drei Tage kontinuierlich ab (d3: auf 65%, d4: auf 48%, d5: auf 21%), sodass die Anzahl Nestin-positiver Zellen am Tag d5 nach der Doppelbehandlung deutlich stärker reduziert war als nach der TMZ-Einfachbehandlung (TMZ: 59%, Doppelbehandlung: 21%). Während die Anzahl Nestinpositiver Zellen nach der TMZ-Behandlung über vier Tage um die Hälfte reduziert wurde, nahm der Anteil Sox2-positiver gleichzeitig nur um ein Sechstel ab. Ähnliches konnte in doppelbehandelten Kulturen beobachtet werden. Allerdings fiel der Anteil Nestin-positiver deutlich stärker (auf ein Fünftel), während die Anzahl Sox2-positiver Zellen in Anwesenheit von TMZ nach Einfach- und Doppelbehandlung nahezu identisch war. Im Vergleich dazu hatte die Bestrahlung mit 5 Gy nur einen gingen Effekt auf die Anzahl an sowohl Nestin- als auch Sox2-positiven Zellen (vergleiche Abb. 69 und Abb. 71).

In Kulturen der T1495-Linie lag der Anteil Nestin-positiver Zellen bei nahezu 100% (Abb. 71). In der kontrollbehandelten Kultur nahm die Anzahl Nestin-positiver Zellen bis zum Tag d3 um 10% ab, fiel über die nächsten zwei Tage allerdings nicht weiter. Im Vergleich dazu sank der Anteil Nestin-positiver Zellen nach der Behandlung mit 100 µM TMZ am Tag d1 geringfügig (d1: 91%) und nahm bis zum Tag d2 weiter ab (d2: 73%). Während am Tag d3 ein geringer Anstieg zu beobachten war (d3:84%), war der Anteil Nestin-positiver Zellen bis zum Tag d4 wieder gesunken (d4: 74%), gefolgt von einer weiteren Abnahme vom Tag d4 bis zum Tag d5 auf 63%. Im Vergleich dazu führte die Bestrahlung mit 5 Gy, ähnlich wie die Kontrollbehandlung, nur zu einer geringen Senkung der Anzahl Nestin-positiver Zellen. In den bestrahlten Kulturen nahm die Anzahl Nestin-positiver Zellen bis zum Tag d4 erneut geringfügig an (d4: 89%). Am Tag d5 nach der

Bestrahlung waren 84% der Zellen Nestin-positiv. In den doppelbehandelten Kulturen sank der Anteil Nestin-positiver Zellen bereits nach einem Tag leicht (d1: 89%), gefolgt von einer starken Reduktion bis zum Tag d3 (d2: 73%; d3: 54%). Während bis zum Tag d4 der Anteil Nestin-positiver Zellen transient anstieg (d4: 74%), war der Anteil am Tag d5 wieder geringer (d5: 57%). Sowohl nach der TMZ-Einfachbehandlung als auch nach der Doppelbehandlung nahm die Anzahl Nestin-positiver Zellen über fünf Tage ähnlich stark ab, während sich im gleichen Zeitraum der Anteil Sox2-positiver Zellen in den Kulturen verdoppelte. Im Gegensatz dazu war nach der Bestrahlung mit 5 Gy nur eine geringe Senkung der Anzahl Nestin-positiver Zellen festzustellen und der Anteil Sox2-positiver Zellen nahm über fünf Tage nur geringfügig zu (vergleiche Abb. 69 und Abb. 71).



Abb. 71: Anteil Nestin-positiver Zellen in SLGC-Kulturen nach Behandlung mit Temozolomid (EC₅₀) und/oder Bestrahlung mit 5 Gy. Die Anzahl Nestin-positiver Zellen wurde auf zehn repräsentativen Mikrofotografien ausgezählt, die unter den im Labor empirisch ermittelten Expositionszeiten aufgenommen wurden. Bei der Bestimmung des Anteils Nestin-positiver Zellen wurden moderat bis stark Nestin-positive Zellen berücksichtigt. Die Bestimmung der Expressionsstärke erfolgte im Vergleich zu Referenzaufnahmen des Labors (nicht gezeigt). Aufgetragen wurde der prozentuale Anteil Nestin-positiver Zellen. Da insbesondere nach Doppelbehandlungen die Präparate reduzierte Zellzahlen aufweisen und Areale mit wenigen und vielen Zellen vorkommen, wurde der systematische Fehler von 10% und nicht die Variation der Zellzahl angegeben. Aus den gleichen Gründen wurde keine statistische Analyse durchgeführt. – d, Tag; TMZ, Temozolomid-Behandlung mit EC₅₀; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, 5 Gy/EC₅₀ Temozolomid. In Kulturen des Klons T1447 cl4 waren fast alle Zellen Nestin-positiv (Abb. 71). In den Kontrollkulturen blieb der Anteil zunächst über drei Tage unverändert und sank vom Tag d3 bis zum Tag d4 um 10%, jedoch bis zum Tag d5 nicht weiter. Die Behandlung mit 100 µM TMZ führte innerhalb von 24 Stunden zu einer geringfügigen Reduktion des Anteils Nestin-positiver Zellen, gefolgt von einer deutlichen Abnahme innerhalb der nächsten 24 Stunden (d2: 58%). Vom Tag d2 bis zum Tag d3 stieg der Anteil Nestin-positiver Zellen wieder drastisch an (d3: 100%), verblieb auf diesem hohen Level und sank vom Tag d4 bis zum Tag d5 auf 74%. (Es ist zu beachten, dass in den TMZ-behandelten Kulturen nur eine geringe Zellzahl detektiert und somit ausgewertet wurde.) Im Vergleich dazu reduzierte sich der Anteil Nestin-positiver Zellen bis zum Tag d2 nach der Bestrahlung mit 5 Gy nur gering (d2: 85%) und wies über die folgenden drei Tage keine weiteren Veränderungen auf. Die Doppelbehandlung zeigte in den ersten drei Tagen ein ähnliches Profil wie die Einfachbehandlung mit TMZ. So sank die Anzahl Nestinpositiver Zellen innerhalb des ersten Tages gering (d1: 91%), gefolgt von einer weiteren, starken Reduktion bis zum Tag d2 (64%) und einer erneuten Zunahme Nestin-positiver Zellen vom Tag d2 zu d3. Allerdings sank der Anteil Nestin-positiver Zellen bis zum Tag d4 erneut transient (71%) und erreichte am Tag d5 nach der Doppelbehandlung wieder 90%. Die Behandlung mit TMZ und/oder Bestrahlung senkte den Anteil Nestin-positiver Zellen über fünf Tage nur gering, ähnlich stark wie die Kontrollbehandlung, während im gleichen Zeitraum die Anzahl Sox2-positiver Zellen um das 4-Fache nach den Einfachbehandlungen und sogar um das 5,5-Fache nach der Doppelbehandlung zunahm, allerdings ebenfalls in der Kontrollkultur (4-fach). Nur am Tag d2 war der Anteil Nestin-positiver Zellen in Anwesenheit von TMZ deutlich geringer als in der Kontrolle oder der bestrahlten Kultur (vergleiche Abb. 69 und Abb. 71).

Im Fall des Klons T1452 cl10 war die gesamte Kultur Nestin-positiv (Abb. 71). Während der Anteil Nestin-positiver Zellen in den kontrollbehandelten Kulturen über fünf Tage nahezu konstant blieb, war der Anteil in Kulturen, die mit 100 µM TMZ behandelt wurden, am Tag d2 geringfügig gesunken (d2: 91%). Bis zum Tag d4 nahm die Anzahl Nestin-positiver Zellen weiter ab (d4: 83%), sank am Folgetag jedoch nicht weiter. Die Bestrahlung mit 5 Gy führte zu einer minimalen Reduktion Nestin-positiver Zellen innerhalb eines Tages (d1: 94%). Vom Tag d2 bis zum Tag d3 sank der Anteil Nestin-positiver Zellen erneut geringfügig (d2: 95%; d3: 86%) und variierte über die nächsten zwei Tage um maximal 5%. In den doppelbehandelten Kulturen sank der Anteil Nestin-positiver Zellen bereits am Tag d1 um 11% (d1: 89%). Während die Anzahl Nestin-positiver Zellen am Tag d2 nur minimal gestiegen war (d2: 94%), war vom Tag d2 zu d3 eine starke Senkung zu beobachten (d3: 74%). Bis zum Tag d4 nahm die Anzahl Nestin-positiver Zellen transient zu (d4: 83%) und fiel bis zum Tag d5 auf 67%. Somit waren nach der Doppelbehandlung deutlich weniger Zellen Nestin-positiv als nach den Einzelbehandlungen. (Es ist zu beachten, dass im Fall der doppelbehandelten Kulturen am Tag d1 die Zellzahl sehr gering war und somit der Wert der Quantifizierung nicht valide ist.) Sowohl die Anzahl Nestin- als auch Sox2positiver Zellen nahm nach den Einfachbehandlungen und der Doppelbehandlung über fünf Tage ab. Dabei sanken die Anteile Nestin- und Sox2-positiver Zellen nach der Doppelbehandlung nur geringfügig stärker (vergleiche Abb. 69 und Abb. 71).

Zelllinie	Behand-	Kontrolle (d1)	(d1) d1 d2 d3 d4		d4	d5	Sox2+/Ne+	
	lung	Sox2+/Ne+						(d5)
T1371-R175H	TMZ	96% / 98%	ת/ע	ב/ב	$\rightarrow/$ \bowtie	\downarrow/\downarrow	\uparrow/\rightarrow	68% / 37%
	RT	96% / 98%	א/א	⊅/→	⊿/→	arphi/ ightarrow	⊅/→	91% / 84%
	RT+TMZ	96% / 98%	$\downarrow/$	$\rightarrow/$ \bowtie	ee	ע/⊾	\rightarrow / \nearrow	29% / 54%
T1442-R248W	TMZ	96% / 99%	$\rightarrow / \rightarrow$	$\rightarrow/$	ר/ר	ב/ב	$\nabla/2$	78% / 59%
	RT	96% / 99%	$\rightarrow / \rightarrow$	$\rightarrow/$	$\rightarrow / \rightarrow$	ee/ $ ightarrow$	\mathbb{A}/\mathbb{A}	84% / 89%
	RT+TMZ	96% / 99%	ee	$\rightarrow/$	$\rightarrow/$	$\rightarrow/$	ב/ב	79% / 21%
T1447 cl4-N239D	TMZ	16% / 96%	$\rightarrow/$	7/↓	\uparrow/\uparrow	$\rightarrow / \rightarrow$	ע/ע	61% / 74%
	RT	16% / 96%	∕∕→	ב/ב	\wedge/\rightarrow	\wedge/\rightarrow	$\rightarrow / \rightarrow$	68% / 85%
	RT+TMZ	16% / 96%	Z/7	⊿/√	∕/∕	\square/\square	$\rightarrow / 7$	87% / 90%
T1452 cl10-splice-	TMZ	100% / 100%	\rightarrow/\rightarrow	א/א	ר/ב	$\rightarrow / \rightarrow$	$\rightarrow / \rightarrow$	88% / 84%
Mutante	RT	100% / 100%	$\rightarrow/$	$\rightarrow / \rightarrow$	$\rightarrow/$	$\rightarrow / 7$	arphi/ ightarrow	87% / 90%
	RT+TMZ	100% / 100%	$\rightarrow/$	<u>א</u> /א	א/א	7/7	ב/ב	77% / 67%
T1495-R273H	TMZ	11% / 97%	$\rightarrow/$	צ/א	ב/ע	$\rightarrow/$	Z/2	23% / 63%
	RT	11% / 97%	$\rightarrow / \rightarrow$	$\rightarrow / \rightarrow$	$\rightarrow/$	$\rightarrow / 7$	\nearrow/\rightarrow	14% / 84%
	RT+TMZ	11% / 97%	$\rightarrow/$	Z/7	$\rightarrow/$	$\rightarrow / 7$	$\rightarrow/$	22% / 57%

Tab. 17: Effekt der Behandlung mit Temozolomid und/oder Bestrahlung auf den Anteil Sox2- und Nestin-positiver Zellen in SLGC-Linien

Sox2+, Anteil Sox2-positiver Zellen; Ne+, Anteil Nestin-positiver Zellen; dx, Tag x nach Behandlung; TMZ, Temozolomid [EC₅₀]; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung; R175H, Arginin 175 durch Histidin ersetzt; R273H, Arginin 273 durch Histidin ersetzt; R248W, Arginin 248 durch Tryptophan ersetzt; N239D, Asparagin 239 durch Aspartat ersetzt; Sox2, *sex determining region Ybox* 2. Änderung des Anteils positiver Zellen: \rightarrow , < 5%; \nearrow , \searrow , \ge 5%; \uparrow , \downarrow , >30%.

Fazit – Sox2- und Nestin-positive Zellen in SLGC-Linien und Klonen nach Einfach- und Doppelbehandlung Die Änderungen in der Anzahl Sox2- und Nestin-positiver Zellen korrelierten (siehe Tab. 17) nur in einigen SLGC-Linien. Es zeigte sich, dass die Senkung der Anzahl Sox2-positiver Zellen im Fall von T1371-R175H (TMZ allein (68%) und Doppelbehandlung (29%)) mit einer Senkung der Anzahl Nestinpositiver Zellen assoziiert war (TMZ allein (37%); Doppelbehandlung (54%)). Im Fall von T1442-R248W nahm die Anzahl Sox2-positiver Zellen nach allen Behandlungen über fünf Tage geringfügig ab (um 10% (Bestrahlung allein), 15% (Doppelbehandlung), 16% (TMZ allein)). Die Anzahl Nestin-positiver Zellen nahm dagegen sehr viel deutlicher ab, aber nur in Anwesenheit von TMZ (TMZ allein auf 59%; Doppelbehandlung auf 21%). Die T1495-R273H-Kulturen zeigten tendenziell eine transiente (Einfachbehandlung mit TMZ (2-fach) und Bestrahlung (ein Viertel)) oder progressive Zunahme der Anzahl Sox2-positiver Zellen (Doppelbehandlung 2-fach). Dabei nahm die Anzahl Nestin-positiver Zellen jedoch progressiv ab und war am Tag d5 in den Kulturen mit TMZ deutlich gesunken (TMZ allein: 63%; Doppelbehandlung: 57%). Kulturen des Klons T1447 cl4-N239D zeigten, unabhängig von der Behandlung, eine Zunahme der Anzahl Sox2-positiver Zellen, wobei der Anstieg im Fall der Doppelbehandlung am stärksten ausfiel (Doppelbehandlung: 5,5-fach; Kontrollbehandlung und Einzelbehandlungen: 4-fach). Gleichzeitig war eine Abnahme der Anzahl Nestin-positiver Zellen festzustellen, die im Fall der TMZ-Einfachbehandlung am stärksten war (TMZ allein: 74%; Bestrahlung allein: 85%; Doppelbehandlung: 90%). Im Fall des Klons T1452 cl10 war nach den Einfachbehandlungen eine geringe Senkung der Anzahl Sox2-positiver Zellen mit einer ähnlich starken Senkung der Anzahl Nestin-positiver Zellen assoziiert (Sox2/Nestin: TMZ, 88%/84%; Bestrahlung, 87%/90%). Nur nach der Doppelbehandlung nahm war die Anzahl Nestin-positiver Zellen geringfügig stärker reduziert (Sox2/Nestin: 77%/67%).

4.2.10. Charakterisierung überlebender SLGCs nach Behandlung mit Temozolomid oder Bestrahlung

Die Untersuchungen zum Anteil überlebender CD133-, Sox2- und Nestin-positiven Zellen wurden in den bisher beschriebenen Analysen nur bis zum Tag d5 nach den Behandlungen durchgeführt. Um zu untersuchen, welche Zelltypen die Behandlung längerfristig überleben, wurden ausgewählte Zelllinien (T1495-R273H, T1452 cl10-*splice*-Mutante und T1447 cl4-N239D) nach der Behandlung weiter kultiviert und klonal expandiert. Es wurde die Expression von Sox2 mittels Western blot-Analyse bestimmt. In die Analyse wurden zusätzlich zwei Marker einbezogen (FABP7 und PAX6), die für die Charakterisierung von SLGCs im ersten Teil der Arbeit eingesetzt worden waren. Die Kontrollbehandlung der Zellkulturen erfolgte mit 1% DMSO, da dies als Lösungsmittel für die Behandlung mit TMZ diente. Da sowohl die TMZ-behandelten als auch die mit 5 Gy bestrahlten Zellkulturen 1% DMSO enthielten, wurden zur Kontrolle Klone der Kontrollbehandlung mit DMSO in die Analyse einbezogen.

Von den behandelten T1495-Zellen wurden nach Bestrahlung mit 5 Gy und der Kontrollbehandlung Klone gewonnen, die sich in vitro über mehr als acht Wochen stabil vermehren ließen. Sieben Klone (RT1 – RT7), die sich von bestrahlten Kulturen ableiten, und zwei Klone der Kontrollbehandlung mit dem Lösungsmittel DMSO (D1, D3) wurden auf die Expression von FABP7 und PAX6 untersucht. Die T1495-R175H-Klone, die die Bestrahlung überlebten (RT1 – RT7), variierten stark in ihrer FABP7-Expression und wiesen relativ zu den Klonen D1 und D3 eine geringere FABP7-Expression auf (Abb. 72 A, links). Hierbei war die FABP7-Expression der RT-Klone relativ zum Klon D1 zwischen 35% (RT1, RT4) und 100% (RT7) geringer. Der Klon D1 wies das gleiche FABP7-Level wie die unbehandelte Kultur auf, während die FABP7-Expression im Klon D3 um 35% höher war. Die PAX6-Expression variierte dagegen zwischen den RT- und D-Klonen nur wenig und die Unterschiede zwischen den Expressionslevel der RT-Klone untereinander waren größer als die zwischen den Kontroll- (D-) und RT-Klonen. Das PAX6-Level des Klons D1 wich nicht von dem der unbehandelten Kultur ab, das von Klon D3 war geringfügig reduziert (-15%; Abb. 72 A, rechts). Die RT-Klone zeigten eine etwas geringere (Klone RT2, RT3, RT5, RT6, RT7) oder eine etwas höhere (Klon RT4) PAX6-Expression als der Klon D1. In keinem der Klone konnte mittels Western blot Sox2 detektiert werden, wenn 15 µg Proteinextrakt pro Spur aufgetrennt wurden (nicht gezeigt).

Im Fall des Klons T1452 cl10 wurden zwei Klone gewonnen, die sich von überlebenden Zellen der Kontrollbehandlung ableiten (D1, D2), und ein Klon (RT1) aus der bestrahlten Kultur. Diese Klonkulturen ließen sich *in vitro* über mehr als acht Wochen stabil expandieren. Sowohl die Klone D1 und D2 als auch der Klon RT1 wiesen eine Sox2-Expression auf (Abb. 72 B). Dabei war das Sox2-Level des Klons D2 relativ zum Klon D1 um 25% geringer, während die Sox2-Expression im Fall des Klons RT1 relativ zum Klon D1 nur etwa die Hälfte betrug (-45%). Das FABP7-Level des Klons D2 war relativ zum Klon D1 20% höher, während der Klon RT1 ein Drittel weniger FABP7 als der Klon D1 exprimierte.

Im Gegensatz zu T1495 und T1452 cl10 wurden im Fall des Klons T1447 cl4 die überlebenden Zellen nicht klonal expandiert, sondern die Gesamtheit der überlebenden Zellen über mehr als acht Wochen stabil vermehrt. Dabei wurden zwei Kulturen gewonnen, eine, die sich von den überlebenden Zellen der Kontrollbehandlung (Σ D) ableitet, und eine zweite, die nach der Behandlung mit 100 μ M TMZ expandierte (Σ TMZ). Das Sox2-Level der Σ D-Kultur war nur sehr schwach, wohingegen die Σ TMZ-Kultur eine deutlich stärkere Sox2-Expression aufwies (5,5-fach höher; Abb. 72 C). Im Vergleich dazu war das FABP7-Level im Fall der Σ TMZ-Kultur relativ zur Σ D-Kultur nur etwas höher (25%).



Abb. 72: Expression stammzellassoziierter Proteine in Klonen, die sich von den Zellen ableiten, die die Bestrahlung oder Temozolomid-Behandlung überlebten. Die Expression von FABP7, PAX6 und Sox2 wurde gegen die Expression der Ladekontrolle Aktin normalisiert. Der systematische Fehler von 10% ist angegeben. (A) überlebende T1495-Klone, (B) überlebende Klone von T1452 cl10, (C) überlebende Kulturen vom Klon T1447 cl4. – unb., unbehandelt; D, Klon, der nach Kontrollbehandlung mit DMSO (Dimethylsulfoxid) expandiert wurde; RT, Klon, der nach Bestrahlung mit 5 Gy expandiert wurde; FABP7, *fatty acid binding protein* 7; PAX6, *paired-box protein* 6; Sox2, *sex determining region Y-box* 2; Σ D, Kultur, die nach Behandlung mit DMSO expandiert wurde; STMZ, Kultur, die nach Behandlung mit 100 μ M Temozolomid expandiert wurde.

Fazit – Stammzellcharakter überlebender SLGCs

Die Klone, die die Bestrahlung mit 5 Gy überlebten, zeigten keine bzw. eine reduzierte Sox2-Expression und ein reduziertes FABP7-Expressionslevel. Dagegen war das PAX6-Level ähnlich dem der Kontrollen und der unbehandelten Kultur. Somit ergab die Western blot-Analyse von die Bestrahlung überlebenden Zellen keine Hinweise auf eine Steigerung des Stammzellcharakters. Allerdings war sowohl das Sox2- als auch das FABP7-Level in der T1447 cl4-Kultur, die nach der Behandlung mit 100 µM TMZ expandiert wurde, höher als in der kontrollbehandelten Kultur, was auf einen Anstieg des Stammzellcharakters nach TMZ-Behandlung hindeuten könnte.

5. Diskussion

Das Glioblastom (GBM) gehört zu den häufigsten, primären Gehirntumoren, das trotz bestmöglicher Resektion sowie adjuvanter Radio- und Chemotherapie mit alkylierenden Agenzien eine sehr schlechte Prognose aufweist (Ostrom et al., 2014; Stupp et al., 2005). Für das Therapieversagen werden unter anderem Gliomstammzellen, hier als stammzellähnliche Gliomzellen (SLGCs) bezeichnet, verantwortlich gemacht (Beier et al., 2011; Huse und Holland, 2010; Schonberg et al., 2014). Im Tumorstammzellkonzept bilden die Tumorstammzellen die Spitze einer Hierarchie von genetisch identischen Tumorzellen, die sich ausschließlich transkriptionell und epigenetisch unterscheiden (Beck und Blanpain, 2013). Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Frage bearbeitet, ob sich SLGCs verschiedener Patienten unterscheiden und ob es innerhalb eines Tumors zu einer zellulären Hierarchie und möglicherweise klonalen Evolution von Gliomzellen kommt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob sich verschiedene SLGC-Linien und abgeleitete Klone in ihrer Sensitivität gegenüber der Behandlung mit Photonenstrahlung und dem alkylierenden Agens Temozolomid (TMZ) unterscheiden.

Um die Frage der Hierarchie und klonalen Evolution zu klären, wurden phänotypisch verschiedene, primäre SLGC-Linien in serumfreiem Medium kultiviert und von diesen mittels *limited dilution* Klone gewonnen. Die primären SLGC-Linien stammen aus humanen GBMs und wurden im Labor etabliert (Choschzick et al., 2014). Die Klone wurden ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe, zum Teil von mir, gewonnen und expandiert. Zur Charakterisierung der SLGC-Linien und abgeleiteten Klone habe ich vor allem immunzytochemische und qRT-PCR-Analysen sowie Western blots durchgeführt. Daneben kamen Zellsortierung, Immunhistologie und methylierungsspezifische PCR (MSP) zum Einsatz. Einerseits sollte geklärt werden, ob und welche Stammzellfaktoren in den SLGC-Mutterkulturen und Klonen exprimiert werden und ob es Hinweise auf eine zelluläre Hierarchie gibt (5.1). Weiterhin sollte ermittelt werden, ob sich die Klone ein und derselben Mutterkultur in Hinblick auf deregulierte Signalkaskaden unterscheiden (5.2).

Um die Frage zu klären, ob sich SLGC-Linien oder möglicherweise sogar die Klone ein und derselben Mutterkultur in ihrer Sensitivität gegenüber Photonenstrahlung und TMZ unterscheiden, wurden die Effekte von Bestrahlung und/oder TMZ-Behandlung auf die Proliferation und Vitalität untersucht (5.3). Weiterhin wurde die Induktion von Signalkaskaden untersucht, die typischerweise mit der DNA-Schadensantwort von höheren, eukaryotischen Zellen assoziiert sind (5.4). Abschließend wurde untersucht, in welcher Relation der Stammzellcharakter von SLGC-Mutterkulturen und Klonen und die Therapiesensitivität zueinander stehen (5.5). Dabei sollte einerseits die Frage beantwortet werden, ob der Stammzellgrad und die Therapiesensitivität negativ miteinander korreliert sind, zum anderen sollte ermittelt werden, welche Zellen die Radio- oder Chemotherapie in einer *in vitro*-Analyse überleben.

5.1. Zelluläre Hierarchie von SLGC-Mutterkulturen und Klonen

Für die Bestimmung des Stammzellcharakters spielt der Transkriptionsfaktor Sox2 (*sex determining region Y-box* 2) eine entscheidende Rolle. In SLGCs und neuralen Stammzellen (NSCs) ist Sox2 essenziell für die Selbsterneuerung und Aufrechterhaltung des Stammzellstatus und liegt in allen GBMs überexprimiert vor (Alonso et al., 2011; Wang et al., 2011). Eine Sox2-Expression wurde in orthotopen Tumoren der Klone T1452 cl10, T1464 cl18 und T1440 cl4 detektiert, die in einem Fall (T1440 cl4) homogen war, jedoch in zwei Fällen (T1452 cl10, T1464 cl18) zwischen den einzelnen Zellen des Tumors stark variierte. Im Fall des Klons T1338 cl1 wurden nur einzelne Sox2-positive, humane Zellen im Mäusegehirn nachgewiesen, die jedoch keinen Tumor bildeten. Getestet wurden auch die Klone T1338 cl7 und cl11, allerdings erfolgte die Immunzytochemie nicht mit dem humanspezifischen Antikörper α Stem121, sondern mit α Ku80. Die fehlende Tumorigenität der Klone T1338 cl1, cl7 und cl11 sowie der T1338-Mutterkultur könnte damit zusammenhängen, dass im Mäusegehirn alltrans-

Retinsäure (atRA) vorhanden ist. T1338 war die einzige SLGC-Linie, die unter der Behandlung mit atRA differenzierte (Choschzick et al., 2014).

Die Sox2-Expression variierte zwischen den SLGC-Mutterkulturen, aber auch zwischen den Klonen, die sich von einer SLGC-Linie ableiten. So wurden in immunzytologischen Analysen von Kollegen des Labors sowohl inter- als auch intraklonale Variationen des Sox2-Levels festgestellt. Beispielsweise zeigten Arbeiten der Bachelorstudentin H. Zehnle (2016), dass T1440 cl4 eine höhere Sox2-Expression als T1440 cl8 und T1464 cl21 ein geringes Sox2-Level als T1464 cl27 aufweist. Zudem gab es wenige Klone, die auf Einzelzellniveau eine homogene Sox2-Expression in allen Zellen der Kultur aufwiesen (z.B. T1452 cl10), sondern eher solche, deren Sox2-Level intraklonal variierte (z.B. T1440 cl4, T1440 cl8, T1464 cl27). Auch in den Western blot-Analysen war eine hohe, interklonale Variation der Sox2-Expression festzustellen. Nur im Fall von zwei SLGC-Linien (T1338, T1495) kam es nach der klonalen Expansion zur einer Anreicherung von Zellen mit einem hohen Sox2-Level. In zwei Linien (T1440, T1452) waren die Sox2-Level aller Klone geringer als in der Mutterkultur und im Fall einer Linie (T1464) waren Klone mit einer höheren, geringeren oder ähnlich hohen Sox2-Expression wie die Mutterkultur zu beobachten. Allerdings waren die *sox2*-mRNA-Level relativ zur jeweiligen Mutterkultur im Fall von drei SLGC-Linien (T1440, T1464) geringer.

Arbeiten von Kollegen im Labor zeigten, dass der sox2-Promotor in Klonen und SLGC-Linien variierte. Der sox2-Promotor der T1338- und T1440-Linie war intermediär methyliert (T1338: ca. 45%, T1440: ca. 50%), während die Linien T1464 und T1495 eine Hypomethylierung (T1464: ca. 35%, T1495: ca. 30%) aufwiesen (Choschzick et al., 2014). Im Fall der T1338-Klone variierte die sox2-Promotormethylierung zwischen 15% (cl10) und 50% (cl8). Dabei war der sox2-Promotor in vier von sieben Klonen hypomethyliert (< 30%; T1338 cl2, cl5, cl9, cl10) und in drei Klonen intermediär methyliert (40 – 50%; T1338 cl4, cl7, cl8). In zwei von vier T1440-Klonen war der sox2-Promotor zu 45% methyliert, in den anderen zwei Klonen zu 65%. Die sox2-Promotormethylierung der T1452-Klone variierte zwischen 30% (cl10, cl16) und 60% (cl20, cl21, cl155), im Fall der T1464-Klone zwischen 35% (cl1) und 65% (cl6, cl18) und im Fall der T1495-Klone zwischen 40% (cl13, cl26, cl37) und 55% (cl12). Die Variationen der sox2-Promotormethylierung zwischen den Klonkulturen spiegelte jedoch nicht die zum Teil deutlichen Unterschiede in der Sox2-Protein- oder sox2-mRNA-Expression wider. Somit war keine eindeutige Korrelation zwischen dem Sox2-Protein-, dem sox2-mRNA-Level und der sox2-Promotormethylierung zu verzeichnen. Einerseits kann die Stabilität des Sox2-Proteins posttranslational reguliert werden, andererseits die Translation und die Stabilität des sox2-Transkripts (Fang et al., 2014; Shafiee et al., 2016), aber auch die sox2-Transkription wird in Abhängigkeit von Transkriptionsfaktoren und epigenetischen Modifizierungen vielfältig reguliert (Liu et al., 2016). Aufgrund der beobachteten Heterogenität zwischen den SLGC-Klonen und in Relation zur Mutterkultur auf jeder Ebene der Sox2-Expression (Promotormethylierung, mRNA- und Proteinlevel) lässt sich schlussfolgern, dass sich die Zellen der Mutterkultur hinsichtlich des Stammzellcharakters unterschieden. Da diese Zellen wiederum in der Lage waren eine zelluläre Heterogenität innerhalb der Klonkulturen aufzubauen, legt das die Vermutung nahe, dass die Zellen nicht nur in vitro, sondern auch in vivo eine zelluläre Hierarchie aufbauen. Für die fünf untersuchten SLGC-Linien würde das bedeuten, dass im Fall der T1338- und T1495-Mutterkulturen die Mehrheit der Zellen weiter differenziert waren, die Klone sich jedoch aus den wenigen Zellen mit einem vergleichsweise hohen Stammzellcharakter ableiteten (alle Klone wiesen eine höhere oder ähnlich hohe Sox2-Expression wie die Mutterkultur auf; schematische Darstellung siehe Abb. 73). Dabei ist jedoch zu beachten, dass das Sox2-Level der T1338-Mutterkultur deutlich höher war als das der T1495-Mutterkultur und sich somit der Stammzellstatus der gesamten Kultur deutlich unterschied. Hingegen wies die Mehrheit der Zellen der T1440- und T1452-Mutterkultur einen höheren Stammzellstatus auf als die Zellen der Klonkulturen. Dabei war die Sox2-Expression in der T1452-Mutterkultur in Relation zu den anderen vier Mutterkulturen am höchsten. Im Fall von T1464 war das weniger eindeutig. Die Mutterkultur befindet sich bezüglich des Stammzellcharakters der Gesamtheit der Zellen zwischen Klonen mit einem höheren Stammzellstatus (z.B. T1464 cl18) und solchen mit einen deutlichen geringeren (z.B. T1464 cl1). Die T1464-Klonkulturen sind somit aus Zellen mit einem hohen Stammzellcharakter und solchen mit einem geringen hervorgegangen. Die T1464-Mutterkultur wies ein höheres Sox2-Level als die T1495-Mutterkultur auf.



Abb. 73: Sox2-Expression in SLGC-Linien und Klonen. Schematische Darstellung der Sox2-Expression der SLGC-Mutterkulturen (weiße Kreise) und Klone. Die Sox2-Expression der Klone ist durch einen Balken mit einer graduellen Graufärbung dargestellt, die das Sox2-Level repräsentiert. Der Beginn des Balkens entspricht dem Klon mit der höchsten Sox2-Expression, das Ende des Balkens dem Klon mit dem geringsten Sox2-Level. – Sox2, sex determining region Y-box 2.

Es wurde postuliert, dass neben Sox2 auch die Stammzellfaktoren Oct3/4 und Nanog für den Stammzellcharakter und dessen Erhaltung in SLGCs wichtig sind (Guo et al., 2011; Schonberg et al., 2014). Allerdings zeigten die Analysen der oct3/4- und nanog-mRNA-Level nur für Klone von drei SLGC-Linien (T1440, T1452, T1495) eine positive Korrelation zwischen dem sox2-, oct3/4- und nanog-Expressionslevel, während die Expressionslevel in den Klonen der anderen beiden SLGC-Linien (T1338, T1464) negativ korrelierten. Es ist bekannt, dass sich Sox2, Oct3/4 und Nanog autoregulatorisch in ihrer Expression beeinflussen und zur Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters beitragen (Boyer et al., 2005). Neue Analysen zeigen jedoch, dass sich Nanog hauptsächlich autorepressiv reguliert und sein Einfluss auf die oct3/4- und sox2-Expression nur gering ist (Navarro et al., 2012). Dies könnte die fehlende, eindeutige Korrelation zwischen der sox2- und nanog-Expression erklären. Angenommen die drei Primerpaare arbeiteten gleich effizient, so war in allen Mutterkulturen und Klonen deutlich weniger nanog- und vor allem oct3/4-Transkript als sox2-mRNA vorhanden. Zudem wiesen alle Klone eine Hypermethylierung des oct3/4-Promotors auf, welche zuvor für die Mutterkulturen nachgewiesen wurde (Choschzick et al., 2014). Weiterhin war es nicht möglich das Oct3/4-Protein in den SLGC-Klonen mittels Western blot zu detektieren (eigene Ergebnisse im Rahmen der Publikation Choschzick et al., 2014). Die Unterschiede im Methylierungsgrad des oct3/4-Promotors erklären nicht die Variation der oct3/4-mRNA-Expression zwischen den Klonen, sondern lediglich die geringen Transkriptlevel. Die interklonalen Unterschiede des oct3/4-Transkriptlevels sind eher darauf zurückzuführen, dass der Promotor zwar noch offen ist, aber nicht transkribiert wird. Die sehr geringen oct3/4-Level könnten der Grund für eine fehlende Korrelation in zwei der fünf SLGC-Linien sein. Somit scheinen Oct3/4 und Nanog für den Stammzellstatus der SLGCs keine bzw. eine untergeordnete Rolle zu spielen und erwiesen sich als wenig nützlich zur Bestimmung des Stammzellcharakters der SLGCs.

Die initiale Isolierung und Charakterisierung von Gliomstammzellen wurde durch den Einsatz von Antikörpern gegen das membranständige Protein CD133/Prominin 1 möglich, das unter anderem auf der Zelloberfläche von neuralen Stammzellen und Progenitoren exprimiert wird (Uchida et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass bereits 100 CD133+ Gliomstammzellen ausreichen um im Mausmodell einen Tumor zu generieren (Singh et al., 2004). Weiterhin wurde festgestellt, dass die Expression von CD133 klinisch ein prognostischer Marker ist und mit einer geringeren Überlebensrate korreliert (Zeppernick et al., 2008; Zhang et al., 2008). Ob CD133 als universeller Marker für Gliomstammzellen gelten kann, ist jedoch kritisch zu sehen. So wiesen die SLGC-Linien, die durch die Kultivierung in serumfreiem Medium isoliert wurden, oft nur einen geringen Anteil CD133-positiver Zellen von 1% (T1338) bis 15% (T1464) auf. In einigen Fällen war der Anteil CD133-positiver Zellen höher und lag wie im Beispiel der T1522-Linie bei 35%. Dabei korrelierte der Anteil CD133-positiver Zellen der SLGC-Linien nicht mit der Sox2-Expression (vergleiche Abb. 17 und Choschzick et al., 2014). Ebenso war der Anteil CD133positiver Zellen in den Klonen von drei SLGC-Linien (T1338, T1440, T1464) innerhalb der ersten zehn Passagen nach der klonalen Expansion sehr gering (< 3%). Zudem korrelierte das Potenzial einen orthotopen Tumor im Mausmodell zu bilden weder mit dem Anteil CD133-positiver Zellen in den Klonkulturen noch mit dem Sox2-Level (vergleiche Anhang Tab. 23 und Tab. 25). Weiterhin spricht gegen CD133 als universeller Marker für Gliomstammzellen, dass im Fall des Klons T1440 cl5 mit zunehmender Passagierung zunächst ein Anstieg der Anzahl CD133-positiver Zellen zu verzeichnen war, bevor der Anteil reduziert wurde. Anhand mittels FACS sortierter T1522-Kulturen konnte diese Beobachtung gestützt werden. Dabei sank der Anteil CD133-positiver Zellen der CD133-Positivfraktion über fünf Wochen von nahezu 100% auf etwa 50%, während der Anteil CD133-positiver Zellen der Negativfraktion innerhalb von vier Wochen von fast 0% auf zwischen 50% und 70% anstieg und in der folgenden Woche auf 35% bis 50% abnahm. Chen et al. (2010) schlugen ein Modell vor, in dem CD133 nur auf einer Subpopulation von Gliomzellen mit Stammzelleigenschaften vorhanden ist, den sogenannten Typ II – Zellen, die sich von CD133-negativen Typ I – Zellen ableiten. Die Beobachtung, dass die CD133-Negativfraktion und der Klon T1440 cl5 einen Anstieg der Anzahl CD133-positiver Zellen aufweisen, würde das Modell von Chen et al. (2010) bestätigen (siehe Einleitung Abb. 4). Zudem würde die anschließende Reduktion des Anteils CD133-positiver Zellen in der CD133-Negativfraktion und dem Klon T1440 cl5 sowie die Reduktion der Anzahl positiver Zellen in der CD133-Positivfraktion das Modell stützen, in dem CD133-positive Zellen in der Lage sind sich selbst zu erneuern und CD133negative, weiter differenzierte Zellen (Typ III – Zellen) hervorzubringen. Demnach würde die CD133-Positivfraktion aus Typ II – Zellen bestehen, wohingegen die CD133-Negativfraktion sowohl Typ I – als auch Typ III – Zellen enthalten könnte. Da jedoch die Anzahl CD133-positiver Zellen in der CD133-Negativfraktion zunahm, sollte dies nach dem Hierarchiemodell (Chen et al., 2010) auf die Existenz von Typ I – Zellen in der CD133-Negativfraktion zurückzuführen sein, die in der Kultur die CD133-positiven Typ II – Zellen hervorbringen können. Da sich der Anteil CD133-positiver Zellen der Positivfraktion und der Negativfraktion über die Zeit annähern, könnte man den Eindruck gewinnen, dass sich ein Gleichgewicht zwischen CD133-positiven (Typ II – Zellen) und -negativen Zellen (Typ I – und Typ III – Zellen) einstellt. Die Sox2-Expression korrelierte nicht eindeutig mit dem Anteil CD133-positiver Zellen.

Chen et al. (2010) haben für ihr Modell zur linearen Hierarchie weitere Faktoren als Marker eingestuft. Dazu gehören unter anderem FABP7 (*fatty acid binding protein* 7) und Nestin. Eine FABP7-Expression wurde in allen Mutterkulturen und Klonen detektiert, wobei das FABP7-Level nur in 20% der Klone um mehr als den Faktor 2 von der Mutterkultur abwich und eine positive Korrelation zwischen dem Sox2und dem FABP7-Level nur in Klonen der SLGC-Linien T1452, T1464 und bedingt T1495 festzustellen war. Die Höhe der FABP7-Expression korrelierte nicht mit der Anzahl CD133-positiver Zellen in den Kulturen (siehe Anhang Tab. 21). Allerdings ist zu beachten, dass die Unterschiede der FABP7-Expression zwischen den Klonen in 80% der Kulturen eher gering war und in den Klonen der Linien T1338, T1440 und T1464 der Anteil CD133-positiver Zellen unter 3% lag, was die Aussagekraft einschränkt. Die Nestin-Expression wurde mittels Western blot-Analyse nicht bestimmt. Die Anzahl stark Nestin-positiver Zellen betrug in den Klonkulturen der Linien T1338 und T1440 etwa 100% und variierte zwischen den Klonen nur geringfügig. Hingegen waren zwar etwa 100% der Zellen in den Klonkulturen der T1464-Linie Nestin-positiv, allerdings variierte die Stärke des Nestin-Signals zwischen den Klonen. Dabei wiesen drei Klone (T1464 cl6, cl 16 und cl18) ein starkes Nestin-Signal auf, während in zwei Fällen (T1464 cl1 und cl11) nur ein schwaches Nestin-Signal nachgewiesen wurde (Daten erhoben von der Bachelorstudentin V. Beil (2016)). In T1464 korrelierte die Variation der Stärke des Nestin-Signals tendenziell mit der Sox2-Expression. Eine Aussage bezüglich einer Korrelation von Nestin mit der Anzahl CD133-positiver Zellen kann nicht getroffen werden.

Die Beobachtungen für die SLGC-Linien T1452, T1440 und T1495 wiesen viele Parallelen zum Modell zur linearen Hierarchie von Chen et al. (2010) auf, während T1338 und T1464 das vorgeschlagene Modell eher nicht bestätigten.

Zusätzlich zeigte sich, dass GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), das in frühen, neuralen Progenitoren, in reifen Astrozyten und ebenfalls in SLGCs vorkommt (Choschzick et al., 2014; Doetsch et al., 1999; Kamphuis et al., 2012), im Fall der SLGC-Linie T1440 ein Marker für die Gliomstammzelle ist (Typ I – Zelle), wohingegen GFAP im Fall von T1338 eher als Differenzierungsmarker dient. Nur für die T1452- und T1495-Linie war die Zuordnung weniger eindeutig, wobei die Indizien eher für GFAP als SLGC-Marker sprechen. So wiesen alle T1452-Klone ein geringeres Sox2- und GFAP-Level als die Mutterkultur auf und im Fall der T1495-Klone war sowohl die Sox2- als auch die GFAP-Expression höher als in der Mutterkultur. Allerdings korrelierte die Höhe der Sox2- und die GFAP-Expression nicht eindeutig miteinander. Im Fall der T1464-Klone wurde reproduzierbar keine GFAP-Expression im Western blot detektiert, obwohl dies für die T1464-Linie zuvor gelang (Choschzick et al., 2014; C. Zechel persönliche Mitteilung). Da jedoch die T1464-Mutterkultur zum Zeitpunkt der klonalen Expansion bereits eine hohe Passagenzahl aufwies (p > 50) und T1464-Kulturen früherer Passagen eine GFAP-Expression aufwiesen, kann vermutet werden, dass GFAP im Fall der T1464-Linie ebenfalls als Stammzellmarker dient. Unabhängig davon war die GFAP-Expression innerhalb der SLGC-Kulturen sehr heterogen.

Anhand der Befunde könnte ein Modell zur linearen Hierarchie in SLGC-Linien wie in Abbildung 74 erstellt werden. Um die Beobachtungen der in dieser Arbeit untersuchten SLGC-Linien und Klone durch ein Modell darzustellen, benötigt man mehr als nur drei verschiedene Zelltypen, die einen unterschiedlichen Stammzellcharakter aufweisen und sich vorrangig in ihrer Sox2-Expression unterscheiden. Dafür wurden in Abbildung 74 vier weitere Zelltypen hinzugefügt, die allesamt das Potential zur Selbsterneuerung besitzen. Allerdings verläuft der Prozess der Differenzierung vermutlich eher kontinuierlich, was die zum Teil geringen Unterschiede zwischen den Klonen erklären würde. Während sowohl die Mutterkultur als auch die Klone der SLGC-Linien T1440 und T1338 hauptsächlich Zellen der Typen I und I.1 aufweisen, also eine flache Hierarchie zeigen, besteht die T1452-Mutterkultur selbst eher aus Zellen jeder Differenzierungsstufe und weist somit eine breite Hierarchie auf. Die SLGC-Linien T1464 und T1495 sowie deren Klone weisen hauptsächlich weiter differenzierte Zellen auf, sodass vor allem Zellen der Typen II bis III vorhanden sind, jedoch ebenso vereinzelte Typ I – Zellen, sodass auch T1464 und T1495 eine breite Hierarchie aufbauen.



Abb. 74: Modell zur linearen Hierarchie in SLGC-Linien. Schematische Darstellung der Zellen verschiedener Differenzierungsstadien in SLGC-Linien. Alle Zelltypen (I bis III) sind in der Lage sich selbst zu erneuern (graue, halbrunde Pfeile) und weiter zu differenzieren (graue, gerade Pfeile). Dabei nimmt die Sox2-, FABP7-, Nestin-Expression kontinuierlich, aber mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeit, mit zunehmendem Differenzierungsgrad ab. Nur eine Subpopulation an Zellen ist CD133-positiv. – Sox2, *sex determining region Y-box* 2; FABP7, *fatty acid binding protein* 7; CD133, Prominin 1.

Im Review von Schonberg et al. (2014) wurden weitere, mögliche Marker für SLGCs genannt, zu denen CD44, CD15/SSEA-1, Integrin α 6 und Musashi gehören. In dieser Arbeit zeigte sich, dass CD44 auf mehr als 90% der Zellen in allen SLGC-Linien sowie weiter differenzierten Kulturen vorhanden war. Die Anzahl CD44-positiver Zellen veränderte sich mit fortschreitender Passagierung trotz deutlicher Variation der Sox2-Expression nicht. Analysen zur Proteinexpression wiesen dagegen auf Unterschiede zwischen dem CD44-Expressionslevel verschiedener SLGC-Linien hin, das allerdings nicht mit dem Sox2-Level korrelierte (C. Zechel, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtungen schließen CD44 als SLGC-Marker aus. Im Vergleich dazu waren in den untersuchten SLGC-Kulturen weniger als 2% der Zellen CD15-positiv (Ausnahme T1371, ca. 7%) und mittels Western blot-Analyse ließ sich unter den verwendeten Bedingungen (30 µg Gesamtzellextrakt) kein CD15-Protein nachweisen (eigene Daten und C. Zechel, persönliche Mitteilung), wodurch sich CD15 nicht als nützlicher SLGC-Marker erweist. Der Anteil Integrin α 6-positiver Zellen war zwar im Fall der SLGC-Linien T1440 und T1452 höher (T1440: 93%; T1452: 88%) als in den weiter differenzierten Kulturen (T1440: 86%; T1452: 73%), allerdings war das im Fall von T1338 umgekehrt (SLGC: 23%; differenziertere Kultur: 36%). Somit eignet sich auch Integrin α 6 nicht als SLGC-Marker. Auch Analysen anderer Arbeitsgruppen ergaben Unterschiede im Anteil Integrin α 6-positiver Zellen zwischen verschiedenen SLGC-Linien (Lim et al., 2012). Im Fall der Musashi-Expression wichen die Expressionslevel zwischen den Klonen und in Relation zur Mutterkultur nur in 15% der Kulturen um mehr als den Faktor 2 voneinander ab. Da Musashi an der asymmetrischen Zellteilung beteiligt ist, die für die Aufrechterhaltung des Stammzellstatus der SLGCs notwendig ist (Wang et al., 2014), würde man zwischen den Klonen der SLGC-Linien auch keine drastischen Unterschiede der Musashi-Expression erwarten. Eine positive Korrelation zwischen dem Expressionslevel von Sox2 und Musashi war nur für die SLGC-Linien T1452 und T1495 festzustellen. Somit ist Musashi als alleiniger Marker, ähnlich wie FABP7, nicht nützlich, kann aber in Kombination mit Sox2 den Stammzellcharakter der Zellen definieren. In dem Modell in Abbildung 74 würde die Musashi-Expression eher parallel zu FABP7 verlaufen. Es wurde postuliert, dass der Transkriptionsfaktor PAX6 eine wichtige Rolle in SLGCs spielt (Liu et al., 2012) und könnte somit ein weiterer, potenzieller Marker sein. Meine Daten zeigten jedoch, dass die PAX6-Expression zwischen den Klonen und relativ zur Mutterkultur in drei Viertel der Kulturen um weniger als das 2-Fache variierte. Zudem war zwischen dem Sox2- und dem PAX6-Level eher eine negative Korrelation in den SLGC-Linien T1338, T1495 und bedingt T1464 zu verzeichnen, während in den anderen beiden Linien (T1440, T1452) keine Korrelation auftrat. Weiterhin war eine negative Korrelation zwischen dem Expressionslevel von FABP7 und PAX6 im Fall von T1452, T1464 und T1495 zu erkennen, was den Beobachtungen von Liu et al. (2012) widerspricht. Es wurde auch beschrieben, dass PAX6 die Proliferation und das invasive Wachstum von Gliomzellen inhibiert (Cheng et al., 2014; Mayes et al., 2006), was eher mit einem differenzierteren Phänotyp assoziiert ist (siehe z.B. Chen et al. (2010)). Daher wäre zu vermuten, dass PAX6 eher in Typ III – Zellen aus dem Modell in Abbildung 74 exprimiert ist.

Neben den stammzellassoziierten Markern können Differenzierungsmarker nützlich sein um den Stammzellstatus einer SLGC-Linie zu bestimmen. Dabei spielen Tau (neuronale Differenzierung) und GFAP (gliale Differenzierung) eine wichtige Rolle sowie der Anteil CD31-positiver Zellen, der Hinweise auf eine Transdifferenzierung in Endothelzellen gibt (Ricci-Vitiani et al., 2007). Im Fall der Klone von zwei SLGC-Linien (T1440, T1452) war weder eine eindeutige gliale noch eine neuronale Differenzierung zu verzeichnen. Dabei wiesen zwei T1440-Klone (T1440 cl5 und cl5-1) relativ zur Mutterkultur eine Reduktion der Sox2-Expression auf, was auf eine Differenzierung hindeutet, während die anderen zwei T1440-Klone (T1440 cl4 und cl8) und alle T1452-Klone einen Anstieg des Sox2-Levels zeigten, was für den Erhalt oder eine Erhöhung des Stammzellcharakters spricht. Im Vergleich dazu nahm die Tau-Expression in T1338-Klonen relativ zur Mutterkultur tendenziell zu, während in acht Klonen gleichzeitig das GFAP-Level anstieg (T1338 cl2, cl3, cl5, cl6, cl7, cl8, cl10, cl11). Das deutet darauf hin, dass eine Subpopulation der Zellen neuronal und/oder glial differenzierte, wobei sich die gliale und die neuronale Differenzierung nicht ausschlossen. Neben der Tau- und GFAP-Expression stieg auch das Sox2-Level tendenziell. Das deutet darauf hin, dass es in einer anderen Subpopulation von Zellen möglicherweise zu einer Anreicherung von Zellen mit einem hohen Stammzellcharakter kam. Es ist zu beachten, dass es unter den vorliegenden Kulturbedingungen nicht zu einer terminalen Differenzierung kommt. Zudem wurde von einigen Forschern beschrieben, dass es in Gliomzellen zu einer abnormalen Ko-Expression von neuronalen und glialen Markern kommen kann (Beier et al., 2007; Günther et al., 2008; Phillips et al., 2006). In den Klonen der SLGC-Linien T1440, T1452 und T1495 lag der Anteil CD31-positiver Zellen bei maximal 10%, während dieser im Fall von zwei T1338-Klonen (T1338 cl5 und cl6) mit fortschreitender Passagierung auf bis zu 19% anstieg, was auf eine endotheliale Differenzierung einer Subpopulation von Zellen hindeuten könnte. Allerdings konnte in den untersuchten Klonkulturen der vier SLGC-Linien (T1338, T1440, T1452, T1495) keine Korrelation zwischen dem Expressionslevel von Sox2 und dem Anteil CD31-positiver Zellen festgestellt werden. Zudem ergaben die Analysen der SLGC-Linien T1338 und T1440 tendenziell eine positive Korrelation zwischen den Veränderungen des Tau-Levels und der Variation des Anteils CD31-positiver Zellen mit zunehmender Passagenzahl. Das deutet darauf hin, dass sich in den SLGC-Linien T1338 und T1440 eine neuronale und endotheliale Differenzierung nicht gegenseitig ausschließen. Die GFAP-Expression veränderte sich unabhängig von den Änderungen der Tau-Expression oder des Anteils CD31-positiver Zellen. Das Sox2-Level nahm in der Regel über die Passagen zu, was darauf hindeuten könnte, dass es in einer Subpopulation von Zellen zur Differenzierung kam und in einer anderen Sox2 hochreguliert wurde um den Stammzellstatus der Kultur aufrecht zu erhalten.

Unter Einbeziehung aller Daten lässt sich schlussfolgern, dass (I) die Zellen innerhalb der Mutterkultur einen unterschiedlichen Differenzierungsgrad aufweisen und eine Hierarchie aufbauen, die sich zwischen den SLGC-Linien unterscheidet, (II) sich in den abgeleiteten Klonkulturen eine neue Hierarchie aufbaut und (III) das Potenzial einen orthotopen Tumor im Mausmodell zu generieren weder eindeutig mit einem hohen Sox2-, FABP7- oder Musashi-Level noch mit einem hohen Anteil CD133-positiver Zellen korreliert.

5.2. Deregulierte Signalkaskaden in SLGC-Mutterkulturen und Klonen

Im Zusammenhang mit dem TCGA- (The Cancer Genome Atlas-) Projekt wurden Evidenzen für GBM-Subtypen gefunden, die eine Einordnung von GBMs in drei bis vier Subtypen erlauben (für Details siehe Kapitel 1.2. GBM-Subtypen). Einige dieser Parameter haben sogar in die neue Klassifizierung der WHO Aufnahme gefunden (IDH (Isocitratdehydrogenase), EGFR (epidermal growth factor receptor), PTEN (phosphatase and tensin homolog); Louis et al. (2016)). Diese Erkenntnisse wurden jedoch an Biopsien von GBMs gewonnen, die außer SLGCs auch Nicht-SLGCs, darunter weiter differenzierte GBM-Zellen und endotheliale Zellen, enthielten. Umgekehrt nehmen Daten, die mit primären SLGC-Kulturen gewonnen wurden, nur in seltenen Fällen darauf Bezug, welche Signalkaskaden in diesen Zellen dereguliert sind. So wurden beispielsweise in Arbeiten von Bao et al. (2006) primäre SLGC-Kulturen anhand ihrer CD133-Expression in CD133-positive und CD133-negative Zellen sortiert und hinsichtlich ihrer Radioresistenz untersucht. Dabei wurden weder der PTEN- noch der p53-Status oder deregulierte Signalwege berücksichtigt, die die Proliferation und/oder Apoptose beeinflussen (z.B. EGFR). Das Verhalten von SLGCs in in vivo-Analysen (z.B. Generieren orthotoper Tumore), aber auch das Differenzierungs- und Proliferationsverhalten sowie die Sensitivität gegenüber Radio- und Chemotherapie kann aber möglicherweise ebenso stark vom Stammzellcharakter der Zellen wie von der Art der Deregulierung der Signalkaskaden abhängen. Dazu wurde in unserer Arbeitsgruppe eine umfassende Analyse durchgeführt, von denen einige Aspekte in dieser Arbeit untersucht wurden. Dabei habe ich anhand der Klonkulturen analysiert, ob sich die Zellen der Mutterkultur hinsichtlich ihrer PTEN-, EGFR- und PDGFR α - bzw. - β -Expression unterscheiden. Es zeigte sich, dass im Fall von drei SLGC-Linien (T1338, T1440, T1464) das EGFR-Level zwischen den Klonkulturen einer Mutterkultur lediglich im einstelligen Bereich variierte, was auf eine Modulation der EGFR-Expression hindeutet. Hingegen unterschied sich die EGFR-Expression in Klonen von zwei Linien (T1452, T1495) um mehr als das 10-Fache, was möglicherweise auf eine Deregulierung der EGFR-Expression hinweist. Dabei können Deregulierungen der EGFR-Expression auf eine Amplifikation des egfr-Gens, eine veränderte Promotoraktivität oder eine verminderte Degradierung des aktivierten EGFRs zurückzuführen sein (Azuaje et al., 2015; Little et al., 2012). Zudem wurde eine Deregulierung der EGFR-Expression in nur einer Subpopulation von Zellen, wie sie im Fall von T1452 und T1495 zu beobachten war, ebenfalls kürzlich beschrieben (Meyer et al., 2015). Da im Rahmen dieser Arbeit der Grund für die deregulierte EGFR-Expression nicht analysiert wurde, kann dies nicht abschließend geklärt werden. Allerdings wurde beschrieben, dass eine EGFR-Überexpression in >95% der Fälle auf eine EGFR-Amplifikation zurückzuführen ist (Shinojima et al., 2003). Jedoch ist zu beachten, dass SLGC-Linien unter Kulturbedingungen selektiert werden, was zu einer Anreicherung oder Depletion von Zellen mit einer EGFR-Amplifikation führen kann (Chen et al., 2010; Liffers et al., 2015).

Während die PDGFR β -Level zwischen den Klonkulturen aller SLGC-Linien eher gering variierten, wies die Variation der PDGFR α -Expression im Fall der Klone von T1440 und T1495, nicht aber von T1338, auf eine molekulare Heterogenität hin, bei der nur eine Subpopulation der Zellen einer SLGC-Linie eine Deregulierung der PDGFR α -Expression aufweist, die durch Gen-Amplifikationen, somatische Mutationen sowie eine deregulierte Gen- bzw. Proteinexpression bedingt sein kann (Abounader, 2009; Little et al., 2012; Van Meir et al., 2010). Dass PDGFR α -Mutationen, wie sie vermutlich in T1440 und T1495 zu finden sind, in einer Subpopulation von Zellen auftreten können, wird durch kürzlich publizierte Daten bestätigt (Barber et al., 2015; Szerlip et al., 2012). Weder eine Überexpression von EGFR, noch von PDGFR α oder PDGFR β konnte in den fünf untersuchten SLGC-Linien als founder mutation identifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnte der Verlust von PTEN in zwei SLGC-Linien (T1338, T1452) als founder mutation eingeordnet werden, da alle Klone diese Veränderung zeigten. Im Fall von T1440 und T1495 war ein Verlust von PTEN nur in einigen Klonen festzustellen. Dabei deuten die Daten darauf hin, dass im Fall von T1440 eine Subpopulation (aus der T1440 cl5-1 hervorging) keine Veränderung im pten-Gen, eine zweite Subpopulation (aus der T1440 cl4 und cl5 hervorging) einen heterozygoten Verlust und eine dritte Subpopulation (aus der T1440 cl8 hervorging) einen homozygoten Verlust des pten-Gens aufwies. Im Fall von T1495 kann vermutet werden, dass eine Subpopulation (aus der T1495 cl12 hervorging) einen heterozygoten Verlust des pten-Gens aufwies, während die andere Subpopulation (aus der die Klone T1495 cl4 und cl13 hervorgingen) keine Veränderungen zeigte. Anhand der Variation der PTEN-Expression in T1440 und T1495 kann geschlussfolgert werden, dass PTEN-Mutationen auch in einer Subpopulation von Zellen auftreten können, was kürzlich durch ähnliche Analysen beschrieben wurde (Meyer et al., 2015). Im Einklang mit neuen Untersuchungen bezüglich der PTEN-Expression in GBMs, deuten die Daten der PTEN-Expression darauf hin, dass die PTEN-Mutation früh in der Tumorgenese oder später in einer Subpopulation von Zellen auftreten kann (Barber et al., 2015). Die Daten legen den Schluss nahe, dass EGFR-, PDGFR α - und PTEN-Mutationen während der Evolution des Tumors in einer Subpopulation von Zellen auftreten können (siehe T1440, T1452, T1495), wobei sich die verschiedenen Mutationen nicht ausschließen (siehe Tab. 18).

SLGC-Linie	EGFR	PDGFR α	PDGFRβ	PTEN
T1338	М	М	М	F
T1440	М	Н	М	Н
T1452	Н	n.d.	n.d.	F
T1464	М	n.d.	М	n.d.
T1495	Н	Н	М	Н

Tab.	18: Modulation	und molekulare	Heterogenität i	n SLGC-Linien.
Tab.	10. 10000000000	und molekulare	inclui ogcinitat i	

F, founder mutation; M, Modulation; H, molekulare Heterogenität; n.d., nicht bestimmt.

Bisher ist die Analyse zur molekularen Heterogenität der SLGC-Kulturen nicht abgeschlossen. In der Arbeitsgruppe werden weitere Marker, wie MERTK (Tyrosin-Proteinkinase Mer) und p53 (Tumorsuppressorprotein p53), auf ihre klonale Expression hin untersucht, um ein umfassendes Gesamtbild hinsichtlich der molekularen Heterogenität der SLGC-Linien zu erhalten.

Zusammen mit den Erkenntnissen zur hierarchischen Organisation zeigte sich, dass sowohl SLGC-Linien mit einem hohen (T1440, T1452) als auch solche mit einem geringeren Stammzellcharakter (T1495) eine molekulare Heterogenität aufweisen, wohingegen nicht alle Linien Subpopulationen von Zellen mit unterschiedlichen Mutationen besaßen (T1338 (moderater Stammzellcharakter), T1464 (geringerer Stammzellcharakter)). Ebenfalls korrelierte ein homo- (T1338, T1452, Subpopulation von T1440) oder heterozygoter (Subpopulation von T1440 und T1495) Verlust von PTEN nicht mit dem Stammzellstatus. Das legt die Vermutung nahe, dass sowohl der Stammzellcharakter als auch die *founder mutations* bzw. die deregulierten Signalwege die Therapiesensitivität beeinflussen könnten. Aus diesem Grund habe ich im nächsten Abschnitt dieser Arbeit die Sensitivität ausgewählter SLGC-Linien gegenüber Photonenstrahlung und dem Chemotherapeutikum TMZ untersucht.

5.3. Proliferation und Vitalität von SLGC-Mutterkulturen und Klonen nach Bestrahlung und/oder Temozolomid-Behandlung

Bestimmte, im Labor charakterisierte SLGC-Linien wurden verwendet, um zu prüfen, wie diese auf die Radio- und Chemotherapie reagieren. Dabei stand primär die Frage im Vordergrund wie sich die p53-Mutations- (p53_{mut}-) im Vergleich zu den p53-Wildtyp- (p53_{wT}-) Zelllinien verhalten. Es wurden nur solche Zelllinien gewählt, für die p53 als *founder mutation* identifiziert wurde und nicht etwa die Zelllinie T1338, die in einigen T1338-Klonen heterozygot eine p53-Mutation trägt (Arbeiten der Bachelorstudentin C. Geisler und C. Zechel, persönliche Mitteilung). Zunächst wurde überprüft, ob die SLGC-Linien überhaupt auf die Radio- und Chemotherapie reagieren. Für die Analyse der Proliferation und der Vitalität bzw. der Apoptose habe ich eine TMZ-Konzentration eingesetzt, die der EC₅₀ entsprach (ermittelt von Kollegen im Labor), sowie eine suboptimale Bestrahlungsdosis von 5 Gy, um mögliche, kooperative Effekte erfassen zu können. Lediglich für die Analyse der p21^{Cip1/WAF1}-Expression wurde für alle SLGC-Linien eine TMZ-Konzentration von 100 μ M eingesetzt, da im Patienten, unabhängig von den Eigenschaften des Tumors, immer ein und dieselbe TMZ-Konzentration verwendet wird und um die verschiedenen SLGC-Linien in ihrer Antwort auf eine einheitliche Behandlung untereinander vergleichen zu können, unabhängig von ihrer Therapiesensitivität.

Es zeigte sich, dass am Tag d4 bzw. d5 nach den Behandlungen alle untersuchten $p53_{mut}$ -Linien (T1371-R175H, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H, T1452 cl10-*splice*-Mutation) sowie die etablierte $p53_{WT}$ -Gliomzelllinie U87MG sowohl nach Einfach- als auch nach Doppelbehandlung eine statistisch signifikante Reduktion der Zellvitalität aufwiesen, während es gleichzeitig zu einer Induktion der Apoptose in den vier SLGC-Linien kam (U87MG wurde dahingehend nicht untersucht). Nur in einem Fall (T1447 cl4) war ein additiver Effekt von TMZ und Bestrahlung festzustellen. Zudem ließ sich kein Zusammenhang zum Sox2-Level (hoch in T1452 cl10 und gering in T1371, T1447 cl4, T1495, U87MG) in den Kulturen feststellen. Die Auswirkungen der Behandlungen auf den Stammzellcharakter werden noch einmal separat aufgegriffen (Kapitel 5.5).

Zudem wiesen die Klonkulturen (T1495 cl13 sowie T1447 cl2, cl4, cl9 und cl12) eine geringere Therapiesensitivität als die Mutterkultur auf (Daten zur Vitalität dieser Arbeit und Daten der Dissertation von Anna Maria Dorenberg). Zusätzlich waren die Klonkulturen unterschiedlich sensitiv gegenüber Bestrahlung und TMZ, wobei der Klon T1447 cl2 am resistentesten und T1447 cl4 am sensitivsten unter den T1447-Klonen war. Die Situation in der T1495-Linie bestätigt die Annahme von Prestegarden und Enger (2010), dass es bereits innerhalb einer SLGC-Zelllinie Zellen mit einer unterschiedlichen Sensibilität gegenüber den verschiedenen Behandlungen gibt und sich solche nicht zwangsläufig unter der Behandlung entwickeln, was durch Arbeiten von Meyer et al. (2015) ebenfalls unterstützt wird. Im Fall von T1447 handelte es sich um eine Zelllinie, die sich von einem Rezidiv ableitete, wobei der Originaltumor bereits mittels Radio- und Chemotherapie behandelt wurde, was die ausgeprägte Radio- und Chemoresistenz in den Zellen, von denen sich der Klon T1447 cl2 ableitete, erklären könnte.

Die TMZ-Behandlung in An- und Abwesenheit von Bestrahlung, nicht aber die Bestrahlung allein, führte im Fall der etablierten Gliomzelllinie U87MG zu einem partiellen G2-Arrest und bestätigt die Beobachtungen von Hirose et al. (2001), wohingegen in T1371-Kulturen ein partieller G1-Arrest induziert wurde. Hierbei war im Fall von T1371-R175H besonders in Anwesenheit von TMZ das p21^{Cip1/WAF1}-Level deutlich erhöht, jedoch auch nach alleiniger Bestrahlung, nach der der Zellzyklus kaum verändert war. Die Induktion der p21^{Cip1/WAF1}-Expression war nicht zu erwarten, da T1371 die p53-R175H-Mutation trägt, die aufgrund der strukturellen Veränderung des p53-Proteins nicht mehr an der DNA binden kann (Joerger und Fersht, 2007). Allerdings kann die p21^{Cip1/WAF1}-Expression auch p53-unabhängig, z.B. durch HOXA10, induziert werden (Bromleigh und Freedman, 2000). Im Vergleich

dazu induzierte die Bestrahlung im Fall des Klons T1447 cl4-N239D einen partiellen G2-Arrest, die Anwesenheit von TMZ allerdings weder einen G1- noch einen G2-Arrest. Im Fall der SLGC-Linien, die kein MGMT exprimierten (T1440, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D), wurde das p21^{Cip1/WAF1}-Level in Anwesenheit von TMZ unmittelbar reduziert, stieg jedoch im Fall von T1447 cl4-N239D bis zum Tag d5 nach der alleinigen TMZ-Behandlung wieder an. Die alleinige Bestrahlung führte in der MGMTnegativen p53_{wT}-Linie (T1440) zu einem 2-fach erhöhten, anhaltenden p21^{Cip1/WAF1}-Level, während es in den MGMT-negativen p53_{mut}-Linien (T1442-R248W und T1447 cl4-N239D) nach einem initialen Anstieg zu einer deutlichen Reduktion der p21^{Cip1/WAF1}-Expression kam, sodass im Fall von T1447 cl4-N239D der strahleninduzierte G2-Arrest am Tag d4 p21^{Cip1/WAF1}-unabhängig sein muss. So könnte die Phosphorylierung von Cdc25C, die unabhängig vom p53-Status ist, zu dem beobachteten G2-Arrest führen (Kastan und Bartek, 2004). Nur in T1495-R273H-Kulturen waren keine deutlichen Effekte der Behandlungen auf den Zellzyklus festzustellen. Im Einklang damit wiesen die behandelten T1495-R273H-Kulturen am Tag d5 in Anwesenheit von TMZ keine Veränderungen der p21^{Cip1/WAF1}-Expression auf, obwohl am Tag d2 ein Peak zu verzeichnen war, während das p21^{Cip1/WAF1}-Level nach Bestrahlung sogar um die Hälfte sank. Das könnte mit der p53-R273H-Mutation von T1495 zusammenhängen, einer DNA-Kontaktmutante, die keine transkriptionelle Aktivität aufweist und somit keine p21^{Cip1/WAF1}-Expression induzieren kann (Bissonnette et al., 1997; Bullock et al., 2000; Joerger und Fersht, 2007). Wie bereits im Fall der T1371-R175H-Kultur wurde das p21^{Cip1/WAF1}-Level in der T1495-R273H-Kultur p53-unabhängig reguliert. Insgesamt scheint die fehlende MGMT-Expression die SLGC-Linien in Anwesenheit von TMZ, unabhängig vom p53-Status, vor einen p21^{Cip1/WAF1}-abhängigen Zellzyklusarrest zu bewahren (siehe Tab. 19). Der Zusammenhang zwischen TMZ-Behandlung und p21^{Cip1/WAF1}-Level ist allerdings bisher unbekannt. Auch der p53-Status, Wildtyp versus Mutation, scheint die p21^{Cip1/WAF1}-Expression zu beeinflussen, wobei ungeklärt bleibt, inwiefern sich die Position der p53-Mutation auf die behandlungsinduzierte Antwort auswirkt.

Die Analyse der Effekte von Bestrahlung und TMZ-Behandlung zeigten, dass SLGC-Mutterkulturen und Klone in unterschiedlichem Maße resistent gegenüber den Behandlungen sind. So zeigte die p53_{WT}-Linie T1522 eine hohe TMZ-, allerdings eine geringe Strahlenresistenz, während die zweite p53_{WT}-Linie T1440 eine hohe Strahlen-, aber eine geringe TMZ-Resistenz aufwies. Die p53_{mut}-Linien zeigten eine mittlere (T1371-R175H, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) bis hohe (T1452 cl10-*splice*-Mutante) Strahlenresistenz sowie eine mittlere (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) bis hohe (T1452 cl10-*splice*-Mutante) TMZ-Resistenz (eigene Daten und Daten aus der Dissertation von Anna-Maria Dorenberg). Für die Resistenz gegenüber TMZ scheint der MGMT-Status eine Rolle zu spielen, wodurch sich allerdings nur Teilaspekte des Verhaltens der Mutterkulturen bzw. Klone erklären lassen. Um weitere Ursachen für das spezifische Antwortverhalten der Mutterkulturen und Klone zu gewinnen, wurden daher im Folgenden einige Schlüsselproteine der Signalkaskaden untersucht, die dafür bekannt sind, dass sie die DNA-Schadensantwort in höheren, eukaryotischen Zellen vermitteln.

Zell- linie	p53	PTEN	MGMT	EGFR	PDGF- Rα	Vitalität	Apop- tose	Zell- zyklus	p21 ^{Cip1/WAF1} Max. Anst.; Änd.
T1371	mut. (R175H)	-	++	+	+	TMZ: ↓ RT: ↓ TMZ+RT: ↓	TMZ: ↑ RT: ↑ TMZ+RT: ↑	TMZ: G1 RT: ~ TMZ+RT: G1	TMZ: d4 个; X RT: 6h 个; ↓ TMZ+RT: 6h 个; ↓
T1442	mut. (R248W)	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	TMZ: X ; (↓) RT: 6h 个; ↓ TMZ+RT: X ; (↓)
T1447 cl4	mut. (N239D)	-	-	(+)	(+)	TMZ: ↓ RT: ↓ TMZ+RT: ↓	TMZ: 个 RT: 个 TMZ+RT: 个个	TMZ: ~ RT: G2 TMZ+RT: G2	TMZ: X ; ↓/个 RT: 6h 个 ; ↓ TMZ+RT: X ; ↓
T1452 cl10	mut. (splice)	-	+	+	-	TMZ: (↓) RT: (↓) TMZ+RT: (↓)	TMZ: 个 RT: 个 TMZ+RT: 个	n.d.	n.d.
T1495	mut. (R273H)	++	+	+	(+)	TMZ: ↓ RT: ↓ TMZ+RT: ↓	TMZ: 个 RT: 个 TMZ+RT: 个	TMZ: ~ RT: ~ TMZ+RT: ~	TMZ: d2 (个); ↓ RT: 6h ~; ↓ TMZ+RT: d2 个; ↓
T1440	WT	++	-	(+)	-	n.d.	n.d.	n.d.	TMZ: X ; ↓ RT: 6h 个; ~ TMZ+RT: X ; ↓
T1522	WT	-	++	++	+	n.d.	n.d.	n.d.	TMZ: d2 个; ↓ RT: 6h 个; ↓ TMZ+RT: 6h 个; ↓
U87MG	WT	-	-	+	-	TMZ: (↓) RT: (↓) TMZ+RT: (↓)	n.d.	TMZ: G2 RT: ~ TMZ+RT: G2	n.d.

Tab. 19: Deregulierte Signalwege in SLGC-Linien und Klonen sowie Effekt von Bestrahlung und/oder Temozolomid auf Vitalität, Apoptose und Proliferation.

p53, Tumorsuppressorprotein p53; PTEN, phosphatase and tensin homolog; MGMT, O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; EGFR, epidermal growth factor receptor; PDGFR α , platelet-derived growth factor receptor α ; Max., Zeitpunkt maximaler Expression; Anst., Anstieg relativ zur Kontrolle; Änd., Änderung der Expression nach Erreichen des Maximums über den restlichen Messzeitraum; mut., mutiert; R175H, Arginin 175 durch Histidin ersetzt; R273H, Arginin 273 durch Histidin ersetzt; R248W, Arginin 248 durch Tryptophan ersetzt; N239D, Asparagin 239 durch Aspartat ersetzt; -, keine Proteinexpression detektierbar; (+), schwache Proteinexpression; +, moderate Proteinexpression; ++, starke Proteinexpression; TMZ, Temozolomid; RT, Bestrahlung; TMZ+RT, Doppelbehandlung; (\downarrow), schwache Reduktion; \downarrow , moderate Reduktion; \downarrow , starke Reduktion; (\uparrow), leichter Anstieg; \uparrow , moderater Anstieg; \uparrow , starker Anstieg; G1, G1-Arrest; G2, G2-Arrest; h, Stunde; d; Tag; ~, unverändert; X, nicht zutreffend/nicht vorhanden; n.d., nicht bestimmt.

5.4. DNA-Schadensantwort in SLGC-Mutterkulturen und Klonen nach Bestrahlung und/oder Temozolomid-Behandlung

Zur Beurteilung der DNA-Schadensantwort in den SLGC-Linien und Klonen habe ich die in der Einleitung beschriebenen Signalkaskaden (Abb. 2), welche zum einen die ATM-Chk2-p53- und zum anderen die ATR-Chk1-p53-Kaskade umfassen, untersucht. Dabei lag der Fokus auf der Aktivierung der Kinasen ATM, Chk2, Chk1 sowie auf dem Expressionslevel von p53. Zudem wurde die Phosphorylierung von H2AX, ein Marker für Doppelstrangbrüche (Ivashkevich et al., 2012), analysiert.

Die deutlichen Unterschiede im basalen γ H2AX-Level der SLGC-Linien resultieren vor allem aus dem Anteil schwach γ H2AX-positiver Zellen und nicht aus einem hohen Anteil stark positiver Zellen. Dabei ist ein hoher, basaler γ H2AX-Level möglicherweise mit vielen Doppelstrangbrüchen und einem hohen Grad an genomischer Instabilität assoziiert. Das könnte das sehr hohe γ H2AX-Level in T1447 cl4-N239D erklären, dessen Mutterkultur sich von einem Rezidiv ableitete, und möglicherweise unter anderem mit der Art der p53-Mutation zusammenhängen. Eine p53-Mutation an sich erhöht das basale γ H2AX-Level allerdings nicht automatisch wie anhand der p53-GOFs zu erkennen ist: T1495-R273H hohes γ H2AX-Level, T1442-R248W intermediäres γ H2AX-Level (ähnlich p53_{WT} T1522), T1371-R175H sehr geringes γ H2AX-Level (geringer als in p53_{WT} T1440).

Die Bestrahlung, unabhängig von der Bestrahlungsdosis, führte in allen untersuchten SLGC-Linien innerhalb von 6 h zu einer Steigerung bzw. Induktion der Phosphorylierung des Histons H2AX (am schwächsten im Klon T1447 cl4-N239D, der initial das höchste γH2AX-Level aufwies) und blieb über fünf Tage im Vergleich zum basalen Level erhöht (besonders stark im Fall von T1371-R175H mit dem initial geringsten γ H2AX-Level). Der Zeitpunkt der maximalen γ H2AX-Expression und der Verlauf des γ H2AX-Levels über die Messtage war in den p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H), nicht aber in den beiden p53wT-Linien (T1440, T1522), dosisunabhängig, jedoch zelllinienspezifisch. Die Induktion der Phosphorylierung von H2AX schien in den bestrahlten SLGC-Kulturen nicht mit der verwendeten Dosis zu korrelieren, obwohl das anhand des Modells von Tommasino et al. (2015) zu erwarten wäre. Auch ließ sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen p53-Status und Stärke der γH2AX-Induktion bzw. dem Verlauf über fünf Tage feststellen. Doppelbehandelte Kulturen einer p53_{WT}-Linie (T1522) sowie von drei p53-Mutanten (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) wiesen im Vergleich zur effizienteren Einfachbehandlung keine Steigerung der maximalen Phosphorylierung von H2AX auf. Es zeigte sich, dass die Induktion von γ H2AX und dessen Verlauf von der Art der Behandlung abhingen und gleichzeitig zelllinienspezifisch, aber eher unabhängig vom p53-, MGMT- bzw. PTEN-Status und dem Sox2-Level waren.

Zudem zeigte sich, dass nicht nur das γ H2AX-Level an sich, sondern auch der Anteil positiver Zellen variierte. Dabei wurde der Anteil stark γ H2AX-positiver Zellen bereits innerhalb von ein (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) bis zwei Stunden (T1371-R175H) nach der Bestrahlung mit 5 Gy erhöht, allerdings mit unterschiedlicher Effizienz (sehr hoch: T1371-R175H, T1442-R248W; gering: T1447 cl4-N239D, T1495-R273H). Dass SLGC-Linien nicht identisch reagieren, wird durch Untersuchungen von Lim et al., (2012) unterstützt. Die Koapplikation von 100 μ M TMZ und 5 Gy Bestrahlung steigerte den Anteil γ H2AX-positiver Zellen im Vergleich zu den Einfachbehandlungen in drei p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1442-R248W, T1495-R273H) zunächst nur gering, zeigte jedoch einen erneuten Anstieg des Anteils 24 h nach der Behandlung (besonders ausgeprägt in doppelbehandelten T1442-R248W- sowie T1495-R273H-Kulturen), der ebenfalls nach der alleinigen TMZ-Behandlung, nicht aber der alleinigen Bestrahlung, zu beobachten war. Der Anteil γ H2AX-positiver Zellen 24 h nach den Behandlungen korrelierte allerdings nicht mit dem γ H2AX-Level am Tag d1. Ebenso verhielt es sich mit den Veränderungen des Anteils γ H2AX-positiver Zellen nach den Behandlungen über die Tage. So war in zwei bestrahlten SLGC-Linien (T1371-R175H, T1447 cl4-N239D)

der Anteil stark γH2AX-positiver Zellen im Vergleich zu den anderen beiden p53-Mutanten (T1442-R248W, T1495-R273H) um einen Tag verzögert erneut angestiegen (Tag d2), während das γH2AX-Level in allen Linien bereits nach 6 h anstieg. Die zusätzliche Gabe von TMZ erhöhte den Anteil γH2AXpositiver Zellen relativ zu den Einfachbehandlungen in zwei von vier p53_{mut}-Linien (T1442-R248W, T1495-R273H), hinsichtlich des yH2AX-Levels brachte die Doppelbehandlung jedoch nur in einem Fall (T1371-R175H) einen Benefit. Zudem war nach der TMZ-Einfachbehandlung der Anteil yH2AX-positiver Zellen im Fall von drei Linien (T1371-R175H, T1442-R248W, T1495-R273H) über fünf Messtage ähnlich hoch oder höher als nach der alleinigen Bestrahlung, während das vH2AX-Level nach der TMZ-Behandlung in zwei Fällen (T1371-R175H, T1447 cl4-N239D) über den gesamten Messraum geringer war und in zwei Fällen (T1442-R248W, T1495-R273H) erst am Tag d3 (T1442-R248W) bzw. d5 (T1495-R273H) den γH2AX-Level der alleinigen Bestrahlung überstieg. Die fehlende Korrelation zwischen dem γH2AX-Expressionslevel und dem Anteil γH2AX-positiver Zellen lässt darauf schließen, dass zwar stark γH2AX-positive Zellen zum γH2AX-Signal beitragen, aber vor allem die Veränderung der γH2AX-Expression in schwach positiven Zellen zum γH2AX-Level der gesamten Kultur beiträgt, weshalb für die Untersuchungen zur Phosphorylierung von H2AX in den Klonkulturen nicht nur stark γH2AX-positive Zellen, sondern auch Zellen mit einem moderaten yH2AX-Signal berücksichtigt wurden. Die Analysen zeigten, dass es unabhängig vom p53-Status der Mutterkultur und der basalen H2AX-Phosphorylierung zu einer Anreicherung γH2AX-positiver Zellen kam, wobei in allen bestrahlten T1371-, T1442-, T1522-Klonen, ob in Ab- oder Anwesenheit von TMZ, nach ein bis zwei Stunden nahezu 100% der Zellen γH2AX aufwiesen. Die Koapplikation von TMZ verzögerte die Reduktion der Phosphorylierung von H2AX in allen T1371-, T1447-, T1522-Klonen und in zwei T1442-Klonen (T1442 cl14, cl16). Im Fall der Klonkulturen wurde der Anteil γH2AX-positiver Zellen nur in vier Klonen (T1447 cl1, T1447 cl4, T1522 cl7, T1522 cl10) 24 h nach der Doppelbehandlung erneut erhöht. Die Effizienz der Induktion von γH2AX in TMZ-behandelten Kulturen variierte klonspezifisch und war unabhängig von der Mutterkultur. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Zellen einer SLGC-Linie eine unterschiedliche Sensitivität vor allem gegenüber TMZ, weniger gegenüber Bestrahlung, aufwiesen. Die klonalen Unterschiede in der Therapieantwort werden durch Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen unterstützt (Meyer et al., 2015; Sottoriva et al., 2013).

Das Histon H2AX wird unter anderem von der aktivierten Kinase ATM in Folge von Doppelstrangbrüchen phosphoryliert (Ivashkevich et al., 2012). Es zeigte sich, dass es sowohl nach Bestrahlung mit 5 Gy als auch mit der ED₅₀ in allen SLGC-Linien, mit Ausnahme der p53_{wT}-Linie T1522 (Effekt nur nach ED₅₀-Bestrahlung), innerhalb von 6 h zur Induktion bzw. Steigerung der Phosphorylierung von ATM kam. Interessanterweise war die Phosphorylierung von ATM nach Bestrahlung mit 5 Gy effizienter und unabhängig vom p53-Status. Während sich die ATM-Phosphorylierung nach der Bestrahlung mit ED₅₀ in allen Linien nach dem initialen Anstieg über die Tage auf Werte unterhalb des basalen Levels reduzierte (Ausnahme T1522), war in mit 5 Gy bestrahlten Kulturen nur in einem Fall (T1447 cl4-N239D) das pATM^{Ser1981}-Level auf das basale Level gesunken, wurde in zwei weiteren Linien (T1440, T1442-R248W) zwar reduziert, blieb allerdings erhöht, und stieg in zwei Fällen (T1371-R175H, T1495-R273H) weiter an. Die Koapplikation von 100 μM TMZ und 5 Gy führte im Vergleich zu den Einfachbehandlungen in keiner Linie zu einer stärkeren Induktion der ATM-Phosphorylierung, sondern lediglich zu einer leichten Verschiebung des Zeitpunkts der maximalen Phosphorylierung (außer in T1447 cl4-N239D). Die alleinige TMZ-Behandlung war ebenfalls in der Lage innerhalb von 6 h die Phosphorylierung von ATM zu induzieren bzw. zu steigern, wobei dieser Anstieg in einer p53_{mut}-Linie (T1447 cl4-N239D) nur transient war, in drei weiteren bis zum Tag d3 (T1371-R175H) bzw. d4 (T1442-R248W) weiter zunahm bzw. nach einer transienten Reduktion erneut anstieg (T1495-R273H) sowie in der p53_{WT}-Linie T1440 nach dem initialen Anstieg leicht sank und auf einem erhöhten Level verharrte. In Kulturen der p53_{WT}-Linie T1440 sowie im Fall von zwei p53-Mutanten (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D) war die Induktion der ATM-Phosphorylierung durch Bestrahlung effizienter als durch die TMZ-Einfachbehandlung, während es in einer p53-Mutante (T1371-R175H) umgekehrt war und es in der vierten p53_{mut}-Linie (T1495-R273H) kaum einen Unterschied gab. Insgesamt wurde ATM in allen SLGC-Linien durch Bestrahlung bzw. Temozolomid aktiviert (im Fall von T1522 nur durch Bestrahlung mit ED₅₀), zeigte allerdings sowohl in der Induktion als auch im Verlauf über fünf Tage zelllinien- und behandlungsspezifische Effekte, die PTEN-unabhängig Möglicherweise p53-, MGMTund waren. war die Stärke der behandlungsinduzierten ATM-Phosphorylierung negativ mit der Höhe des Sox2-Levels korreliert (vergleiche T1447 cl4-N239D und T1495-R273H (geringe Sox2-Level) mit T1371-R175H (moderates Sox2-Level) oder T1442-R248W und p53_{wT} T1440 (hohe Sox2-Level)).

Die aktivierte Kinase ATM phosphoryliert neben H2AX auch die Kinase Chk2 (Ropolo et al., 2009). So war in allen SLGC-Linien innerhalb von 6 h eine strahleninduzierte Phosphorylierung von Chk2 am Serylrest S19 zu beobachten, besonders stark in T1495-R273H. Nach Bestrahlung mit ED₅₀ war die Löschung des pChk2^{Ser19}-Signals, mit Ausnahme von T1371-R175H, langsamer als nach Bestrahlung mit 5 Gy. Dabei blieb das pChk2^{Ser19}-Level in zwei p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1495-R273H) auch nach 5 Gy deutlich über dem basalen Level. Die zusätzliche Gabe von TMZ steigerte das pChk2^{Ser19}-Level im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung nur im Fall der p53wT-Linie T1440, verlangsamte allerdings in zwei p53_{mut}-Linien (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D) die Reduktion des pChk2^{Ser19}-Levels drastisch und hatte im Fall von zwei weiteren p53-Mutanten (T1371-R175H, T1495-R273H) keinen Benefit. Somit scheint der MGMT-Status das pChk2^{Ser19}-Level zu beeinflussen. Die Einfachbehandlung mit TMZ führte in einer p53_{WT}- (T1440) und drei p53_{mut}-Linien (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) zu einer Induktion bzw. einer Steigerung der Chk2-Phosphorylierung, besonders stark im Fall der p53_{WT}-Linie, nicht aber im Fall der anderen p53_{WT}-Linie (T1522) und der vierten p53-Mutante (T1371-R175H). In allen SLGC-Linien, mit Ausnahme von T1440, war die strahleninduzierte Phosphorylierung von Chk2 höher als nach alleiniger TMZ-Behandlung. Diese Beobachtung ist dadurch zu erklären, dass Chk2 in der Regel durch ATM phosphoryliert wird, welche selbst vor allem durch Bestrahlung aktiviert wird (Abraham, 2001). Allerdings ist ebenfalls eine Phosphorylierung von Chk2 nach TMZ-Behandlung möglich (Annovazzi et al., 2015). Die besonders hohe Sensitivität gegenüber TMZ und die gleichzeitig hohe Strahlenresistenz erklären die abweichende Beobachtung im Fall der T1440-Linie. Die höchsten, behandlungsinduzierten pChk2^{Ser19}-Level wurden in der p53_{wT}-Linie T1440 und der p53-Mutante T1495-R273H festgestellt, die sich bezüglich des PTEN-Status (PTEN-positiv) von den anderen untersuchten Linien unterscheiden, wobei in T1440-Kulturen in Anwesenheit von TMZ das pChk2^{Ser19}-Level drastisch gesteigert wurde, was mit der Abwesenheit von MGMT zusammenhängen könnte. Der p53-Status und das Sox2-Level scheinen keinen Einfluss auf die Induktion der Chk2-Phosphorylierung nach den Behandlungen zu nehmen. Dabei wurde beschrieben, dass CD133- und Sox2-positive Zellen die Chk2 effizienter aktivieren als CD133-negative Zellen (Bao et al., 2006). Jedoch wurde bei diesen Analysen weder der p53-Status noch das absolute Sox2-Level betrachtet, sondern nur der Anteil CD133-positiver Zellen. Obwohl der MGMT- und der PTEN-Status einen Einfluss auf die Effizienz der Induktion der Chk2-Phosphorylierung und dessen Variation über fünf Messtage haben, scheint es darüber hinaus zelllinien- und behandlungsspezifische Effekte zu geben.

Parallel zu ATM werden DNA-Schäden, besonders solche, die durch Chemotherapeutika induziert werden, von der Kinase ATR erkannt, dessen Signaltransduktion vor allem über die Kinase Chk1 läuft (Abraham, 2001; Leung-Pineda et al., 2006). Es zeigte sich, dass die Bestrahlung mit der ED₅₀ in allen SLGC-Linien (mit Ausnahme der p53_{WT}-Linie T1522) zur Induktion bzw. Steigerung der Phosphorylierung von Chk1 am Serylrest S317 führte, während eine Erhöhung des pChk1^{Ser317}-Levels nach Bestrahlung mit 5 Gy nur für die p53_{WT}-Linie T1440 und zwei p53-Mutanten (T1442-R248W, T1495-R273H) beobachtet wurde. Im Fall der anderen beiden p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1447 cl4-

N239D) wurde die Chk1-Phosphorylierung kaum (T1371-R175H) bzw. nicht (T1447 cl4-N239D) erhöht, sondern lediglich zunehmend reduziert, was mit dem hohen, basalen pChk1^{Ser317}-Level zusammenhängen könnte. Somit wurde die Chk1, anders als beschrieben (Ahmed et al., 2015; Bao et al., 2006; Lim et al., 2012), nicht in allen SLGC-Linien effizient aktiviert. Die Reduktion des Chk1-Signals im Fall des Klons T1447 cl4-N239D ist nicht zwangsläufig strahleninduziert, da beobachtet wurde, dass die Chk1-Phosphorylierung auch in kontrollbehandelten Kulturen über die Tage abnimmt (eigene Daten und Annovazzi et al., 2015). Die Löschung des pChk1^{Ser317}-Signals war in bestrahlten T1371-R175H- und T1495-R273H-Kulturen langsamer als in T1442-R248W- und T1447 cl4-N239D-Kulturen. Durch die Koapplikation von TMZ wurde die Chk1 in allen p53-Mutanten sowie der p53_{WT}-Linie T1440, nicht aber in T1522, phosphoryliert, wobei in T1440 und drei p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D) sowohl die Bestrahlung als auch die Behandlung mit TMZ zum Effekt der Doppelbehandlung beitrug und in T1440 sowie zwei p53-Mutanten (T1371-R175H, T1447 cl4-N239D) sogar den maximalen Phosphorylierungsgrad erhöhte. Im Vergleich dazu wurde die Phosphorylierung nach der Einfachbehandlung mit TMZ in drei p53_{mut}- (T1371-R175H, T1442-R248W, T1495-R273H) und einer p53_{WT}-Linie (T1440) induziert bzw. gesteigert, während T1447 cl4-N239D wie bereits nach der alleinigen Bestrahlung auch nach der TMZ-Einfachbehandlung ausschließlich das pChk1^{Ser317}-Level senkte (anders als nach der kombinierten Behandlung). Die MGMT-positiven Zelllinien (T1371-R175H, T1495-R273H) reduzierten das pChk1^{Ser317}-Level schneller als die MGMT-negativen Linien (T1440, T1442-R248W, bedingt T1447 cl4-N239D (hier nur Reduktion)), was mit der höheren Anzahl an Schäden in MGMT-negativen Zellen zusammenhängen könnte (Annovazzi et al., 2015) und auf eine effizientere Eliminierung von TMZ-induzierten Schäden in MGMT-positiven Zellen hindeutet. Zudem zeigten behandelte Kulturen von T1440 und T1495-R273H wie bereits im Fall der Chk2-Phosphorylierung hohe pChk1^{Ser317}-Level, was mit der Expression von PTEN assoziiert sein könnte. Sowohl der p53-Status als auch das Sox2-Level scheinen die Induktion der Chk1-Phosphorylierung nicht zu beeinflussen. Wie im Fall der Aktivierung von Chk2 nehmen der MGMT- und PTEN-Status einen Einfluss auf die Effizienz der Induktion der Chk1-Phosphorylierung und dessen Variation über fünf Messtage, allerdings sind darüber hinaus zelllinien- und behandlungsspezifische Effekte zu beobachten.

Die aktivierten Kinasen ATM, Chk2 und Chk1 sind in der Lage p53 zu phosphorylieren, was unter anderem zur Akkumulierung von p53 beiträgt (Abraham, 2001; Kastan und Bartek, 2004). Es zeigte sich, dass es in allen SLGC-Linien zu einem strahleninduzierten Anstieg des p53-Levels kam, wobei der Anstieg in den p53_{wt}-Linien, insbesondere in T1440, höher war als in den p53-Mutanten. Während es in einer $p53_{WT}$ (T1522) und zwei $p53_{mut}$ -Linien (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D) nach ein bis zwei Tagen zu einer Reduktion des p53-Levels kam, blieb das Level im Fall der zweiten p53_{wt}-Linie (T1440) und den zwei anderen p53-Mutanten (T1371-R175H, T1495-R273H) erhöht (T1495-R273H) bzw. nahm sogar noch weiter zu (T1440, T1371-R175H). Die zusätzliche Gabe von TMZ erhöhte im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung in allen SLGC-Linien das p53-Level, mit Ausnahme von T1447 cl4-N239D. Zudem war die Reduktion, die nach der alleinigen Bestrahlung beobachtet wurde, verlangsamt (T1447 cl4-N239D, bedingt T1442-R248W) bzw. nur transient (T1522). Die TMZ-Einfachbehandlung führte nur im Fall der p53_{wt}-Linie T1440 zu einem kontinuierlichen Anstieg des p53-Levels, während in der anderen p53_{WT}-Linie T1522 das erhöhte Level erhalten blieb, in einer p53-Mutante (T1371-R175H) es kaum zu einer Induktion kam und in den anderen drei p53_{mut}-Linien (T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) sich das TMZ-induzierte p53-Level reduzierte. Trotz bereits hoher, basaler p53-Level konnte das p53-Level in den p53_{mut}-Linien nach den Behandlungen weiter gesteigert werden, ähnlich stark wie in der p53_{WT}-Linie T1522, aber deutlich geringer als in Extrakten der zweiten p53_{WT}-Linie T1440. Der behandlungsinduzierte Anstieg des p53-Levels schien unabhängig vom Sox2-Level zu sein. Zudem ließ sich keine eindeutige Korrelation zum p53-, MGMT- bzw. PTEN-Status feststellen. Möglicherweise ist die Kombination aus p53wt und PTEN-Expression in T1440 für die deutliche Erhöhung des p53-Levels nach Bestrahlung bzw. das zusätzliche Fehlen der MGMT-Expression für den Anstieg des p53-Levels in Anwesenheit von TMZ verantwortlich.

Bisher wurde den Gliomstammzellen eine höhere Resistenz gegenüber Bestrahlung zugeschrieben als den nicht-Gliomstammzellen, was mit einer höheren, strahleninduzierten Aktivierung sowie einer bereits basalen Aktivierung von ATM, Chk2 und Chk1 assoziiert war (Bao et al., 2006; Ropolo et al., 2009). Bei diesen Analysen wurden jedoch Unterschiede in den Mutationen der untersuchten Gliomzellen nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass der Stammzellcharakter das Antwortverhalten der SLGC-Linien kaum beeinflusst (nur im Fall der Aktivierung von ATM möglicherweise Korrelation; siehe Tab. 20). Viel eher ist ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung der checkpoint kinases Chk1 sowie Chk2 und dem MGMT- bzw. PTEN-Status zu erkennen, wobei der PTEN-Status vor allem nach Bestrahlung und der MGMT-Status in Anwesenheit von TMZ eine Rolle zu spielen scheint. Weiterhin scheint der MGMT-Status Auswirkungen auf die Modulierung des p21^{Cip1/WAF1}-Levels in Antwort auf eine TMZ-Behandlung zu haben. Die p53_{WT}-Linie T1440 erwies sich in Vorversuchen als besonders strahlenresistent, jedoch TMZ-sensitiv. Möglicherweise hängt das mit der genetischen Situation zusammen. Da weder p53 mutiert ist noch ein Verlust von PTEN vorliegt, kann die DNA-Schadenserkennung womöglich ungehindert eingeleitet und DNA-Schäden repariert werden, was zur Strahlenresistenz beiträgt und aufgrund des zusätzlichen Fehlens von MGMT die hohe TMZ-Sensitivität erklären würde. Die hohe Strahlensensibilität der zweiten p53_{wt}-Linie T1522 scheint mit der ineffizienten Aktivierung von ATM, Chk2 und Chk1 zusammenzuhängen, obwohl das p53-Level und insbesondere das p21^{Cip1/WAF1}-Level effizient induziert wurden. Damit im Einklang wurde beschrieben, dass die Behandlung mit Inhibitoren der checkpoint kinases oder der Kinasen ATM bzw. ATR die Strahlensensibilität erhöhen (Ahmed et al., 2015; Bao et al., 2006). Im Fall der vier p53_{mut}-Linien wurden nur geringe Ähnlichkeiten bezüglich der behandlungsspezifischen Antworten beobachtet, was in der Art der p53-Mutation begründet sein könnte. So weist die T1371-R175H-Linie ein falsch gefaltetes p53-Protein auf, welches weder in der Lage ist als Transkriptionsfaktor an der DNA zu binden, noch mit anderen Proteinen, die üblicherweise eine Interaktion mit p53 aufweisen (z.B. Transkriptionsfaktoren), zu interagieren und eine gain-of-function (GOF) aufweist (Muller und Vousden, 2013, 2014). Im Gegensatz dazu weisen die DNA-Kontaktmutanten (T1442-R248W, T1495-R273H; beides GOFs (Muller und Vousden, 2014)) eine nahezu unveränderte Proteinstruktur auf und können somit weiterhin mit anderen Proteinen interagieren, binden jedoch nicht mehr an den standard response elements des p53, z.B. den p21^{Cip1/WAF1}-Promotor (Joerger und Fersht, 2007). Über die p53-missense-Mutation, die in der T1447-Linie sowie in Klon T1447 cl4 (N239D) vorliegt, ist bekannt dass das mutierte p53-Protein noch eine 20%ige, transkriptionelle Aktivität für p21^{Cip1/WAF1}, MDM2 und BAX besitzt (Soussi et al., 2005).

Somit zeigten die zwei p53_{wT}-Linien sowie die vier p53_{mut}-Linien nur geringe Übereinstimmungen in ihrem behandlungsspezifischen Antwortverhalten, sodass dieses in der Regel zelllinienspezifisch war. Vor allem scheinen genetische Veränderungen, wie die p53-Mutation, der Verlust von PTEN, das Fehlen von MGMT oder Mutationen in beteiligten Proteinen (z.B. ATM oder ATR), für die zelllinienspezifische Induktion der DNA-Schadensantwort verantwortlich zu sein und nicht der Grad des Stammzellcharakters.

Zell- linie	p53- Status	PTEN	MGMT	Sox2	γΗ2ΑΧ	рАТМ	pChk2	pChk1	p53	p21
T1371	mut. (R175H)	-	++	+	х	(S)	(M;P)	(M;P)	х	(p53;M)
T1442	mut. (R248W)	-	-	++	х	(S)	(M;P)	(M;P)	х	(p53;M)
T1447 cl4	mut. (N239D)	-	-	+	х	(S)	(M;P)	(M;P)	х	(p53;M)
T1495	mut. (R273H)	++	+	(+)	х	(S)	(M;P)	(M;P)	х	(p53;M)
T1440	WT	++	-	++	х	(S)	(M;P)	(M;P)	(p53+ P+M)	(p53;M)
T1522	WT	-	++	+	x	(S)	(M:P)	(M:P)	X	(p53:M)

Tab.20:KorrelationzwischengenetischemHintergrundundbehandlungsspezifischemAntwortverhalten in SLGC-Linien und Klonen.

p53, Tumorsuppressorprotein p53; PTEN, *phosphatase and tensin homolog*; MGMT, O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; Sox2, *sex determining region Y-box* 2; γH2AX, phosphoryliertes Histon H2AX (S139); pATM, phosphorylierte Kinase ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*; S1981); pChk2, phosphorylierte *checkpoint kinase* 2 (S19); pChk1, phosphorylierte *checkpoint kinase* 1 (S317); p21, Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1/WAF1}; mut., mutiert; R175H, Arginin 175 durch Histidin ersetzt; R273H, Arginin 273 durch Histidin ersetzt; R248W, Arginin 248 durch Tryptophan ersetzt; N239D, Asparagin 239 durch Aspartat ersetzt; -, keine Proteinexpression; (+), schwache Proteinexpression; +, moderate Proteinexpression; ++, starke Proteinexpression; n.d., nicht bestimmt; (S), möglicherweise Korrelation mit Sox2-Level; (M), möglicherweise Korrelation mit MGMT-Status; (P), möglicherweise Korrelation mit PTEN-Status; (p53), möglicherweise Korrelation mit p53-Status; X, keine Korrelation.

Um zu prüfen, ob es zu einer behandlungsbedingten Anreicherung von z.B. CD133-positiven Zellen kommt, habe ich zusätzlich die Expression von stammzellassoziierten Markerproteinen in behandelten SLGC- und Klonkulturen untersucht.

5.5. Stammzellgrad in SLGC-Mutterkulturen und Klonen nach Bestrahlung und/oder Temozolomid-Behandlung

Zunächst habe ich geprüft, ob die TMZ-Einfachbehandlung zu einer Anreicherung oder Eliminierung von CD133-positiven Zellen führt, wie von Liu und Kollegen (Liu et al., 2006) bzw. Beier und Kollegen (Beier et al., 2008) beschrieben. Es zeigte sich, dass es in keiner untersuchten SLGC-Linie zu einer Anreicherung von CD133-positiven Zellen nach Behandlung mit TMZ (EC₅₀: 100 – 200 μ M) kam, sondern im Fall zweier p53-Mutanten (T1371-R175H, T1442-R248W) sogar zu einer drastischen Reduktion des Anteils CD133-positiver Zellen. Dabei handelte es sich in der Tat um eine Eliminierung von CD133-positiven Zellen, wie exemplarische Analysen hinsichtlich der *cd133*-Expression von TMZ-behandelten T1495-R273H-Kulturen zeigten. Zudem zeigte sich, dass in der p53_{wt}-Linie T1440 und in einer p53-Mutante (T1442-R248W) die Sox2-Proteinexpression nach TMZ-Behandlung linear anstieg, was jedoch im Fall von T1442-R248W mit einer leichten Senkung der Anzahl Sox2-positiver Zellen assoziiert war (für T1440 nicht untersucht). Im Fall der zweiten p53_{wt}-Linie (T1522) sowie den anderen vier p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1447 cl4-N239D, T1452 cl10-*splice*-Mutante, T1495-R273H) stieg das Sox2-Level nur transient an (innerhalb von 6 h bis 48 h) und korrelierte nicht mit der Anzahl Sox2-positiver Zellen. Exemplarische Untersuchungen am Klon T1447 cl4-N239D ergaben allerdings, dass langfristig nach der TMZ-Behandlung die überlebenden Zellen im Vergleich zur kontrollbehandelten

Kultur ein höheres Sox2- und FABP7-Level aufwiesen, was auf einen TMZ-induzierten Anstieg des Stammzellcharakters bzw. eine Eliminierung weiter differenzierter Zellen hindeuten könnte.

In zwei p53-Mutanten (T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) nahm der Anteil Sox2-positiver Zellen nach der Behandlung mit TMZ zu (im Fall von T1447 cl4-N239D allerdings ebenso in der Kontrolle), während es in drei p53_{mut}-Linien zu einer leichten (T1442-R248W, T1452 cl10-*splice*-Mutante) bzw. starken (T1371-R175H) Eliminierung positiver Zellen kam. In allen p53-Mutanten führte die Behandlung mit TMZ zu einer leichten (T1452 cl10-splice-Mutante), moderaten (T1447 cl4-N239D) bis starken Reduktion (T1371-R175H, T1442-R248W, T1495-R273H) Nestin-positiver Zellen, die unabhängig von der Anzahl Sox2-positiver Zellen war. Somit führte die Behandlung mit TMZ zu einer partiellen Eliminierung von CD133-positiven Zellen, einer Reduktion Nestin-positiver Zellen und in Zelllinien mit einem hohen, basalen Anteil Sox2-positiver Zellen (T1371-R175H, T1442-R248W, T1452 cl10-splice-Mutante) zu einer Reduktion Sox2-positiver Zellen, allerdings in Zellen mit einem geringen Anteil (T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) zu einer Anreicherung. Das spricht dafür, dass die TMZ-Behandlung in zwei p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1442-R248W) zu einer Depletion von SLGCs führte wie sie von Beier et al. (2008) beschrieben wurde, während es in T1495-R273H-Kulturen zu einer Anreicherung von CD133-negativen SLGCs kam. Es ließ sich keine Korrelation zwischen dem MGMT-Status und der Abnahme Sox2-positiver Zellen in TMZ-behandelten Kulturen feststellen. Zudem war die Eliminierung CD133-positiver Zellen nicht mit dem Anteil Sox2-positiver Zellen bzw. dem Sox2-Level korreliert. Möglicherweise sind ABC-Transporter für das unterschiedliche Antwortverhalten verantwortlich (Bleau et al., 2009; Nakai et al., 2009).

Die publizierten Daten zur Bestrahlung argumentieren übereinstimmend, dass es nach der Bestrahlung zu einer Anreicherung CD133-positiver Zellen kommt (Bao et al., 2006; Kawamoto et al., 2012; Tamura et al., 2013). Dies konnte mit den hier untersuchten SLGC-Linien nicht bestätigt werden. Sechs bis sieben Tage nach Bestrahlung mit 5 Gy wiesen alle Linien unabhängig vom p53- bzw. PTEN-Status in vitro eine Reduktion des Anteils CD133-positiver Zellen auf, die zwischen den Zelllinien variierte und im Fall einer p53_{mut}-Linie (T1371-R175H) besonders stark ausfiel. Dabei verwendeten Bao und Kollegen (2006) ebenfalls eine Bestrahlungsdosis von 5 Gy, ermittelten den Anteil CD133-positiver Zellen allerdings bereits nach zwei Tagen. Zudem bestimmten sie die strahleninduzierte Veränderung des Anteils CD133-positiver Zellen nur am Beispiel einer Zelllinie (D54MG), die ein p53wt-Gen besaß und im pten-Gen mutiert war (Hambardzumyan et al., 2006). Im Gegensatz zu den Arbeiten anderer Forschergruppen wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die *cd133*-Expression in mit 20 Gy bestrahlten T1495-Kulturen bestimmt. Die Analyse wies eine stetige Senkung der cd133-Expression auf, was ebenfalls auf eine Eliminierung CD133-positiver Zellen in bestrahlten T1495-R273H-Kulturen hindeutet. Unter Berücksichtigung der in unserem Labor gewonnenen Daten (siehe Tab. 28; eigene Daten, Masterarbeit G. Huber und C. Zechel, persönliche Mitteilung) lässt sich schlussfolgern, dass es sowohl zu einem Anstieg, einer Reduktion oder keiner Veränderung des Anteils CD133-positiver Zellen nach der Bestrahlung kommen kann, wobei eine Anreicherung nur in zwei von 24 Fällen (T1371 cl2, T1447 cl6) beobachtet wurde.

Da CD133 nur SLGCs eines bestimmten Differenzierungsstatus erfasst (Chen et al., 2010), wurde im Folgenden untersucht, ob die Bestrahlung zu einer Anreicherung anderer stammzellassoziierter Faktoren führt. So zeigte sich, dass im Fall der p53_{WT}-Linie T1440 und zweier p53-Mutanten (T1442-R248W, T1452 cl10-*splice*-Mutante) die Sox2-Proteinexpression nach Bestrahlung mit 5 Gy linear (T1440, T1442-R248W) bzw. ab Tag d4 (T1452 cl10-*splice*-Mutante) anstieg, wobei im Fall der p53-Mutanten gleichzeitig eine leichte Reduktion der Anzahl Sox2-positiver Zellen zu beobachten war (für T1440 nicht untersucht). Im Fall der zweiten p53_{WT}-Linie (T1522) und einer weiteren p53-Mutante

(T1495-R273H) nahm die Sox2- Proteinexpression nur transient zu, was in bestrahlten T1495-R273H-Kulturen nicht eindeutig mit der Anzahl Sox2-positiver Zellen assoziiert war (für T1522 nicht untersucht). Im Vergleich dazu variierte die Sox2-Proteinexpression nach Bestrahlung im Fall von T1371-R175H kaum, wobei gleichzeitig die Anzahl Sox2-positiver Zellen transient sank, und im Fall der fünften p53_{mut}-Linie T1447 cl4-N239D wurde sogar eine transiente Reduktion der Sox2-Proteinexpression beobachtet, während der Anteil Sox2-positiver Zellen zunahm (allerdings auch nach der Kontrollbehandlung). Somit kam es in drei p53-Mutanten (T1371-R175H, T1442-R248W, T1452 cl10-splice-Mutante) zu einer geringfügigen Eliminierung von Sox2-positiven Zellen (im Fall von T1371-R175H transient), während sich der Anteil Sox2-positiver Zellen in einer p53_{mut}-Linie (T1495-R273H) kaum veränderte und in einer weiteren erhöhte (T1447 cl4-N239D, allerdings auch in der Kontrolle). Gleichzeitig war hinsichtlich des Anteils Nestin-positiver Zellen in allen p53_{mut}-Linien lediglich eine geringfügige Reduktion festzustellen. Die Bestrahlung führte somit zwar zu einer Reduktion des Anteils CD133-positiver Zellen, in vier von fünf p53-Mutanten (T1371-R175H, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) allerdings weniger effizient als die TMZ-Behandlung, jedoch nicht zu einer Anreicherung von Zellen mit einem hohen Stammzellcharakter. Dies unterstützend war in den Untersuchungen zur Klonogenität bestrahlter Kulturen zu beobachten, dass die Klone, die die Bestrahlung mit 5 Gy überlebten, entweder wie die Ausgangskultur kein Sox2 (T1495 RT-Klone) exprimierten oder relativ zur Ausgangskultur ein reduziertes Sox2-Level (T1452 cl10 RT-Klon) aufwiesen. Zudem war das FABP7-Expressionslevel ebenfalls geringer, sodass kein Hinweis auf eine strahleninduzierte Steigerung des Stammzellcharakters bzw. auf eine Anreicherung von Zellen mit einem hohen Stammzellgrad existiert.

Bisher existiert nur eine Untersuchung bezüglich des Effekts der Doppelbehandlung mit TMZ und Bestrahlung auf den Anteil CD133-positiver Zellen in SLGC-Linien (Yahyanejad et al., 2016). Die Analysen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass die Doppelbehandlung in vier p53_{mut}-Linien (T1371-R175H, T1442-R248W, T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) CD133-positive Zellen effizienter eliminierte als die Einfachbehandlungen, was durch die Reduktion der cd133-Expression in doppelbehandelten T1495-Kulturen unterstrichen wird. Die Reduktion der Anzahl CD133-positiver Zellen war im Fall von zwei p53_{mut}-Linien (T1442-R248W, T1452 cl10-splice-Mutante) mit einem Anstieg der Sox2-Proteinexpression assoziiert, allerdings bei geringer, gleichzeitiger Senkung des Anteils Sox2-positiver Zellen. Im Vergleich dazu war in einer p53_{WT}-Linie (T1522; für T1440 gab es Probleme mit den Materialmengen an späteren Tagen) und zwei p53-Mutanten (T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) ein transienter Anstieg des Sox2-Levels zu verzeichnen, der nicht mit dem Anteil Sox2-positiver Zellen korrelierte, während in der fünften p53-Mutante (T1371-R175H) das Sox2-Level leicht und die Anzahl Sox2-positiver Zellen sogar stark abnahm. Während die Doppelbehandlung in zwei p53_{mut}-Linien (T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) zu einer Anreicherung Sox2-positiver Zellen führte, nahm die Anzahl in drei p53-Mutanten leicht (T1442-R248W, T1452 cl10-splice-Mutante) bzw. stark (T1371-R175H) ab. Gleichzeitig reduzierte sich der Anteil Nestin-positiver Zellen in allen p53-Mutanten leicht (T1447 cl4-N239D), mäßig (T1371-R175H, T1452 cl10-splice-Mutante, T1495-R273H) bzw. stark (T1442-R248W). Die Doppelbehandlung führte trotz partieller Eliminierung CD133- bzw. Nestin-positiver Zellen in zwei p53_{mut}-Linien (T1447 cl4-N239D, T1495-R273H) zu einer Zunahme des Stammzellcharakters. Zusätzliche Analysen des Labors an Klonlinien zeigten, dass es nach der Doppelbehandlung in der Hälfte der Kulturen zu einer Anreicherung von stark Sox2-positiven Zellen kam (siehe Anhang Tab. 29) und somit eher Zellen mit einem geringen Stammzellstatus dezimiert wurden. Jedoch war eine starke, zum Teil interklonale, Variation zu beobachten. Diese Heterogenität könnte erklären, wieso die

kürzlich publizierten Daten von Yahyanejad et al. (2016) nur bedingt unsere Beobachtungen widerspiegeln.

Die durchflusszytometrischen Analysen mit dem CD133-Antikörper sowohl nach Einfachbehandlung mit Photonenstrahlung als auch nach Doppelbehandlung mit TMZ und 5 Gy gaben keinen Hinweis auf eine generelle Anreicherung von CD133-positiven Zellen (nach Bestrahlung nur in zwei Klonen beobachtet). Dass es dennoch zur Anreicherung von Zellen mit einem höheren Stammzellcharakter kommen kann, belegen die Daten der immunzytologischen Analysen mit dem Sox2-Antikörper. Diese zeigten einen Anstieg Sox2-positiver Zellen in einem Drittel (alleinige Bestrahlung) bzw. der Hälfte (Doppelbehandlung) der behandelten Kulturen, wobei ein geringer, basaler Anteil stark Sox2-positiver Zellen mit einem behandlungsinduzierten Anstieg zu korrelieren schien. Insgesamt war das Antwortverhalten nach den Behandlungen zelllinien- und sogar klonspezifisch sowie unabhängig vom MGMT- und PTEN-Status. Somit scheinen deutlich mehr Faktoren als der Stammzellcharakter, der MGMT- oder der PTEN-Status an dem spezifischen Antwortverhalten der SLGC-Linien beteiligt zu sein. Zudem muss bedacht werden, dass es zu einer molekularen Heterogenität in den SLGC-Linien kommen kann.

5.6. Schlussfolgerungen

Die Analysen dieser Arbeit brachten neue Erkenntnisse bezüglich der Heterogenität von SLGC-Linien sowie dessen Einfluss auf die Radio- und Chemotherapie. Es zeigte sich, dass sich die Zellen innerhalb einer SLGC-Linie hinsichtlich ihres Stammzellcharakters unterscheiden und eine hierarchische Organisation aufweisen, die sich jedoch zwischen den SLGC-Linien verschiedener Patienten unterscheidet. Zudem treten Mutationen im Fall einiger SLGC-Linien nur in einer Subpopulation der Tumorzellen auf. Sowohl der Stammzellcharakter als auch die Mutationen beeinflussen die Therapiesensitivität bzw. das Antwortverhalten der SLGC-Linien. Dabei scheint der Stammzellcharakter jedoch eher eine untergeordnete Rolle zu spielen und der genetische Hintergrund (z.B. p53-, PTEN-, MGMT-Status) ausschlaggebend für die Effizienz der Behandlungen zu sein. Dennoch ist hervorzuheben, dass sich die SLGC-Linien und sogar die Klone einer SLGC-Linie zum Teil deutlich in ihrer Therapieantwort unterschieden, sodass das behandlungsspezifische Antwortverhalten auf eine Kombination aus zellulärer und molekularer Heterogenität zurückzuführen ist.

Literaturverzeichnis

Abounader, R. (2009). Interactions between PTEN and receptor tyrosine kinase pathways and their implications for glioma therapy. Expert Rev. Anticancer Ther. *9*, 235–245.

Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. Genes Dev. *15*, 2177–2196.

Adams, J.M., and Strasser, A. (2008). Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? Cancer Res. *68*, 4018–4021.

Adeberg, S., Bernhardt, D., Harrabi, S.B., Diehl, C., Koelsche, C., Rieken, S., Unterberg, A., von Deimling, A., and Debus, J. (2016). Radiotherapy plus concomitant temozolomide in primary gliosarcoma. J. Neurooncol. *128*, 341–348.

Ahmed, S.U., Carruthers, R., Gilmour, L., Yildirim, S., Watts, C., and Chalmers, A.J. (2015). Selective Inhibition of Parallel DNA Damage Response Pathways Optimizes Radiosensitization of Glioblastoma Stem-like Cells. Cancer Res. *75*, 4416–4428.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *100*, 3983–3988.

Alonso, M.M., Diez-Valle, R., Manterola, L., Rubio, A., Liu, D., Cortes-Santiago, N., Urquiza, L., Jauregi, P., Lopez de Munain, A., Sampron, N., et al. (2011). Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. PloS One *6*, e26740.

Annovazzi, L., Caldera, V., Mellai, M., Riganti, C., Battaglia, L., Chirio, D., Melcarne, A., and Schiffer, D. (2015). The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment. Int. J. Oncol. *46*, 2299–2308.

Arai, Y., Funatsu, N., Numayama-Tsuruta, K., Nomura, T., Nakamura, S., and Osumi, N. (2005). Role of Fabp7, a downstream gene of Pax6, in the maintenance of neuroepithelial cells during early embryonic development of the rat cortex. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 9752–9761.

Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M., and Hernandez, F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. Physiol. Rev. *84*, 361–384.

Azuaje, F., Tiemann, K., and Niclou, S.P. (2015). Therapeutic control and resistance of the EGFR-driven signaling network in glioblastoma. Cell Commun. Signal. CCS *13*, 23.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature 444, 756–760.

Barber, L.J., Davies, M.N., and Gerlinger, M. (2015). Dissecting cancer evolution at the macroheterogeneity and micro-heterogeneity scale. Curr. Opin. Genet. Dev. *30*, 1–6.

Beck, B., and Blanpain, C. (2013). Unravelling cancer stem cell potential. Nat. Rev. Cancer 13, 727–738.

Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., and Beier, C.P. (2007). CD133+ and CD133- Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles. Cancer Res. *67*, 4010–4015.

Beier, D., Rohrl, S., Pillai, D.R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L.A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Trampe-Kieslich, A., et al. (2008). Temozolomide Preferentially Depletes Cancer Stem Cells in Glioblastoma. Cancer Res. *68*, 5706–5715.

Beier, D., Schulz, J.B., and Beier, C.P. (2011). Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. Mol. Cancer *10*, 128.

Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., and Wang, R. (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. Biochemica *4*, 14–19.

Bidlingmaier, S., Zhu, X., and Liu, B. (2008). The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. J. Mol. Med. Berl. Ger. *86*, 1025–1032.

Bissonnette, N., Wasylyk, B., and Hunting, D.J. (1997). The apoptotic and transcriptional transactivation activities of p53 can be dissociated. Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell. *75*, 351–358.

Bleau, A.-M., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E.I., Huse, J.T., Brennan, C.W., and Holland, E.C. (2009). PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. Cell Stem Cell *4*, 226–235.

Bohgaki, T., Bohgaki, M., and Hakem, R. (2010). DNA double-strand break signaling and human disorders. Genome Integr. 1, 15.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat. Med. *3*, 730–737.

Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell *122*, 947–956.

Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. Cell *155*, 462–477.

Bromleigh, V.C., and Freedman, L.P. (2000). p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells. Genes Dev. 14, 2581–2586.

Bullock, A.N., Henckel, J., and Fersht, A.R. (2000). Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. Oncogene *19*, 1245–1256.

Cachia, D., Kamiya-Matsuoka, C., Mandel, J.J., Olar, A., Cykowski, M.D., Armstrong, T.S., Fuller, G.N., Gilbert, M.R., and De Groot, J.F. (2015). Primary and secondary gliosarcomas: clinical, molecular and survival characteristics. J. Neurooncol. *125*, 401–410.

Capela, A., and Temple, S. (2006). LeX is expressed by principle progenitor cells in the embryonic nervous system, is secreted into their environment and binds Wnt-1. Dev. Biol. *291*, 300–313.

Casaletto, J.B., and McClatchey, A.I. (2012). Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer. Nat. Rev. Cancer *12*, 387–400.

Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., and Parada, L.F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. Nature *488*, 522–526.

Chen, R., Nishimura, M.C., Bumbaca, S.M., Kharbanda, S., Forrest, W.F., Kasman, I.M., Greve, J.M., Soriano, R.H., Gilmour, L.L., Rivers, C.S., et al. (2010). A Hierarchy of Self-Renewing Tumor-Initiating Cell Types in Glioblastoma. Cancer Cell *17*, 362–375.

Cheng, Q., Cao, H., Chen, Z., Ma, Z., Wan, X., Peng, R., and Jiang, B. (2014). PAX6, a novel target of miR-335, inhibits cell proliferation and invasion in glioma cells. Mol. Med. Rep. *10*, 399–404.

Choschzick, I., Hirseland, E., Cramer, H., Schultz, S., Leppert, J., Tronnier, V., and Zechel, C. (2014). Responsiveness of stem-like human glioma cells to all-trans retinoic acid and requirement of retinoic acid receptor isotypes α , β and γ . Neuroscience *279*, 44–64.

Chu, E.C., and Tarnawski, A.S. (2004). PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res. *10*, RA235-241.

Clément, V., Dutoit, V., Marino, D., Dietrich, P.-Y., and Radovanovic, I. (2009). Limits of CD133 as a marker of glioma self-renewing cells. Int. J. Cancer *125*, 244–248.

Cox, J.L., Wilder, P.J., Gilmore, J.M., Wuebben, E.L., Washburn, M.P., and Rizzino, A. (2013). The SOX2interactome in brain cancer cells identifies the requirement of MSI2 and USP9X for the growth of brain tumor cells. PloS One *8*, e62857.

Dahlrot, R.H., Hansen, S., Herrstedt, J., Schrøder, H.D., Hjelmborg, J., and Kristensen, B.W. (2013). Prognostic value of Musashi-1 in gliomas. J. Neurooncol. *115*, 453–461.

De Rosa, A., Pellegatta, S., Rossi, M., Tunici, P., Magnoni, L., Speranza, M.C., Malusa, F., Miragliotta, V., Mori, E., Finocchiaro, G., et al. (2012). A radial glia gene marker, fatty acid binding protein 7 (FABP7), is involved in proliferation and invasion of glioblastoma cells. PloS One 7, e52113.

Dirks, P.B. (2010). Brain tumor stem cells: The cancer stem cell hypothesis writ large. Mol. Oncol. 4, 420–430.

Djelloul, S., Forgue-Lafitte, M.E., Hermelin, B., Mareel, M., Bruyneel, E., Baldi, A., Giordano, A., Chastre, E., and Gespach, C. (1997). Enterocyte differentiation is compatible with SV40 large T expression and loss of p53 function in human colonic Caco-2 cells. Status of the pRb1 and pRb2 tumor suppressor gene products. FEBS Lett. *406*, 234–242.

Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell *97*, 703–716.

Duan, D., Fu, Y., Paxinos, G., and Watson, C. (2013). Spatiotemporal expression patterns of Pax6 in the brain of embryonic, newborn, and adult mice. Brain Struct. Funct. *218*, 353–372.

Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., and De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. Cell Death Differ. *15*, 504–514.

Fang, L., Zhang, L., Wei, W., Jin, X., Wang, P., Tong, Y., Li, J., Du, J.X., and Wong, J. (2014). A methylation-phosphorylation switch determines Sox2 stability and function in ESC maintenance or differentiation. Mol. Cell *55*, 537–551.

Francescone, R., Scully, S., Bentley, B., Yan, W., Taylor, S.L., Oh, D., Moral, L., and Shao, R. (2012). Glioblastoma-derived tumor cells induce vasculogenic mimicry through Flk-1 protein activation. J. Biol. Chem. *287*, 24821–24831.

Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res. *64*, 7011–7021.

Gangemi, R.M.R., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M.C., Malatesta, P., Ravetti, G.L., Zona, G.L., Daga, A., and Corte, G. (2009). SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. Stem Cells Dayt. Ohio *27*, 40–48.

de Groot, J.F., Fuller, G., Kumar, A.J., Piao, Y., Eterovic, K., Ji, Y., and Conrad, C.A. (2010). Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. Neuro-Oncol. *12*, 233–242.

Günther, H.S., Schmidt, N.O., Phillips, H.S., Kemming, D., Kharbanda, S., Soriano, R., Modrusan, Z., Meissner, H., Westphal, M., and Lamszus, K. (2008). Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. Oncogene *27*, 2897–2909.

Guo, Y., Liu, S., Wang, P., Zhao, S., Wang, F., Bing, L., Zhang, Y., Ling, E.-A., Gao, J., and Hao, A. (2011). Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. Histopathology *59*, 763–775.

Hall, S., Rudrawar, S., Zunk, M., Bernaitis, N., Arora, D., McDermott, C.M., and Anoopkumar-Dukie, S. (2016). Protection against Radiotherapy-Induced Toxicity. Antioxid. Basel Switz. *5*.

Hambardzumyan, D., Squatrito, M., Squartro, M., and Holland, E.C. (2006). Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. Cancer Cell *10*, 454–456.

Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., et al. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. N. Engl. J. Med. *352*, 997–1003.

Hirose, Y., Berger, M.S., and Pieper, R.O. (2001). Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. Cancer Res. *61*, 5843–5849.

Horimoto, Y., Arakawa, A., Sasahara, N., Tanabe, M., Sai, S., Himuro, T., and Saito, M. (2016). Combination of Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD24 Is Superior to ALDH1 as a Prognostic Indicator in Breast Cancer Patients with Distant Metastases. PloS One *11*, e0165253.

Huang, Y., Pastor, W.A., Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D.R., and Rao, A. (2010). The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. PloS One *5*, e8888.

Huse, J.T., and Holland, E.C. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. Nat. Rev. Cancer *10*, 319–331.

Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Saito, N., Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2011). Gliomainitiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. J. Biol. Chem. *286*, 41434–41441.

Ivashkevich, A., Redon, C.E., Nakamura, A.J., Martin, R.F., and Martin, O.A. (2012). Use of the γ-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. Cancer Lett. *327*, 123–133.

Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2007). Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. Oncogene *26*, 2226–2242.

Joo, K.M., Kim, S.Y., Jin, X., Song, S.Y., Kong, D.-S., Lee, J.-I., Jeon, J.W., Kim, M.H., Kang, B.G., Jung, Y., et al. (2008). Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *88*, 808–815.

Jordan, J.J., Inga, A., Conway, K., Edmiston, S., Carey, L.A., Wu, L., and Resnick, M.A. (2010). Altered-Function p53 Missense Mutations Identified in Breast Cancers Can Have Subtle Effects on Transactivation. Mol. Cancer Res. *8*, 701–716.

Kamphuis, W., Mamber, C., Moeton, M., Kooijman, L., Sluijs, J.A., Jansen, A.H.P., Verveer, M., de Groot, L.R., Smith, V.D., Rangarajan, S., et al. (2012). GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. PloS One *7*, e42823.

Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. Nature 432, 316–323.

Kawamoto, A., Tanaka, K., Saigusa, S., Toiyama, Y., Morimoto, Y., Fujikawa, H., Iwata, T., Matsushita, K., Yokoe, T., Yasuda, H., et al. (2012). Clinical significance of radiation-induced CD133 expression in residual rectal cancer cells after chemoradiotherapy. Exp. Ther. Med. *3*, 403–409.

Kiefer, J. (2013). Biologische Strahlenwirkung Eine Einführung in die Grundlagen von Strahlenschutz und Strahlenanwendung (Basel: Birkhäuser Basel).

Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., and Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. Nucleic Acids Res. *36*, 5678–5694.

Kohsaka, S., and Tanak, S. (2013). Chemotherapeutic Agent for Glioma. In Clinical Management and Evolving Novel Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumors, T. Lichtor, ed. (InTech), p.

Kozak, K.R., Mahadevan, A., and Moody, J.S. (2009). Adult gliosarcoma: epidemiology, natural history, and factors associated with outcome. Neuro-Oncol. *11*, 183–191.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature *367*, 645–648.

Lathia, J.D., Gallagher, J., Heddleston, J.M., Wang, J., Eyler, C.E., Macswords, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., et al. (2010). Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. Cell Stem Cell *6*, 421–432.

Leslie, N.R., and Downes, C.P. (2004). PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. Biochem. J. *382*, 1–11.

Leung-Pineda, V., Ryan, C.E., and Piwnica-Worms, H. (2006). Phosphorylation of Chk1 by ATR Is Antagonized by a Chk1-Regulated Protein Phosphatase 2A Circuit. Mol. Cell. Biol. *26*, 7529–7538.

Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Res. *67*, 1030–1037.

Li, Z., Owonikoko, T.K., Sun, S.-Y., Ramalingam, S.S., Doetsch, P.W., Xiao, Z.-Q., Khuri, F.R., Curran, W.J., and Deng, X. (2012). c-Myc suppression of DNA double-strand break repair. Neoplasia N.Y. N *14*, 1190–1202.

Liang, Y., Bollen, A.W., Aldape, K.D., and Gupta, N. (2006). Nuclear FABP7 immunoreactivity is preferentially expressed in infiltrative glioma and is associated with poor prognosis in EGFR-overexpressing glioblastoma. BMC Cancer *6*, 97.

Liffers, K., Lamszus, K., and Schulte, A. (2015). EGFR Amplification and Glioblastoma Stem-Like Cells. Stem Cells Int. *2015*, 427518.

Lim, Y.C., Roberts, T.L., Day, B.W., Harding, A., Kozlov, S., Kijas, A.W., Ensbey, K.S., Walker, D.G., and Lavin, M.F. (2012). A Role for Homologous Recombination and Abnormal Cell-Cycle Progression in Radioresistance of Glioma-Initiating Cells. Mol. Cancer Ther. *11*, 1863–1872.

Little, S.E., Popov, S., Jury, A., Bax, D.A., Doey, L., Al-Sarraj, S., Jurgensmeier, J.M., and Jones, C. (2012). Receptor tyrosine kinase genes amplified in glioblastoma exhibit a mutual exclusivity in variable proportions reflective of individual tumor heterogeneity. Cancer Res. *72*, 1614–1620.

Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., and Yu, J.S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. Mol. Cancer *5*, 67.

Liu, L., Liu, C., Zhang, Q., Shen, J., Zhang, H., Shan, J., Duan, G., Guo, D., Chen, X., Cheng, J., et al. (2016). SIRT1-mediated transcriptional regulation of SOX2 is important for self-renewal of liver cancer stem cells. Hepatol. Baltim. Md *64*, 814–827.

Liu, R.-Z., Monckton, E.A., and Godbout, R. (2012). Regulation of the FABP7 gene by PAX6 in malignant glioma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *422*, 482–487.

Lomonaco, S.L., Finniss, S., Xiang, C., Decarvalho, A., Umansky, F., Kalkanis, S.N., Mikkelsen, T., and Brodie, C. (2009). The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. Int. J. Cancer *125*, 717–722.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Acta Neuropathol. (Berl.) *114*, 97–109.

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. (Berl.) *131*, 803–820.

Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., and Herskind, C. (2016). Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. Int. J. Mol. Sci. *17*, 102.

Maniatis, T., Sambrook, J., and Fritsch, E. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual: Vol. 2 (S.I.: Cold Spring Harbor).

Mayes, D.A., Hu, Y., Teng, Y., Siegel, E., Wu, X., Panda, K., Tan, F., Yung, W.K.A., and Zhou, Y.-H. (2006). PAX6 suppresses the invasiveness of glioblastoma cells and the expression of the matrix metalloproteinase-2 gene. Cancer Res. *66*, 9809–9817.

McCord, A.M., Jamal, M., Williams, E.S., Camphausen, K., and Tofilon, P.J. (2009). CD133+ glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *15*, 5145–5153.

Meyer, M., Reimand, J., Lan, X., Head, R., Zhu, X., Kushida, M., Bayani, J., Pressey, J.C., Lionel, A.C., Clarke, I.D., et al. (2015). Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 851–856.

Michalczyk, K., and Ziman, M. (2005). Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. Histol. Histopathol. *20*, 665–671.

Minuesa, G., Antczak, C., Shum, D., Radu, C., Bhinder, B., Li, Y., Djaballah, H., and Kharas, M.G. (2014). A 1536-well fluorescence polarization assay to screen for modulators of the MUSASHI family of RNAbinding proteins. Comb. Chem. High Throughput Screen. *17*, 596–609.

Mladenova, V., Mladenov, E., and Iliakis, G. (2016). Novel Biological Approaches for Testing the Contributions of Single DSBs and DSB Clusters to the Biological Effects of High LET Radiation. Front. Oncol. *6*, 163.

Morihiro, Y., Yasumoto, Y., Vaidyan, L.K., Sadahiro, H., Uchida, T., Inamura, A., Sharifi, K., Ideguchi, M., Nomura, S., Tokuda, N., et al. (2013). Fatty acid binding protein 7 as a marker of glioma stem cells. Pathol. Int. *63*, 546–553.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods *65*, 55–63.

Mullapudi, S.R., Ali-Osman, F., Shou, J., and Srivenugopal, K.S. (2000). DNA repair protein O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase is phosphorylated by two distinct and novel protein kinases in human brain tumour cells. Biochem. J. *351 Pt 2*, 393–402.

Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. Nat. Cell Biol. 15, 2–8.

Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2014). Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. Cancer Cell *25*, 304–317.

Nakada, M., Furuta, T., Hayashi, Y., Minamoto, T., and Hamada, J.-I. (2012). The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. Front. Oncol. *2*, 98.

Nakai, E., Park, K., Yawata, T., Chihara, T., Kumazawa, A., Nakabayashi, H., and Shimizu, K. (2009). Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma. Cancer Invest. *27*, 901–908.

Navarro, P., Festuccia, N., Colby, D., Gagliardi, A., Mullin, N.P., Zhang, W., Karwacki-Neisius, V., Osorno, R., Kelly, D., Robertson, M., et al. (2012). OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells. EMBO J. *31*, 4547–4562.

Nicolai, S., Rossi, A., Di Daniele, N., Melino, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., and Raschellà, G. (2015). DNA repair and aging: the impact of the p53 family. Aging 7, 1050–1065.

O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature 445, 106–110.

Oh, J.E., Ohta, T., Nonoguchi, N., Satomi, K., Capper, D., Pierscianek, D., Sure, U., Vital, A., Paulus, W., Mittelbronn, M., et al. (2016). Genetic Alterations in Gliosarcoma and Giant Cell Glioblastoma. Brain Pathol. Zurich Switz. *26*, 517–522.

Ohka, F., Natsume, A., and Wakabayashi, T. (2012). Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. Neurol. Res. Int. 2012, 878425.

van Oijen, M.G., and Slootweg, P.J. (2000). Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *6*, 2138–2145.

Ostermann, S. (2004). Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. Clin. Cancer Res. *10*, 3728–3736.

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., Wolinsky, Y., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J. (2014). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011. Neuro-Oncol. *16*, iv1-iv63.

Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., et al. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell *9*, 157–173.

Pollard, S.M., Yoshikawa, K., Clarke, I.D., Danovi, D., Stricker, S., Russell, R., Bayani, J., Head, R., Lee, M., Bernstein, M., et al. (2009). Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. Cell Stem Cell *4*, 568–580.

Prestegarden, L., and Enger, P.Ø. (2010). Cancer stem cells in the central nervous system--a critical review. Cancer Res. 70, 8255–8258.

Raju, E.N.S., Kuechler, J., Behling, S., Sridhar, S., Hirseland, E., Tronnier, V., and Zechel, C. (2015). Maintenance of Stemlike Glioma Cells and Microglia in an Organotypic Glioma Slice Model: Neurosurgery *77*, 629–643.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 414, 105–111.

Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science 255, 1707–1710.

Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. Nature *445*, 111–115.

Romero-Rojas, A.E., Diaz-Perez, J.A., Ariza-Serrano, L.M., Amaro, D., and Lozano-Castillo, A. (2013). Primary gliosarcoma of the brain: radiologic and histopathologic features. Neuroradiol. J. *26*, 639–648.

Ropolo, M., Daga, A., Griffero, F., Foresta, M., Casartelli, G., Zunino, A., Poggi, A., Cappelli, E., Zona, G., Spaziante, R., et al. (2009). Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures. Mol. Cancer Res. MCR *7*, 383–392.

Sage, J. (2012). The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. Genes Dev. 26, 1409–1420.

Schaich, M., Kestel, L., Pfirrmann, M., Robel, K., Illmer, T., Kramer, M., Dill, C., Ehninger, G., Schackert, G., and Krex, D. (2008). A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. Ann. Oncol. *20*, 175–181.

Schlegel, U., Weller, M., and Westphal, M. (2003). Neuroonkologie (Stuttgart: Thieme).

Schlegel, U., Weller, M., Westphal, M., and Reifenberger, G. (2009). Neuroonkologische Therapie (Stuttgart: Kohlhammer).
Schonberg, D.L., Lubelski, D., Miller, T.E., and Rich, J.N. (2014). Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy. Mol. Aspects Med. *39*, 82–101.

Seymour, T., Nowak, A., and Kakulas, F. (2015). Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. Front. Oncol. *5*, 159.

Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R., and Morrison, S.J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. Cell *138*, 822–829.

Shafiee, M., Aleyasin, S.A., Vasei, M., Semnani, S.S., and Mowla, S.J. (2016). Down-Regulatory Effects of miR-211 on Long Non-Coding RNA SOX2OT and SOX2 Genes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Cell J. *17*, 593–600.

Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J.-I., et al. (2003). Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. Cancer Res. *63*, 6962–6970.

Singh, A.R., Joshi, S., Zulcic, M., Alcaraz, M., Garlich, J.R., Morales, G.A., Cho, Y.J., Bao, L., Levy, M.L., Newbury, R., et al. (2016). PI-3K Inhibitors Preferentially Target CD15+ Cancer Stem Cell Population in SHH Driven Medulloblastoma. PloS One *11*, e0150836.

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res. *63*, 5821–5828.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. Nature *432*, 396–401.

Song, H., Hollstein, M., and Xu, Y. (2007). p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. Nat. Cell Biol. *9*, 573–580.

Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S.G.M., Touloumis, A., Collins, V.P., Marioni, J.C., Curtis, C., Watts, C., and Tavaré, S. (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 4009–4014.

Soussi, T., Kato, S., Levy, P.P., and Ishioka, C. (2005). Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. Hum. Mutat. *25*, 6–17.

Stiles, B., Groszer, M., Wang, S., Jiao, J., and Wu, H. (2004). PTENless means more. Dev. Biol. 273, 175–184.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. N. Engl. J. Med. *352*, 987–996.

Szerlip, N.J., Pedraza, A., Chakravarty, D., Azim, M., McGuire, J., Fang, Y., Ozawa, T., Holland, E.C., Huse, J.T., Jhanwar, S., et al. (2012). Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 3041–3046.

Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S.S.W., Shibata, W., Vigneshwaran, R., Gordon, S.A.K., Shimada, Y., and Wang, T.C. (2009). Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. Stem Cells Dayt. Ohio *27*, 1006–1020.

Tamura, K., Aoyagi, M., Ando, N., Ogishima, T., Wakimoto, H., Yamamoto, M., and Ohno, K. (2013). Expansion of CD133-positive glioma cells in recurrent de novo glioblastomas after radiotherapy and chemotherapy. J. Neurosurg. *119*, 1145–1155.

Tommasino, F., Friedrich, T., Jakob, B., Meyer, B., Durante, M., and Scholz, M. (2015). Induction and Processing of the Radiation-Induced Gamma-H2AX Signal and Its Link to the Underlying Pattern of DSB: A Combined Experimental and Modelling Study. PloS One *10*, e0129416.

Toole, B.P. (2009). Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *15*, 7462–7468.

Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., and Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 14720–14725.

Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.K., Wen, P.Y., and Olson, J.J. (2010). Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to a Cure for Malignant Glioma. CA. Cancer J. Clin. *60*, 166–193.

Veselska, R., Kuglik, P., Cejpek, P., Svachova, H., Neradil, J., Loja, T., and Relichova, J. (2006). Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme. BMC Cancer 6.

Wang, H., Hu, B., Liu, R., and Wang, Y. (2005). CHK1 affecting cell radiosensitivity is independent of non-homologous end joining. Cell Cycle Georget. Tex *4*, 300–303.

Wang, J., Sakariassen, P.Ø., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Bøe, S.O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Røsland, G., Thorsen, F., Stuhr, L., et al. (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. Int. J. Cancer *122*, 761–768.

Wang, X., Chen, J., Liu, Y., You, C., and Mao, Q. (2013). Mutant TP53 enhances the resistance of glioblastoma cells to temozolomide by up-regulating O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase. Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol. *34*, 1421–1428.

Wang, X., Hu, J.-F., Tan, Y., Cui, J., Wang, G., Mrsny, R.J., and Li, W. (2014). Cancer stem cell marker Musashi-1 rs2522137 genotype is associated with an increased risk of lung cancer. PloS One *9*, e95915.

Wang, Y.-Z., Plane, J.M., Jiang, P., Zhou, C.J., and Deng, W. (2011). Concise review: Quiescent and active states of endogenous adult neural stem cells: identification and characterization. Stem Cells Dayt. Ohio *29*, 907–912.

Xie, Y., Bergström, T., Jiang, Y., Johansson, P., Marinescu, V.D., Lindberg, N., Segerman, A., Wicher, G., Niklasson, M., Baskaran, S., et al. (2015). The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes. EBioMedicine *2*, 1351–1363.

Yahyanejad, S., King, H., Iglesias, V.S., Granton, P.V., Barbeau, L.M.O., van Hoof, S.J., Groot, A.J., Habets, R., Prickaerts, J., Chalmers, A.J., et al. (2016). NOTCH blockade combined with radiation therapy and temozolomide prolongs survival of orthotopic glioblastoma. Oncotarget *7*, 41251–41264.

Yasumoto, Y., Miyazaki, H., Vaidyan, L.K., Kagawa, Y., Ebrahimi, M., Yamamoto, Y., Ogata, M., Katsuyama, Y., Sadahiro, H., Suzuki, M., et al. (2016). Inhibition of Fatty Acid Synthase Decreases Expression of Stemness Markers in Glioma Stem Cells. PloS One *11*, e0147717.

Zbinden, M., Duquet, A., Lorente-Trigos, A., Ngwabyt, S.-N., Borges, I., and Ruiz i Altaba, A. (2010). NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. EMBO J. *29*, 2659–2674.

Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B.M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., and Herold-Mende, C.C. (2008). Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *14*, 123–129.

Zhang, H., and Li, S.-Y. (2010). Research progression of CD133 as a marker of cancer stem cells. Chin. J. Cancer *29*, 243–247.

Zhang, J., Stevens, M.F.G., and Bradshaw, T.D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. Curr. Mol. Pharmacol. *5*, 102–114.

Zhang, M., Song, T., Yang, L., Chen, R., Wu, L., Yang, Z., and Fang, J. (2008). Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR *27*, 85.

Zhou, Y.-H., Wu, X., Tan, F., Shi, Y.-X., Glass, T., Liu, T.J., Wathen, K., Hess, K.R., Gumin, J., Lang, F., et al. (2005). PAX6 suppresses growth of human glioblastoma cells. J. Neurooncol. *71*, 223–229.

Abkürzungsverzeichnis

- α Symbol für Antikörper
- A, T, C, G Basen der DNA: Adenin, Thymin, Cytosin, Guanin
- Abb. Abbildung
- ABC ATP-binding cassette
- ABCG2 ATP-binding cassette sub-family G member 2
- ABCB1/MDR1 ATP-binding cassette sub-family B member 1/multidrug resistance protein 1
- AIC 5-Aminoimidazol-4-carboxamid
- Aminosäuren R, H, N, D, W Arginin, Histidin, Asparagin, Asparaginsäure, Tryptophan
- AMV avian myeoloblastosis virus
- ATM Ataxia telangiectasia mutated
- ATR Ataxia telangiectasia and Rad3 related
- bFGF basic fibroblast growth factor, basaler Fibroblasten-Wachstumsfaktor
- BRCA1/2 breast cancer type 1/2 susceptibility protein
- °C Grad Celsius
- CD cluster of differentiation
- CD15/SSEA-1 3-fucosyl-N-acetyl-Lactosamin/stage-specific embryonic antigen 1
- CD133 Prominin-1
- CD31/PECAM platelet endothelial cell adhesion molecule
- CD44 Hyaluronsäurerezeptor
- CDK cyclin-dependent kinase, Cyclin-abhängige Kinase
- CDKN2A cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
- cDNA complementary DNA, komplementäre DNA
- Chk1/2 checkpoint kinase 1/2
- cl Klonkultur
- d *day*, Tag
- DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol
- DEPC Diethylpyrocarbonat
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DNA deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
- DNA-PKcs DNA-abhängige Proteinkinase catalytic subunit

- DSB Doppelstrangbruch
- EDTA Ethylendiamintetraacetat
- EGF epidermal growth factor, epidermaler Wachstumsfaktor
- EGFR epidermal growth factor receptor
- EGFR_{VIII} EGFR-Variante, die konstitutiv aktiviert ist
- ESC embryonic stem cell, embryonale Stammzelle
- FABP7 fatty acid binding protein 7, fettsäurebindendes Protein 7
- FACS fluorescence-activated cell sorting
- FCS fetal calf serum, fötales Kälberserum
- γH2AX am Serylrest S139 phosphoryliertes Histon H2A
- GAPDH Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
- GBM Glioblastom
- GFAP glial fibrillary acidic protein
- GSarc Gliosarkom
- Gy Gray
- h hour, Stunde
- HOXA10 Homeobox A10
- HR homologe Rekombination
- ICC immunocytochemistry, Immuzytochemie
- IDH1 Isocitratdehydrogenase 1
- JLB Jurkat lysis buffer, Jurkat-Lysis-Puffer
- λ Wellenlänge
- m, cm, µm, nm Meter, Zentimeter, Mikrometer, Nanometer
- M, mM, µM molar, millimolar, mikromolar
- Mc Mutterkultur
- MDM2/4 mouse double minute 2/4 homolog
- MeV Megaelektronenvolt
- mg, μg, ng Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
- MGMT O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
- min Minute
- ml, µl Milliliter, Mikroliter

MRN – Mre11, Rad50, NBS1 (Nibrin)

mRNA – messenger RNA

MSP - methylierungsspezifische PCR

MTIC - 3-methyl-(triazen-1-yl) Imidazol-4-carboxamid

mTOR - mammalian target of rapamycin

MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

mut. – mutiert

NADH/NADPH – reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

NHEJ – non-homologous end joining

NPC - neural progenitor cell, neurale Progenitorzelle

NSC - neural stem cell, neurale Stammzelle

N239D – p53-Mutation, Asparagin 239 durch Aspartat ersetzt

Oct3/4 – octamer-binding transcription factor 3/4

p – Passage

- p Signifikanzniveau
- p21^{Cip1/WAF1} Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor 1
- pATM^{Ser1981} am Serylrest S1981 phosphorylierte ATM

PAX6 – paired box protein 6

PBS – phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung

pChk1^{Ser317} – am Serylrest S317 phosphorylierte Chk1

pChk2^{Ser19} – am Serylrest S19 phosphorylierte Chk2

PDGFR α/β – platelet-derived growth factor receptor α/β

PI3K – Phosphoinositid-3-Kinase

PIC – protease inhibitor cocktail

PIP3 – Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat

pmol – pikomol

PMSF – Phenylmethylsulfonylfluorid

PTEN – phosphatase and tensin homolog

qRT-PCR – quantitative Real-Time PCR (polymerase chain reaction)

R175H – p53-Mutation, Arginin 175 durch Histidin ersetzt

R248W – p53-Mutation, Arginin 248 durch Tryptophan ersetzt

- R273H p53-Mutation, Arginin 273 durch Histidin ersetzt
- RNA ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
- RPA Replikationsprotein A
- rpm revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
- RT-PCR reverse Transkription-PCR (polymerase chain reaction)
- SCID severe combined immunodeficiency
- SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
- sec Sekunde
- Ser Serylrest
- SLGC stem-like glioma cells, stammzellähnliche Gliomzellen
- Sox2 sex determining region Y-box 2
- T Tumor
- Tab. Tabelle
- TMZ Temozolomid
- TP53/p53 Tumorsuppressorprotein p53
- TUNEL TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
- VEGF vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
- v/v Volumenprozent
- W0-5 Woche 0 bis 5
- WHO world health organization, Weltgesundheitsorganisation
- WT Wildtyp
- x g Vielfaches der Erdbeschleunigung

Zellzyklusphasen G0/G1, S, G2, M – *gap* 0/ *gap* 1-Phase, Synthesephase, *gap* 2-Phase, Mitose-Phase; >4n – Zellen, deren DNA-Gehalt größer ist als der tetraploide Chromosomensatz

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Häufigkeit der genetischen Veränderungen in drei Signalwegen im Glioblastom	10
Abb. 2: Strahleninduzierter Zellzyklusarrest.	12
Abb. 3: Doppelstrangbruch-Reparatur in Säugetierzellen.	14
Abb. 4: Lineare Hierarchie stammzellähnlicher Gliomzellen	18
Abb. 5: Sox2-Protein- und sox2-mRNA-Expression in SLGC-Klonen	40
Abb. 6: Sox2-Expression humaner SLGC-Klone in orthotopen Tumoren	41
Abb. 7: Stabilität der Sox2-Protein-Expression in SLGC-Klonen über die Passagen	43
Abb. 8: Stabilität der sox2-mRNA-Expression in SLGC-Klonen über die Passagen	44
Abb. 9: oct3/4-mRNA-Expression in SLGC-Klonen.	45
Abb. 10: Methylierungsgrad des Oct3/4-Promotors in SLGC-Klonen	46
Abb. 11: nanog-mRNA-Expression in SLGC-Klonen	47
Abb. 12: Musashi-, PAX6- und FABP7-Expression in T1495-Klonen	48
Abb. 13: FABP7-, Musashi- und PAX6-Expression in SLGC-Klonen	49
Abb. 14: Stabilität der FABP7-, Musashi- und PAX6-Expression in SLGC-Klonen über die Passagen	52
Abb. 15: Anteil CD44-positiver Zellen in SLGC-Linien, weiter differenzierten Kulturen und Klonen	53
Abb. 16: Anteil Integrin α 6-positiver Zellen in SLGC-Linien und weiter differenzierten Kulturen	54
Abb. 17: Anteil CD133-positiver Zellen in SLGC-Linien und Klonen sowie die Stabilität über die Passa	gen.
	56
Abb. 18: Stabilität des Anteils CD133-positiver Zellen in sortierten T1522-Kulturen	56
Abb. 19: CD133- und Sox2-Expression in sortierten T1522-Kulturen.	57
Abb. 20: Expression differenzierungsassoziierter Faktoren in SLGC-Klonen.	59
Abb. 21: Stabilität der GFAP- und Tau-Expression in SLGC-Klonen über die Passagen	63
Abb. 22: GFAP-Expression in T1338- und T1440-Klonen in Abhängigkeit von der Passagenzahl	63
Abb. 23: GFAP-Expression in Kulturen von T1440-Klonen über steigende Passagen.	65
Abb. 24: Anteil CD31-positiver Zellen in SLGC-Linien und Klonen.	67
Abb. 25: EGFR-Expression in SLGC-Linien und Klonen.	69
Abb. 26: PDGFR α - und PDGFR β -Expression in SLGC-Klonen	70
Abb. 27: PTEN-Expression in SLGC-Klonen	72
Abb. 28: Veränderung des Phosphorylierungsgrads von ATM (pATM ^{Ser1981}) nach Bestrahlung	mit
Photonen	76
Abb. 29: Veränderung des Phosphorylierungsgrads von Chk1 und Chk2 nach Bestrahlung	mit
Photonen	77
Abb. 30: Veränderung der Expression von p53 und p21 nach Bestrahlung mit Photonen	79
Abb. 31: Veränderung des Phosphorylierungsgrads von H2AX (γH2AX) nach Bestrahlung mit Photor	nen.
	81
Abb. 32: Veränderung des pATM ^{Ser1981} -Levels nach Bestrahlung mit 5 Gy.	83
Abb. 33: Veränderung des pChk1 ^{Ser317} - bzw. pChk2 ^{Ser19} -Levels nach Bestrahlung mit 5 Gy	84
Abb. 34: Veränderung des von p53- und p21 ^{Cip1/WAF1} -Levels nach Bestrahlung mit 5 Gy	86
Abb. 35: Veränderung des γH2AX-Levels nach Bestrahlung mit 5 Gy	88
Abb. 36: Veränderung des pATM ^{Ser1981} -Levels nach Behandlung mit Temozolomid.	91
Abb. 37: Veränderung des pChk1 ^{Ser317} - bzw. pChk2 ^{Ser19} -Levels nach Behandlung mit Temozolomid.	92
Abb. 38: Veränderung des von p53- und p21 ^{Cip1/WAF1} -Levels nach Behandlung mit Temozolomid	94
Abb. 39: Veränderung des γH2AX-Levels nach Behandlung mit Temozolomid	96
Abb. 40: Veränderung des pATM ^{Ser1981} -Levels nach der Doppelbehandlung mit Bestrahlung	und
Temozolomid	97

Abb. 41: Veränderung des pChk1 ^{Ser317} - bzw. pChk2 ^{Ser19} -Levels nach der Doppelbehandlung	mit
Bestrahlung und Temozolomid.	. 99
Abb. 42: Veränderung des p53- und p21 ^{Clp1/WAF1} -Levels nach der Doppelbehandlung mit Bestrahl und Temozolomid	ung 101
Abb. 43: Veränderung des vH2AX-Levels nach der Doppelbehandlung mit Bestrahlung	und
Temozolomid	102
Abb. 44: Vergleich des pATM-Levels nach Einfach- und Doppelbehandlung	104
Abb. 45: Vergleich des pChk1-Levels nach Einfach- und Doppelbehandlung	105
Abb. 46: Vergleich des pChk2-Levels nach Einfach- und Doppelbehandlung	106
Abb. 47: Vergleich des p53-Levels nach Einfach- und Doppelbehandlung	108
Abb. 48: Vergleich des p21 ^{Cip1/WAF1} -Levels nach Einfach- und Doppelbehandlung	109
Abb. 49: Vergleich des γH2AX-Levels nach Einfach- und Doppelbehandlung	110
Abb. 50: H2AX-Phosphorylierung in T1442 zu frühen Zeitpunkten nach Einfach-	und
Doppelbehandlung	112
Abb. 51: Veränderung des Anteils γ H2AX-positiver Zellen zu frühen Zeitpunkten nach Einfach-	und
Doppelbehandlung	114
Abb. 52: Veränderung des Anteils γH2AX-positiver Zellen zu späteren Zeitpunkten nach Einfach-	und
Doppelbehandlung	116
Abb. 53: H2AX-Phosphorylierung in T1442 zu späteren Zeitpunkten nach Einfach-	und
Doppelbehandlung.	118
Abb. 54: H2AX-Phosphorylierung in T1371 cl16 nach Einfach- und Doppelbehandlung	121
Abb. 55: Veränderung des Anteils γH2AX-positiver Zellen zu frühen Zeitpunkten in T1371-Klonen n	ach
Einfach- und Doppelbehandlung.	122
Abb. 56: H2AX-Phosphorylierung in T1442 cl13 nach Einfach- und Doppelbehandlung	123
Abb. 57: Veränderung des Anteils γH2AX-positiver Zellen zu frühen Zeitpunkten in T1442-Klonen n	ach
Einfach- und Doppelbehandlung.	124
Abb. 58: H2AX-Phosphoryllerung in 11447 cl3 nach Einfach- und Doppelbenandlung	125
Abb. 59: Veranderung des Anteils γH2AX-positiver Zellen zu frühen Zeitpunkten in T1447-Klonen n	ach
Abb. Co. U2AX December diamage in T1522 al10 needs Einfach, and Dependhabandlung	120
Abb. 60: HZAX-Phosphoryllerung in 11522 cito hach Einfach- und Doppelbenandlung	127
Finfach und Dannelbehandlung	120
Abb. 62: Einfluce von Badia, und Chamasancitivität auf die Vitalität von SLCCs und abgeleiteten Kler	128
Abb. 62. Elimoss von Radio- und Chemosensitivitat auf die vitalität von SEGCs und abgeleiteten Rior	121
Abb. 62: Induktion von Apontoco nach Behandlung mit Temozolomid und/oder Bestrahlung	122
Abb. 64: Finfluss von Radio- und Chemosensitivität auf den Zellzyklus von SLGCs	13/
Abb. 65: Anteil CD133-positiver Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit Temozolomid und/c	nder
der Bestrahlung	135
Abb. 66: Expression von cd133-mRNA nach der Behandlung mit 100 uM Temozolomid und/c	uder
Bestrahlung mit 20 Gv	137
Abb. 67: Sox2-Expression nach Behandlung mit Temozolomid und/oder der Bestrahlung.	139
Abb. 68: Veränderung der Sox2-Proteinexpression nach Behandlung mit Temozolomid und/c	bder
Bestrahlung.	140
Abb. 69: Anteil Sox2-positiver Zellen in SLGC-Kulturen nach Behandlung mit Temozolomid und/c	oder
Bestrahlung.	142
Abb. 70: Nestin- und Sox2-Expression in T1495 nach Einfach- und Doppelbehandlung	143
Abb. 71: Anteil Nestin-positiver Zellen in SLGC-Kulturen nach Behandlung mit Temozolomid (E	C ₅₀)
und/oder Bestrahlung mit 5 Gy	147

Abb. 72: Expression stammzellassoziierter Proteine in Klonen, die sich von den Zellen ableiten,	die die
Bestrahlung oder Temozolomid-Behandlung überlebten	151
Abb. 73: Sox2-Expression in SLGC-Linien und Klonen.	154
Abb. 74: Modell zur linearen Hierarchie in SLGC-Linien	157
Abb. 75: Sox2-Expression in T1338-Klonen. Exemplarische Western blot-Analyse der Sox2-Expl	ression
in T1338-Klonen	192
Abb. 76: Orthotope Tumore humaner SLGC-Klone. Mikrofotografien histologischer Analysen	192
Abb. 77: Überlebende Zellen der T1338-Mutterkultur und -Klone im Mäusegehirn	193
Abb. 78: Sox2-Expression von T1464 cl18 im orthotopen Tumor	193
Abb. 79: EGFR-Expression in SLGC-Linien und Klonen.	198
Abb. 80: Exemplarische Western blot-Analysen in bestrahlten SLGC-Linien und Klonen	199
Abb. 81: Exemplarische Western blot-Analysen in behandelten SLGC-Linien und Klonen	200
Abb. 82: H2AX-Phosphorylierung in T1371 cl2 nach Einfach- und Doppelbehandlung	202
Abb. 83: H2AX-Phosphorylierung in T1442 cl16 nach Einfach- und Doppelbehandlung	203
Abb. 84: H2AX-Phosphorylierung in T1447 cl1 nach Einfach- und Doppelbehandlung	204
Abb. 85: H2AX-Phosphorylierung in T1522 cl1 nach Einfach- und Doppelbehandlung	205
Abb. 86: Vitalität behandelter SLGC-Kulturen und U87MG nach Bestrahlung und/oder Temozo	olomid-
Behandlung	205
Abb. 87: Expression von cd133-mRNA in behandelten T1495-Kulturen	206
Abb. 88: Nestin- und Sox2-Expression in T1442 nach Einfach- und Doppelbehandlung	206

<u>Tabellenverzeichnis</u>

Tab. 1: SLGC- und Kontrolllinien sowie deren p53-Status	23
Tab. 2: Antikörper der immunzytochemischen Analyse	26
Tab. 3: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse	27
Tab. 4: Zusammensetzung der diskontinuierlichen SDS-Gele	29
Tab. 5: Analysierte Proteine	30
Tab. 6: Primäre Antikörper für die Western blot-Analyse	31
Tab. 7: Sekundäre Antikörper für die Western blot-Analyse	32
Tab. 8: Master-Mix für die cDNA-Synthese	33
Tab. 9: Master-Mix für die quantitative Real-Time PCR	33
Tab. 10: Primer für die quantitative Real-Time PCR	34
Tab. 11: Master-Mix für die methylierungsspezifische PCR	35
Tab. 12: Primer für die methylierungsspezifische PCR	35
Tab. 13: Antikörper für die immunhistologische Analyse.	37
Tab. 14: Unterschiede der EGFR-, PDGFR $lpha$ -, PDGFR eta - und PTEN-Expression in Klonen	73
Tab. 15: Vergleich des Proteinphosphorylierungsgrads bzw. der Proteinexpression nach Bestrah	lung
mit 5 Gy oder der ED ₅₀ in SLGC-Linien mit unterschiedlichem p53-Status.	90
Tab. 16: Vergleich des Anteils γ H2AX-positiver Zellen in Klonen nach Bestrahlung mit 5 Gy, Behand	lung
mit 100 μM Temozolomid oder Doppelbehandlung	129
Tab. 17: Effekt der Behandlung mit Temozolomid und/oder Bestrahlung auf den Anteil Sox2-	und
Nestin-positiver Zellen in SLGC-Linien	149
Tab. 18: Modulation und molekulare Heterogenität in SLGC-Linien.	160
Tab. 19: Deregulierte Signalwege in SLGC-Linien und Klonen sowie Effekt von Bestrahlung und/o	oder
Temozolomid auf Vitalität, Apoptose und Proliferation	163
Tab. 20: Korrelation zwischen genetischem Hintergrund und behandlungsspezifisc	hem
Antwortverhalten in SLGC-Linien und Klonen	169
Tab. 21: Stammzellassoziierte Faktoren in Klonen.	194
Tab. 22: Differenzierungsassoziierte Faktoren und Sox2-Expression in Klonen.	195
Tab. 23: Stammzellassoziierte Faktoren in tumorigen SLGC-Klonlinien.	196
Tab. 24: Differenzierungsassoziierte Faktoren, Sox2- und c-myc-Expression in tumorigen SI	LGC-
Klonlinien	197
Tab. 25: Stammzellassoziierte Faktoren in nicht-tumorigen SLGC-Klonlinien.	197
Tab. 26: Differenzierungsassoziierte Faktoren, Sox2- und c-myc-Expression in nicht-tumorigen SI	LGC-
Klonlinien	198
Tab. 27: Phosphorylierung bzw. Expression von Proteinen der DNA-Schadenserkennung	und
Signaltransduktion in SLGC-Linien und Klonen.	201
Tab. 28: Behandlungsspezifische Veränderung des Anteils CD133-positiver Zellen in SLGC-Linien	und
Klonen	207
Tab. 29: Behandlungsspezifische Veränderung des Anteils Sox2-positiver Zellen in SLGC-Linien	und
Klonen	208



Abb. 75: Sox2-Expression in T1338-Klonen. Exemplarische Western blot-Analyse der Sox2-Expression in T1338-Klonen. Vergleich der Sox2-Expression der Klone mit zunehmender Passagenzahl. Aktin diente als Ladekontrolle. – Sox2, *sex determining region Y-box* 2.



Abb. 76: Orthotope Tumore humaner SLGC-Klone. Mikrofotografien histologischer Analysen. 4,5 µm Gewebeschnitte orthotoper Tumore in SCID-Mäusen. (A) HE-Färbung, (B) immunhistologische Färbung mit α Nestin (grün), α Ku80 (rot) und DAPI (blau). (**Oben**) Überlagerung aller Farbkanäle, (**unten**) ausschließlich Überlagerung des grünen und roten Farbkanals der gleichen Region. Messbalken, 50 µm. – DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; SLGC, *stem-like glioma cell*; SCID, *severe combined immunodeficiency*; HE, Hämalaun und Eosin.



Abb. 77: Überlebende Zellen der T1338-Mutterkultur und -Klone im Mäusegehirn. Mikrofotografien immunhistologischer Analysen von 4,5 μm Gewebeschnitten von SCID-Mäusegehirnen. Immunhistologische Färbung mit αKu80 (rot) und DAPI (blau). (**Oben**) Überlagerung Ku80-/DAPI-Färbung, (**unten**) ausschließlich Ku80-Färbung der gleichen Region. Messbalken, 50 μm. – DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; SLGC, *stem-like glioma cell*; SCID, *severe combined immunodeficiency*.



T1464 cl18

Abb. 78: Sox2-Expression von T1464 cl18 im orthotopen Tumor. Mikrofotografien histologischer Analysen. 4,5 μm Gewebeschnitte orthotoper Tumore in SCID-Mäusen. Immunhistologische Färbung mit αNestin (grün), αSox2 (rot) und DAPI (blau). (**Oben**) Überlagerung aller Farbkanäle, (**unten**) ausschließlich Überlagerung des grünen und roten Farbkanals der gleichen Region. Messbalken, 50 μm. – Sox2, *sex determining region Y-box* 2; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; SLGC, *stem-like glioma cell*; SCID, *severe combined immunodeficiency*.

Klon	S	ox2	FAI	BP7	Mus	ashi	PA	X6	CD133		
T1338 cl4	++	↓↑	(+)	n.d.	+	n.d.	-	n.d.	++	$\downarrow \uparrow \rightarrow$	
T1338 cl7	++	$\rightarrow 7$	+	\uparrow	+	\rightarrow	~	7		<u></u> ↑→↓	
T1338 cl1	++	$\downarrow \rightarrow$	-	n.d.	(+)	n.d.		n.d.	~	$\downarrow \rightarrow \rightarrow (0)$	
T1338 cl9	++	\checkmark	(+)	n.d.	(+)	n.d.		n.d.		→↑	
T1338 cl5	++	フ个	++	\rightarrow	++	n.d.	(+)	n.d.	-	$\downarrow \uparrow$	
T1338 cl11	++	マ个	(+)	n.d.	+	n.d.	+	n.d.		→↑	
T1338 cl10	++	→↑	+	n.d.	~	n.d.	(+)	n.d.		→↑	
T1338 cl2	+	\nearrow	~	n.d.	++	n.d.	(-)	n.d.	~	↓ → ↑	
T1338 cl8	+	↑ ↑	-	\uparrow	+	К	+	\downarrow		$\rightarrow \uparrow$	
T1338 cl3	(+)	77	(+)	n.d.	++	n.d.	~	n.d.	++	⊿↑↓	
T1338 cl6	(+)	\uparrow	++	1	++	7	(+)	\uparrow		$\uparrow \downarrow \uparrow$	
T1440 cl5-1	-	\downarrow	(+)	\rightarrow	~	n.d.	+	\rightarrow		1	
T1440 cl5		$\uparrow 1$	~	$\land \lor$	(-)	7		个フ		↑↑↓⊻	
T1440 cl4		⊅ ↑	-	$\rightarrow 7$	(-)	\downarrow	(+)	$\rightarrow \downarrow$		\uparrow	
T1440 cl8		↑ ↑	(+)	$\downarrow \downarrow \downarrow$	~	И	(+)	\rightarrow		1	
T1464 cl18	++	R	+	7	(+)	7	+	R		7	
T1464 cl6	+	7	+	\rightarrow	+	Ъ	(+)	7		\rightarrow	
T1464 cl8	~	n.d.	~	n.d.	+	n.d.	+	n.d.	~	n.d.	
T1464 cl21	~	\rightarrow	(+)	L الا	~	\rightarrow	+	\downarrow		1	
T1464 cl27	-	n.d.	-	n.d.	+	n.d.	+	n.d.		n.d.	
T1464 cl16		1		n.d.	+	n.d.	+	n.d.	~	<u>لا</u>	
T1464 cl1		1	(-)	7	(+)	\rightarrow	(+)	7		n.d.	
T1464 cl11		1		n.d.	+	n.d.	++	n.d.		\rightarrow	
T1452 cl15	~	7	(+)	R	(+)	R	+	\downarrow	~	1	
T1452 cl16	(-)	1	(+)	\rightarrow	-	7	~	\rightarrow	~	\rightarrow	
T1452 cl21		1	(+)	R	-	\downarrow	(-)	\downarrow	++	↓	
T1452 cl10		\uparrow	~	7	-	7	++	\downarrow	++	\downarrow	
T1452 cl20		1	~	7	-	1	+	\uparrow	++	7	
T1452 cl14		n.d.		n.d.		n.d.	++	n.d.	++	n.d.	
T1452 cl155		1		И	-	И	+	\downarrow	++	\downarrow	
T1495 cl26	++	n.d.	+	n.d.	+	n.d.		n.d.		n.d.	
T1495 cl13	++	n.d.	(+)	n.d.	(+)	n.d.		n.d.	+	n.d.	
T1495 cl12	++	n.d.	++	n.d.	++	n.d.	++	n.d.	++	n.d.	
T1495 cl16	++	n.d.	++	n.d.	~	n.d.	(+)	n.d.	++	n.d.	
T1495 cl4	++	n.d.	(+)	n.d.	(+)	n.d.	(+)	n.d.	++	n.d.	
T1495 cl14	+	n.d.	-	n.d.	(+)	n.d.	(-)	n.d.	++	n.d.	
T1495 cl37	+	n.d.	-	n.d.	(-)	n.d.	~	n.d.	++	n.d.	

Tab. 21: Stammzellassoziierte Faktoren in Klonen.

Expression stammzellassoziierter Faktoren und Anteil CD133-positiver Zellen relativ zur Mutterkultur, absteigend nach ihrer jeweiligen Sox2-Expression sortiert. Die Variation der Expression bzw. des Anteils CD133-positiver Zellen mit zunehmender Passagenzahl wird durch Pfeile repräsentiert, wobei jeder Pfeil die Veränderung zur vorherigen, analysierten Passage darstellt. – Sox2, *sex determining region Y-box* 2; FABP7, *fatty acid binding protein* 7; PAX6, *paired-box protein* 6; CD133, Prominin 1; ~, Unterschied < 10%; (+), Expression < 50% erhöht; +, Expression > 50% und < 100% erhöht; ++, Expression mindestens 2-fach erhöht; (-), Expression > 10% und < 25% reduziert; -, Expression > 25% und < 50% reduziert; --, Expression um mindestens 50% reduziert; \uparrow , Anstieg > 2x; \uparrow , Anstieg > 50%; \neg , Anstieg > 10%; \lor , Reduktion > -10%; \downarrow , Reduktion > -25%; \downarrow , Reduktion > -50%; \rightarrow , keine Veränderung; n.d., nicht getestet; 0, kein Signal.

Klon	S	ox2	GFAP		Та	au	CD31		
T1338 cl4	++	↓↑		↑↓;∆↑	+	77	-		
T1338 cl7	++	$\rightarrow 7$		↑↓; Δ↓	~	\nearrow	~	$\rightarrow \rightarrow$	
T1338 cl1	++	$\downarrow \rightarrow$		_↑↓;∆↑	++	ער	-	⊿↑	
T1338 cl9	++	\checkmark		$\rightarrow \downarrow; \Delta \downarrow$	~	$\rightarrow \rightarrow$	(-)	$\rightarrow \rightarrow$	
T1338 cl5	++	⊿↑		∖ע;∆ע	(+)	\rightarrow	-	个刁	
T1338 cl11	++	⊿个		↑↓; ∆↑	(-)	77		ተተ	
T1338 cl10	++	⇒ ↑		↑ ↑; Δ ↑	-	个↗	(-)	∖רע	
T1338 cl2	+	\nearrow		ע∆;עע	(+)	$\rightarrow \rightarrow$	-	↑↗	
T1338 cl8	+	$\uparrow \uparrow$		↓↓;Δ↓	(+)	$\rightarrow 7$	(-)	$\downarrow \uparrow$	
T1338 cl3	(+)	77		∖,∆ ↓	(+)	个フ	(-)	$ \land \uparrow$	
T1338 cl6	(+)	${\bf \wedge} \rightarrow$		↑ ↓; Δ→	~	个↗	~	$\rightarrow \uparrow$	
T1440 cl5-1	-	\checkmark	++	ער	++	И		n.d.	
T1440 cl5		$\uparrow \checkmark$	+	ער	+	ער	(-)	ע ע	
T1440 cl4		⊅ ↑	~	↑↓	~	≜≜	-	1	
T1440 cl8		↑ ↑		אַר	++	$\rightarrow \rightarrow$		n.d.	
T1464 cl18	++	Ъ	0	n.d.	+	\downarrow	n.d.	n.d.	
T1464 cl6	+	7	0	n.d.	(+)	\rightarrow	n.d.	n.d.	
T1464 cl8	~	n.d.	0	n.d.	(+)	n.d.	n.d.	n.d.	
T1464 cl21	~	\rightarrow	0	n.d.	+	\checkmark	n.d.	n.d.	
T1464 cl27	-	n.d.	0	n.d.	++	n.d.	n.d.	n.d.	
T1464 cl16		1	0	n.d.	+	\rightarrow	n.d.	n.d.	
T1464 cl1		<u>↑</u>	0	n.d.	+	\rightarrow	n.d.	n.d.	
T1464 cl11		\uparrow	0	n.d.	+		n.d.	n.d.	
T1452 cl15	~	7	-	7	~	↓	(+)	n.d.	
T1452 cl16	(-)	1	(-)	\rightarrow	+	↓	(+)	n.d.	
T1452 cl21		<u>↑</u>		7		\rightarrow	~	n.d.	
T1452 cl10		\uparrow	-	\uparrow	~	\downarrow	(+)	n.d.	
T1452 cl20		1	-	\rightarrow		<u>↓</u>	n.d.	n.d.	
T1452 cl14		n.d.	(-)	n.d.	(+)	n.d.	n.d.	n.d.	
11452 cl155		<u> </u>		<u>↓</u>	(-)	<u>↓</u>		n.d.	
T1495 cl26	++	n.d.	++	n.d.	-	n.d.		n.d.	
11495 cl13	++	n.d.	++	n.d.	(-)	n.d.		n.d.	
T1495 cl12	++	n.d.	++	n.d.		n.d.		n.d.	
11495 cl16	++	n.d.	++	n.d.	(-)	n.d.		n.d.	
T1495 CI4	++	n.d.	++	n.d.	(-)	n.d.		n.d.	
11495 cl14	+	n.d.	++	n.d.	(-)	n.d.		n.d.	
11495 cl37	+	n.d.	++	n.d.	-	n.d.		n.d.	

Tab. 22: Differenzierungsassoziierte Faktoren und Sox2-Expression in Klonen.

Expression differenzierungsassoziierter Faktoren und Anteil CD31-positiver Zellen relativ zur Mutterkultur, absteigend nach ihrer jeweiligen Sox2-Expression sortiert. Die Variation der Expression bzw. des Anteils CD31-positiver Zellen mit zunehmender Passagenzahl wird durch Pfeile repräsentiert, wobei jeder Pfeil die Veränderung zur vorherigen, analysierten Passage darstellt. – Sox2, *sex determining region Y-box* 2; GFAP, *glial fibrillary acidic protein*; CD31, PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule* 1); ~, Unterschied < 10%; (+), Expression < 50% erhöht; +, Expression > 50% und < 100% erhöht; ++, Expression mindestens 2-fach erhöht; (-), Expression > 10% und < 25% reduziert; -, Expression > 25% und < 50% reduziert; --, Expression um mindestens 50% reduziert; \uparrow , Anstieg > 2x; \uparrow , Anstieg > 50%; \neg , Anstieg > 10%; \searrow , Reduktion > -10%; \downarrow , Reduktion > -25%; \downarrow , Reduktion > -50%; \rightarrow , keine Veränderung; n.d., nicht getestet; Δ , über alle Passagen definiert; 0, kein Signal.

Klon	So	x2	FAI	BP7	Mus	ashi	PAX6		0	CD133
T1440 cl5		$\uparrow \downarrow$	~	▲▼	(-)	7		个刁		个个↓↘
T1440 cl4		⊅ ↑	-	→↗	(-)	\downarrow	(+)	$\rightarrow \downarrow$		\uparrow
T1464 cl18	++	L Г	+	7	(+)	7	+	R		7
T1464 cl1		1	(-)	7	(+)	\rightarrow	(+)	7		n.d.
T1452 cl15	~	7	(+)	L И	(+)	L И	+	\downarrow	~	1
T1452 cl16	(-)	1	(+)	\rightarrow	-	7	~	\rightarrow	~	\rightarrow
T1452 cl10		\uparrow	~	7	-	7	++	\checkmark	++	\downarrow
T1452 cl155		1		Ъ	-	Ъ	+	\checkmark	++	\downarrow
T1495 cl13	++	n.d.	(+)	n.d.	(+)	n.d.		n.d.	+	n.d.
T1495 cl14	+	n.d.	-	n.d.	(+)	n.d.	(-)	n.d.	++	n.d.

Tab. 23: Stammzellassoziierte Faktoren in tumorigen SLGC-Klonlinien.

Expression stammzellassoziierter Faktoren und Anteil CD133-positiver Zellen in Klonen, die im Mausmodell in der Lage waren einen Tumor zu generieren. Die Expressionen und der Anteil CD133-positiver Zellen sind in Relation zur jeweiligen Mutterkultur angegeben und die Variationen mit zunehmender Passagenzahl durch Pfeile repräsentiert, wobei jeder Pfeil die Veränderung zur vorherigen, analysierten Passage darstellt. – Sox2, *sex determining region Y-box* 2; FABP7, *fatty acid binding protein* 7; PAX6, *paired-box protein* 6; CD133, Prominin 1; ~, Unterschied < 10%; (+), Expression < 50% erhöht; +, Expression > 50% und < 100% erhöht; ++, Expression mindestens 2-fach erhöht; (-), Expression > 10% und < 25% reduziert; -, Expression > 25% und < 50% reduziert; --, Expression um mindestens 50% reduziert; \uparrow , Anstieg > 2x; \uparrow , Anstieg > 50%; \urcorner , Anstieg > 10%; \lor , Reduktion > -10%; \checkmark , Reduktion > -25%; \checkmark , Reduktion > -50%; \rightarrow , keine Veränderung.

Klon	So	x2	GF	АР	Ta	Tau CD31 <i>c-m</i>		с-тус	
T1440 cl5		$\uparrow \downarrow$	+	⊿↓	+	אַר	(-)	תת	
T1440 cl4		⊅ ↑	~	↑↓	~	▲⊅	-	1	
T1464 cl18	++	Г	0	n.d.	+	\downarrow	n.d.	n.d.	+
T1464 cl1		1	0	n.d.	+	\rightarrow	n.d.	n.d.	(-)
T1452 cl15	~	7	-	7	~	\downarrow	(-)	n.d.	(+)
T1452 cl16	(-)	1	(-)	\rightarrow	+	1	~	n.d.	
T1452 cl10		\uparrow	-	\uparrow	~	\downarrow	~	n.d.	-
T1452 cl155		1		\downarrow	(-)	\downarrow	~	n.d.	(-)
T1495 cl13	++	n.d.	++	n.d.	(-)	n.d.		n.d.	
T1495 cl14	+	n.d.	++	n.d.	(-)	n.d.		n.d.	

Tab. 24: Differenzierungsassoziierte Faktoren, Sox2- und *c-myc*-Expression in tumorigen SLGC-Klonlinien.

Expression differenzierungsassoziierter Faktoren, Anteil CD31-positiver Zellen sowie Sox2-Protein- und *c-myc*-mRNA-Expression in Klonen, die im Mausmodell in der Lage waren einen Tumor zu generieren. Die Expressionen und der Anteil CD31-positiver Zellen sind in Relation zur jeweiligen Mutterkultur angegeben und die Variationen mit zunehmender Passagenzahl durch Pfeile repräsentiert, wobei jeder Pfeil die Veränderung zur vorherigen, analysierten Passage darstellt. – Sox2, *sex determining region Y-box* 2; GFAP, *glial fibrillary acidic protein*; CD31, PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule* 1); ~, Unterschied < 10%; (+), Expression < 50% erhöht; +, Expression > 50% und < 100% erhöht; ++, Expression mindestens 2-fach erhöht; (-), Expression > 10% und < 25% reduziert; -, Expression > 25% und < 50% reduziert; --, Expression um mindestens 50% reduziert; \uparrow , Anstieg > 2x; \uparrow , Anstieg > 50%; \urcorner , Anstieg > 10%; \lor , Reduktion > -10%; \downarrow , Reduktion > -25%; \blacklozenge , Reduktion > -50%; \rightarrow , keine Veränderung; n.d., nicht getestet.

Klon	Sox2		FABP7		Musa	ashi	PA	X6	CD133		
T1440 cl8		↑ ↑	(+)	$\downarrow \downarrow \downarrow$	~	К	(+)	\rightarrow		1	
T1464 cl21	~	\rightarrow	(+)	К	~	\rightarrow	+	\downarrow		1	
T1464 cl16		1		n.d.	+	n.d.	+	n.d.	~	И	
T1452 cl20		1	~	7	-	1	+	\uparrow	++	7	
T1495 cl26	++	n.d.	+	n.d.	+	n.d.		n.d.	++	n.d.	

Tab. 25: Stammzellassoziierte Faktoren in nicht-tumorigen SLGC-Klonlinien.

Expression stammzellassoziierter Faktoren und Anteil CD133-positiver Zellen in Klonen, die im Mausmodell **nicht** in der Lage waren einen Tumor zu generieren. Die Expressionen und der Anteil CD133-positiver Zellen sind in Relation zur jeweiligen Mutterkultur angegeben und die Variationen mit zunehmender Passagenzahl durch Pfeile repräsentiert, wobei jeder Pfeil die Veränderung zur vorherigen, analysierten Passage darstellt. – Sox2, *sex determining region Y-box* 2; FABP7, *fatty acid binding protein* 7; PAX6, *paired-box protein* 6; CD133, Prominin 1; ~, Unterschied < 10%; (+), Expression < 50% erhöht; +, Expression > 50% und < 100% erhöht; ++, Expression mindestens 2-fach erhöht; -, Expression > 25% und < 50% reduziert; --, Expression um mindestens 50% reduziert; \uparrow , Anstieg > 2x; \uparrow , Anstieg > 50%; iag, Anstieg > 10%; iag, Reduktion > -10%; iag, Reduktion > -25%; iag, Reduktion > -50%; iag, keine Veränderung; n.d., nicht getestet.

Klon	Sox2		GFAP		Tau		CD31		с-Мус
T1440 cl8		↑ ↑		ער	++	$\rightarrow \rightarrow$		n.d.	
T1464 cl21	~	\rightarrow	0	n.d.	+	\downarrow	n.d.	n.d.	-
T1464 cl16		\uparrow	0	n.d.	+	\rightarrow	n.d.	n.d.	
T1452 cl20		1	-	\rightarrow		\downarrow	~	n.d.	-
T1495 cl26	++	n.d.	++	n.d.	-	n.d.		n.d.	-

Tab. 26: Differenzierungsassoziierte Faktoren, Sox2- und *c-myc*-Expression in nicht-tumorigen SLGC-Klonlinien.

Expression differenzierungsassoziierter Faktoren, Anteil CD31-positiver Zellen sowie Sox2-Protein- und *c-myc*-mRNA-Expression in Klonen, die im Mausmodell *nicht* in der Lage waren einen Tumor zu generieren. Die Expressionen und der Anteil CD31-positiver Zellen sind in Relation zur jeweiligen Mutterkultur angegeben und die Variationen mit zunehmender Passagenzahl durch Pfeile repräsentiert, wobei jeder Pfeil die Veränderung zur vorherigen, analysierten Passage darstellt. – Sox2, *sex determining region Y-box 2*; GFAP, *glial fibrillary acidic protein*; CD31, PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule* 1); ~, Unterschied < 10%; +, Expression > 50% und < 100% erhöht; ++, Expression mindestens 2-fach erhöht; -, Expression > 25% und < 50% reduziert; --, Expression um mindestens 50% reduziert; \uparrow , Anstieg > 2x; \uparrow , Anstieg > 50%; \urcorner , Anstieg > 10%; \checkmark , Reduktion > -50%; \rightarrow , keine Veränderung; n.d., nicht getestet; 0, kein Signal.



Abb. 79: EGFR-Expression in SLGC-Linien und Klonen. Exemplarische Western blot-Analyse der EGFR-Expression in T1495- (links), T1440- (mittig) bzw. T1464- (rechts) Mutterkulturen und Klonen. Alle Kulturen wiesen das volle Länge EGFR-Protein (EGFR fl) auf. Die T1464-Klone wiesen zusätzlich eine starke Expression kleinerer Proteinfragmente auf, die verkürzte Varianten des EGFRs (EGFR tr) sein könnten. Aktin diente als Ladekontrolle. – EGFR, *epidermal growth factor receptor*.



Abb. 80: Exemplarische Western blot-Analysen in bestrahlten SLGC-Linien und Klonen. Exemplarische Western blot-Analyse der pATM-, pChk2-, pChk1- und γH2AX-Level über fünf Tage in T1442-, T1447 cl4- und T1522-Kulturen nach alleiniger Bestrahlung mit Strahlendosen, die sich an der ED₅₀ orientierten. Aktin bzw. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) diente als Ladekontrolle. – C, Kontrollbehandlung; h, Stunde; d, Tag; pATM, am Serylrest S1981 phosphoryliertes ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*); pChk2, am Serylrest S19 phosphorylierte Chk2 (*checkpoint kinase* 2); pChk1, am Serylrest S317 phosphorylierte Chk1 (*checkpoint kinase* 1); γH2AX, am Serylrest S139 phosphoryliertes Histon H2AX.



Abb. 81: Exemplarische Western blot-Analysen in behandelten SLGC-Linien und Klonen. Exemplarische Western blot-Analyse der pATM-, pChk2-, pChk1-, γ H2AX-, p53- und p21-Level über fünf Tage in T1371-, T1442- und T1495-Kulturen nach Bestrahlung und/oder Temozolomid-Behandlung. Aktin diente als Ladekontrolle. – C, Kontrollbehandlung (6 h-Wert); C_{d5}, Kontrollbehandlung (Wert am Tag d5); h, Stunde; d, Tag; T, Behandlung mit 100 µM Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+T, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 µM Temozolomid. pATM, am Serylrest S1981 phosphoryliertes ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*); pChk2, am Serylrest S19 phosphorylierte Chk2 (*checkpoint kinase* 2); pChk1, am Serylrest S317 phosphorylierte Chk1 (*checkpoint kinase* 1); γ H2AX, am Serylrest S139 phosphoryliertes Histon H2AX; p53, Tumorsuppressorprotein p53; p21, Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1/WAF1}.

			рАТМ			pChk2			pChk1			p53			p21			γΗ2ΑΧ	
		RT	RT+ TMZ	TMZ	RT	RT+ TMZ	TMZ	RT	RT+ TMZ	TMZ	RT	RT+ TMZ	TMZ	RT	RT+ TMZ	TMZ	RT	RT+ TMZ	TMZ
0	Max.	6h	(d1)	d1	d5	(d1)	d5	d4	(d1)	d3	d4	(d1)	d5	6h	-	-	d5	(d1)	d2
144	Anst.	16x	(15x)	10x	20x	(40x)	35x	14x	(21x)	20x	17x	(32x)	47x	Зx	-	-	12x	(18x)	23x
μ	Red.	↓ /→	-	Ы	-	-	-	\checkmark	-	\checkmark	→	-	-	\rightarrow	(↓)	(↓)	-	-	Ы
2	Max.	-	-	-	(6h)	-	-	-	-	-	6h	6h/d5	d1	6h/d1	6h	d2	d2	d2	d2
152	Anst.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3x	3,5/4,5x	2,5x	5,5/6x	10x	6x	5x	4x	5,5x
Ξ	Red.	-	-	-	(ビ)	-	-	-	-	-	И	↓↗/-	↓7			Ы	\rightarrow	(א) צ	(א) צ
	Max.	d4	d4	d3	6h/d4	6h	-	6h	6h	6h	d4	d4	d4	6h	6h	d4	d5	d4	d4
Г1371 [.] 8175Н	Anst.	4x	6x	8x	11x/ 13x *	3x *	-	+25%	2,5x	+75%	+70%	2x	+65%	4x	2,5x	4x	75x	100x	30x
	Red.	\rightarrow	Ы	\mathbf{V}	→/↓	1	∖/>	\rightarrow	1	\mathbf{V}	\rightarrow	Ы	\checkmark	↓/↘	⊻/→	-	-	Ы	2
2- V	Max.	6h	d1	d4	6h	d1	d2	6h	d2/d3	d2	d1	d2	d2	6h	-	-	6h	d1	d3
[44]	Anst.	10x	10x	6,5x	4x	4,5x	2,5x	2,5x	4,5/5x	6x	+85%	3x	Зx	2x	-	-	4x	4x	3,5x
T1 R2	Red.	Z	↓/→	-	→	Ы	\mathbf{V}	\checkmark	\mathbf{V}	\mathbf{V}	→	↓ /→	↓ /→	Ы	(🔽)	(🔽)	М	Ы	\rightarrow
14)	Max.	6h	6h	6h	6h	6h	d3	-	6h	-	d1	d1	6h	d1	-	(d5)	d1	6h	d2
17 c 39[Anst.	67x	65x	30x	5x	4,5x	2,5x	-	+25%	-	3x	3x	+70%	2,5x	-	-	+80%	+60%	+20%
T144 -N2	Red.	\rightarrow	↓ 0	\checkmark	→	↓/↘	÷	(↓)	↓/↘	(凶)	→	И	Ы	↓	(↓/ →)	(↓/ ↗)	Ы	Ы	\checkmark
	Max.	d4	6h/ d4	6h/ d4	6h	(6h) d2	(6h) d4	d2	6h	6h	d3	d4	d2	6h	d2	d2	d5	d5	d5
-1495 [.] 8273H	Anst.	60x	30x/ 69x	30x/ 68x	55x *	(20x) 24x *	(2,5) 3,5x	7,5x	6,5x	6x	2x	3x	2,5x	+15%	2x	+65%	14,5x	16,5x	17x
μч	Red.	→	-	↓ /	Ы	\checkmark	(→) ⊻	М	1	1	\rightarrow		Ы	\checkmark	↓ /→	\checkmark	-	-	-

Tab. 27: Phosphorylierung bzw. Expression von Proteinen der DNA-Schadenserkennung und Signaltransduktion in SLGC-Linien und Klonen.

Phosphorylierung bzw. Expression von Proteinen, die in der DNA-Schadensantwort und Signaltransduktion beteiligt sind, nach Bestrahlung mit 5 Gy (RT), Behandlung mit 100 μ M Temozolomid (TMZ) oder der Doppelbehandlung (RT+TMZ). – pATM, am Serylrest S1981 phosphoryliertes ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*); pChk2, am Serylrest S19 phosphorylierte *checkpoint kinase* 2; am Serylrest S317 phosphorylierte *checkpoint kinase* 1; γ H2AX, am Serylrest S139 phosphoryliertes Histon H2AX; Max., Zeitpunkt des maximalen Levels; h, Stunde; d, Tage; Anst., Anstieg des Levels relativ zur Kontrolle; Red., Reduktion des Anteils nach Erreichen des Maximums; \rightarrow , kaum/unverändert; \checkmark , langsam; \downarrow , schnell; \downarrow 0, schnell und komplett; \neg , leichter Anstieg; *, Ergebnisse zwei verschiedener Western blot-Serien; -, nicht vorhanden.



Abb. 82: H2AX-Phosphorylierung in T1371 cl2 nach Einfach- und Doppelbehandlung. Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α - γ H2AX (rot) und α Nestin (grün) von behandelten Kulturen bzw. korrespondierenden Kontrollen (DMSO). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Messbalken, 50 μ m. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139; DMSO, Dimethylsulfoxid.



Abb. 83: H2AX-Phosphorylierung in T1442 cl16 nach Einfach- und Doppelbehandlung. Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α – γ H2AX (rot) und α Nestin (grün) von behandelten Kulturen bzw. korrespondierenden Kontrollen (DMSO). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Messbalken, 50 μ m. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139; DMSO, Dimethylsulfoxid.



Abb. 84: H2AX-Phosphorylierung in T1447 cl1 nach Einfach- und Doppelbehandlung. Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α - γ H2AX (rot) und α Nestin (grün) von behandelten Kulturen bzw. korrespondierenden Kontrollen (DMSO). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Messbalken, 50 μ m. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139; DMSO, Dimethylsulfoxid.



Abb. 85: H2AX-Phosphorylierung in T1522 cl1 nach Einfach- und Doppelbehandlung. Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α - γ H2AX (rot) und α Nestin (grün) von behandelten Kulturen bzw. korrespondierenden Kontrollen (DMSO). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Messbalken, 50 μ m. – γ H2AX, Phosphorylierung des Histons H2AX am Serylrest S139; DMSO, Dimethylsulfoxid.



Abb. 86: Vitalität behandelter SLGC-Kulturen und U87MG nach Bestrahlung und/oder Temozolomid-Behandlung. Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Assay am Tag d4 bzw. im Fall von T1495 und T1495 cl13 am Tag d5. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen optischen Dichte (OD) von mindestens 16 parallelen Einzelwerten sowie die Standardabweichung. Die Mittelwerte wurden gegen die Kontrollproben normiert, deren OD (Mittelwert) als 1 definiert wurde. Die unterschiedlichen Behandlungen sind durch verschiedene Farbtöne repräsentiert. Die Signifikanzen sind als * (p < 0,05), ** (p < 0,01) und *** (p < 0,001) angegeben und die Bezugswerte durch Klammern verbunden. – C, Kontrollbehandlung; TMZ, Temozolomid-Behandlung mit EC₅₀; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy/EC₅₀ Temozolomid; MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromid.



Abb. 87: Expression von *cd133*-mRNA in behandelten T1495-Kulturen. Real-Time-PCR-Analyse von T1495-Kulturen nach Behandlung mit 100 μ M TMZ und/oder Bestrahlung mit 20 Gy. Die Expressionslevel von *cd133/prominin-1* wurde gegen diejenigen von drei Referenzgenen (*gapdh, ubc,* 18S *r-rna*) normalisiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte eines Triplikats von Reaktionen sowie die Standardabweichung. Statistisch signifikante Abweichungen sind mit * = p < 0,05, ** = p < 0,01 bzw. *** = p < 0,001 markiert und die Bezugsgrößen durch Klammern gekennzeichnet. Die unterschiedlichen Behandlungen sind durch verschiedene Farbtöne repräsentiert. – CD133, Prominin 1; C, Kontrollbehandlung; TMZ, 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, 5 Gy/100 μ M Temozolomid; *gapdh*, Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase; *ubc*, Ubiquitin Ligase C; *r-rna*, ribosomale Ribonukleinsäure.



Abb. 88: Nestin- und Sox2-Expression in T1442 nach Einfach- und Doppelbehandlung. Mikrofotografien der immunzytologischen Analysen mit α -Sox2 (rot) und α Nestin (grün) von behandelten Kulturen bzw. korrespondierenden Kontrollen (C). TMZ, Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; RT, Bestrahlung mit 5 Gy; RT+TMZ, Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M Temozolomid. Messbalken, 50 μ m. – Sox2, *sex determining region Y-box* 2; d, Tag.

Behandlung	Anstieg	unverändert	Reduktion
Temozolomid	T1371 cl2, cl3, cl15	T1442 cl1, cl5, cl16	T1371-R175H
	T1442 cl6	T1522 cl2, cl4, cl5, cl7, cl10	T1442-R248W
	T1447 cl10		T1447 cl4-N239D
	T1522 cl1		(T1452 cl10- <i>splice</i> -Mut.)
			T1495-R273H
			T1371 cl16
			T1442 cl9, cl13, cl14, cl15
Bestrahlung	T1371 cl2	T1371 cl3	T1371-R175H
	T1442 cl6	T1442 cl14, cl15, cl16	T1442-R248W
		T1447 cl10	T1447 cl4-N239D
		T1522 cl2, cl7, cl10	T1452 cl10- <i>splice</i> -Mut.
			T1495-R273H
			T1371 cl15, cl16
			T1442 cl1, cl5, cl9, cl13
			T1522 cl1, cl4, cl5
Doppelbehandlung	T1371 cl2, cl15, cl16	T1371 cl3	T1371-R175H
	T1442 cl1, cl5	T1442 cl6	T1442-R248W
	T1447 cl10	T1522 cl1, cl5, cl7, cl10	T1447 cl4-N239D
	T1522 cl2		T1452 cl10-splice-Mut.
			T1495-R273H
			T1442 cl9, cl13, cl14, cl15, cl16
			T1522 cl4

Tab. 28: Behandlungsspezifische Veränderung des Anteils CD133-positiver Zellen in SLGC-Linien und Klonen.

CD133, Prominin 1; (Klon), tendenzielle Reduktion; R175H, Arginin 175 durch Histidin ersetzt; R273H, Arginin 273 durch Histidin ersetzt; R248W, Arginin 248 durch Tryptophan ersetzt; N239D, Asparagin 239 durch Aspartat ersetzt; *splice*-Mut., Mutation an der *splice*-Stelle im Intron zwischen Exon 6 und Exon7. Eigene Daten, Arbeiten der Masterstudentin G. Huber (2016) sowie persönliche Mitteilung von C. Zechel.

Behandlung	Anstieg	unverändert	Reduktion
Temozolomid	(T1447 cl4-N239D)	T1371 cl2	T1371-R175H (transient)
	T1495-R273H	T1442 cl5	T1442-R248W
	T1371 cl6		T1452 cl10- <i>splice</i> -Mutante
	T1442 (cl1), cl9		T1371 cl3
	T1447 cl10		T1442 cl6
	T1522 cl1, cl2, cl4, cl5		
Bestrahlung	(T1447 cl4-N239D)	T1495-R273H	T1371-R175H
	T1371 cl3	T1442 cl5	T1442-R248W
	T1442 cl1, cl9	T1447 cl10	T1452 cl10-splice-Mutante
	T1522 cl1	T1522 cl4, cl5	T1371 cl2, cl16
			T1442 cl6
			T1522 cl2
Doppelbehandlung	T1447 cl4-N239D	T1442 cl5	T1371-R175H
	T1495-R273H		T1442-R248W
	T1442 (cl1), cl9		T1452 cl10-splice-Mutante
	T1522 cl1, cl2, cl4, cl5		T1371 cl2, cl3, cl16
			T1442 cl6
			T1447 cl10

Tab. 29: Behandlungsspezifische Veränderung des Anteils Sox2-positiver Zellen in SLGC-Linien und Klonen.

Sox2, *sex determining region Y-box* 2; (Klon), tendenzielle Zunahme; R175H, Arginin 175 durch Histidin ersetzt; R273H, Arginin 273 durch Histidin ersetzt; R248W, Arginin 248 durch Tryptophan ersetzt; N239D, Asparagin 239 durch Aspartat ersetzt; *splice*-Mut., Mutation an der *splice*-Stelle im Intron zwischen Exon 6 und Exon7. Eigene Daten, Arbeiten der Masterstudentin G. Huber (2016) sowie persönliche Mitteilung von C. Zechel.

Danksagung

Zu allererst bedanke ich mich besonders bei meinem "Doktorvater" PD Dr. rer. nat. Christina Zechel, die mich durch viele Diskussionen zur kritischen Auseinandersetzung mit den Ergebnissen ermunterte, bei Problemen ein offenes Ohr hatte und mich in meiner Entwicklung stets unterstützte.

Ich danke Prof. Dr. med. Volker Tronnier für die Möglichkeit meine Dissertation in dem Labor für Neuroonkologie und Molekularbiologie der Klinik für Neurochirurgie durchführen zu können.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. med. Manfred Westphal, der die U87MG-Gliomzelllinie zur Verfügung stellte, und bei Prof. Dr. Dr. med. Jens Habermann, der die CaCo-2-Zelllinie stellte. Ich danke dem Labor der Urologie und dem Labor der Rheumatologie für die Möglichkeit den Real-Time PCR Cycler nutzen zu können. Zudem gilt mein Dank dem Institut für Systemische Entzündungsforschung und besonders Dr. rer. nat. Tillman Vollbrandt für die Unterstützung bei der Handhabung des Durchflusszytometers und bei Fragen zum *fluorescence-activated cell sorting*. Weiteren Dank gilt den Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie, die die Bestrahlung der Zellen übernahmen und stets flexibel auf meine Terminvorstellungen reagierten. Auch danke ich dem Routinelabor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie für die Möglichkeit die Mäusegehirne in Paraffin einzubetten und für die Hilfe bei jeglichen Fragen diesbezüglich.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Edith Pawlak, die mich bei der Zellkultur, den immunzytologischen sowie Western blot-Analysen im zweiten Teil dieser Arbeit unterstützte und einige SLGC-Linien klonal expandierte. Auch gilt mein Dank Frau Susanne Behling, die mich bei den histologischen Analysen der Mäusegehirne sowie den immunzytologischen Analysen der behandelten Zellen unterstützte. Ebenso bedanke ich mich bei PD Dr. rer. nat. Christina Zechel, Dr. med. Jan Leppert und Dr. med. Jan Küchler sowie Anna Limpert, Elsie Dei-Anane und Yousuf Alkanan, die sowohl die Xenotransplantationen, die Opferung der Mäuse sowie die Entnahme der Gehirne durchgeführt haben. Zudem danke ich Dr. rer. nat. Isabel Choschzick für die Unterweisung in die verwendeten Methoden und für die Unterstützung bei jeglicher Art von Problemen. Ich danke ebenfalls Sara Roth, die einen Teil der klonalen Expansionen durchgeführt hat.

Zudem möchte ich mich bei der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck und dem CAnaCore für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Prof. Dr. med. Dirk Rades, der meine Stelle in Kooperation mit Prof. Dr. med. Volker Tronnier finanzierte und mich bei den Bestrahlungsversuchen unterstützte. Ebenfalls bedanke ich mich bei der Werner und Klara Kreitz-Stiftung, die das Projekt gefördert hat.

Ich bedanke mich auch bei dem gesamten Laborteam für das freundschaftliche Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen.

Darüber hinaus gilt mein Dank meiner Familie und vor allem meinem Lebensgefährten, der mich stets unterstützt und den Rücken stärkt. Danke.