

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

Induktion und subzelluläre Lokalisation von Rad51
in stammzellähnlichen Gliomzellen
nach Bestrahlung

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Cecil Alexander Carl
aus Hamburg

Lübeck 2020

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. et med. Christina Zechel
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Beate Stöckelhuber

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2020

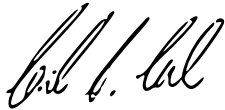
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.09.2020

Promotionskommission der Sektion Medizin

Versicherung an Eides statt

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfen oder Hilfsmittel in Anspruch genommen habe. Textabschnitte und Zitate, die ich wörtlich oder inhaltlich übernommen habe, wurden von mir nach bestem Wissen und Gewissen als solche gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich an keiner anderen Stelle einen Antrag auf Zulassung zur Promotion gestellt, diese Dissertation vorgelegt oder mich einem Promotionsverfahren unterzogen habe.



Cecil Alexander Carl

Lübeck, 06. Februar 2020

Inhaltsverzeichnis

Versicherung an Eides statt	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Glioblastoma multiforme	1
1.2 GBM-Rezidive und stammzellähnliche Gliomzellen	3
1.3 Rad51 und die homologe Rekombination	7
1.4 TP53 Tumorsuppressor	10
1.5 Fragestellung	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Zelllinien	15
2.1.2 Zellkulturmedien	17
2.1.3 (Bio)Chemikalien, Wachstumsfaktoren, Puffer und Lösungen	17
2.1.4 Verbrauchsmaterial, Geräte und Hilfsmittel	20
2.2 Methoden	20
2.2.1 Zellkultur	20
2.2.2 Behandlung der Zellen	22
2.2.3 Proteinextraktion	22
2.2.4 SDS-PAGE	23
2.2.5 Western Blot	24
2.2.6 Immuncytochemische Analysen	26
2.2.7 Statistik	27
3 Ergebnisse	29
3.1 Veränderung der Rad51-Expression nach Bestrahlung und Behandlung mit TMZ	29
3.1.1 Basislevel der Rad51- und TP53-Expression	29
3.1.2 Induzierbarkeit der Rad51- und TP53-Expression in SLGC-Linien mit TP53-Wildtyp	30
3.1.3 Induzierbarkeit der Rad51- und TP53-Expresssion in SLGC-Linien mit TP53- <i>gain of function</i> -Mutation	34

3.1.4	Induzierbarkeit der Rad51- und TP53-Expresssion in einer SLGC-Linie mit TP53- <i>missense</i> -Mutation.....	37
3.1.5	Induzierbarkeit der Rad51- und TP53-Expresssion in einer SLGC-Linie mit TP53-Spleiß-Mutation.....	38
3.1.6	Induzierbarkeit der Rad51- und TP53- Expression nach Einfach- und Doppelbehandlung der TP53 _{GOF} -SLGC-Linie T1495	38
3.2	Veränderung der subzellulären Lokalisation von Rad51 nach Bestrahlung und Behandlung mit TMZ	42
3.2.1	Rad51-positive Zellkerne in Zelllinien mit TP53-Wildtyp	45
3.2.2	Rad51-positive Zellkerne in SLGC-Linien mit TP53- <i>gain of function</i> -Mutation.....	46
3.2.3	Rad51-positive Zellkerne in einer SLGC-Linie mit TP53- <i>missense</i> -Mutation	48
3.2.4	Zusammenhang zwischen Rad51-positiven Zellkernen und den Analyseparametern	48
4	Diskussion.....	50
4.1	Rad51 wird in SLGCs aus verschiedenen Patienten exprimiert.....	50
4.2	Die Bestrahlung von SLGCs führt zu einem Anstieg der Rad51- und TP53-Expression	51
4.3	Induktion von Rad51 in SLGCs mit unterschiedlichem TP53-Status	54
4.4	Die Bestrahlung von SLGCs führt zu einer Translokation von Rad51 in den Zellkern.....	55
4.5	Intranukleäre Translokation von Rad51 in SLGCs mit unterschiedlichem TP53-Status	56
4.6	Die zusätzliche TMZ-Behandlung kann die Induktion und intranukleäre Translokation von Rad51 beeinflussen	58
4.7	Schlussfolgerungen und Ausblick	59
5	Zusammenfassung	62
6	Literaturverzeichnis	63
6.1	Internationale Journale und Bücher	63
6.2	Zitierte Dissertationen der Arbeitsgruppe	73
7	Abbildungsverzeichnis.....	74

8	Tabellenverzeichnis	76
9	Anhang.....	77
10	Danksagungen.....	87
11	Lebenslauf.....	88

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	<i>alternative reading frame</i>
ATM	<i>ataxia teleangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ataxia teleangiectasia and Rad3-related protein</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BRCA2	<i>breast cancer 2</i>
BrdU-ELISA	<i>5-bromo-2'-deoxyuridine-enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
CDK1	<i>cyclin-dependent kinase 1</i>
CDK2	<i>cyclin-dependent kinase 2</i>
CDK4	<i>cyclin-dependent kinase 4</i>
Chk1	<i>checkpoint kinase 1</i>
Chk2	<i>checkpoint kinase 2</i>
CtIP	<i>C-terminal-binding protein-interacting protein</i>
D	Deutschland
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLX2	<i>distal-less homeobox 2</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA RE	<i>DNA response elements</i>
EC ₅₀	Effektivkonzentration 50
ED ₅₀	Effektivdosis 50
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FABP7	<i>fatty acid binding protein 7</i>
FCS	fetales Kälberserum
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
GOF	<i>gain of function</i>
GSarc	Gliosarkom

GSC	<i>glioma stem cell</i>
Gy	Gray
h	Stunde
HR	Homologe Rekombination
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
IDH1	Isozitat-Dehydrogenase 1
LOF	<i>loss of function</i>
M	Molar
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MDM4	<i>mouse double minute 4 homolog</i>
MeDIP	<i>methylated DNA immunoprecipitation</i>
MeV	Megaelektronenvolt
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
MIRA-3	<i>mimicking intelligent read assembly 3</i>
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MSP	methylierungsspezifische PCR
NES	<i>nuclear export signal</i>
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PIC	Proteinase Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PRIMA-1	<i>proline-rich membrane anchor 1</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
Rad51C	<i>Rad51 paralog C</i>
RPA	Replikationsprotein A
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SLGC	<i>stem-like glioma cell</i>
SOX2	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
ssDNA	Einzelstrang- (<i>single-stranded</i>) DNA
STIMA-1	<i>SH group-targeting compound that induces massive apoptosis 1</i>

TBR2	<i>T-box brain protein 2</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIC	<i>tumor-initiating cells</i>
TMZ	Temozolomid
TP53	<i>tumor protein p53</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U87MG	<i>Uppsala 87 malignant glioma</i>
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
WCE	<i>whole cell extract</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
x g	x-fach Erdbeschleunigung
XRCC3	<i>X-ray repair cross complementing 3</i>

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist das häufigste und aggressivste primäre Malignom des zentralen Nervensystems und mit einer äußerst schlechten Prognose verbunden (Wainwright et al., 2012; Wilson et al., 2014). Trotz aggressiver Therapiemethoden, wie einer chirurgischen Resektion und einer kombinierten Radiochemotherapie, liegt das mediane Überleben für Patienten mit einem GBM bei gerade einmal 14,6 Monaten (Stupp et al., 2005) und die 5-Jahres-Überlebensrate bei lediglich 10% (Wen und Kesari, 2008). Die jährliche Inzidenzrate liegt in Europa bei 3,5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Ohgaki und Kleihues, 2005).

GBMs werden von der *World Health Organisation* (WHO) als Grad IV Gliome klassifiziert und können in primäre und sekundäre GBMs eingeteilt werden (Wilson et al., 2014). Etwa 90% der GBMs sind primäre GBMs und treten *de novo*, ohne weniger maligne Vorläuferläsionen auf. Sekundäre GBMs hingegen entwickeln sich aus initial niedrigmalignen diffusen Astrozytomen (WHO Grad II) oder aus anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III) (Ohgaki und Kleihues, 2013). Das Durchschnittsalter von Patienten mit primären GBMs ist mit 55 Jahren höher als das von Patienten mit sekundären GBMs, das bei 40 Jahren liegt (Wilson et al., 2014). Sekundäre GBMs sind mit einer besseren Prognose und einer erhöhten Gesamtüberlebenszeit assoziiert (Wilson et al., 2014). Histopathologisch sind primäre und sekundäre GBMs kaum voneinander zu unterscheiden, allerdings weisen beide bestimmte charakteristische genetische Veränderungen auf, die eine Unterscheidung ermöglichen (Watanabe et al., 1996). Insbesondere der Mutationsstatus der Isoziträt-Dehydrogenase 1 (IDH1) hat sich als wichtiger Marker für die Unterscheidung zwischen primären und sekundären GBMs etabliert (Louis et al., 2016; Wilson et al., 2014). Über 80% der sekundären und unter 5% aller primären GBMs weisen eine IDH1-Mutation auf. Damit ist der Nachweis einer IDH1-Mutation ein besseres Kriterium für die Klassifikation eines sekundären GBMs als klinische oder pathologische Kriterien (Louis et al., 2016; Ohgaki und Kleihues, 2013).

Obwohl das GBM eine ausgeprägte zelluläre und molekulare Heterogenität aufweist, kann es anhand von bestimmten genetischen und molekularen Profilen in vier Subtypen

eingeteilt werden: den klassischen, mesenchymalen, proneuralen und neuronalen Subtyp (Wilson et al., 2014). Sekundäre GBMs weisen fast immer den proneuralen Subtyp auf, während primäre GBMs in vier Subtypen vorkommen. Dies deutet darauf hin, dass sekundäre GBMs eine homogene und primäre GBMs eine eher heterogene Tumorgruppe sind (Ohgaki und Kleihues, 2013). Der proneurale Subtyp des primären GBMs ist wie das sekundäre GBM mit einer besseren Prognose assoziiert (Phillips et al., 2006). Obwohl die neue WHO Klassifikation von Tumoren des Zentralnervensystems aus dem Jahr 2016 genetischen Veränderungen ein zunehmend größeres Gewicht bei der Klassifikation von Gliomen einräumt, kann aufgrund der hohen Komplexität der verschiedenen Tumoren noch nicht gänzlich auf eine histopathologische Untersuchung verzichtet werden (Louis et al., 2016). Das Gliosarkom (GSarc) ist eine seltene Variante (2%) des GBMs mit malignen glialen und sarkomatösen Anteilen (Cho et al., 2017). GSarcs sind mit einer schlechteren Prognose als GBMs assoziiert und metastasieren häufiger extrakraniell. Dennoch werden sie gegenwärtig wie das GBM therapiert (Cho et al., 2017).

Die Tatsache, dass es verschiedene GBM-Subtypen mit unterschiedlichen genetischen Veränderungen und Expressionsmustern gibt, legt die Vermutung nahe, dass ein Therapieweg nicht bei allen Subtypen gleich effektiv sein kann. Viel eher sollten GBMs zukünftig mit gezielten individuellen Therapien behandelt werden, die auf die molekularen Besonderheiten des einzelnen Tumors zugeschnitten sind (Wilson et al., 2014).

Die derzeitige Standardtherapie des GBMs besteht aus der chirurgischen Resektion und einer anschließenden kombinierten Radiochemotherapie, gefolgt von einer adjuvanten Chemotherapie (Clarke et al., 2010). Ein gängiges Konzept hierbei ist das Stupp-Protokoll, bei dem die Tumorkavität in Fraktionen von 2 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 60 Gy bestrahlt wird und eine begleitende adjuvante Chemotherapie mit dem alkylierenden Zytostatikum Temozolomid (TMZ) erfolgt. Nach dem Ende der Bestrahlung wird die adjuvante Chemotherapie mit TMZ über bis zu sechs Zyklen fortgeführt (Stupp et al., 2005). Die Strahlentherapie wirkt dabei vor allem über die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in den proliferierenden Tumorzellen (Clarke et al., 2010). Das alkylierende Zytostatikum TMZ wirkt über die Methylierung von Purinbasen der DNA, vorzugsweise von Guaninresten, wodurch O6-Methylguanin entsteht (Zhang et al., 2012). Dadurch kommt es während der DNA-Replikation zu Basenfehlpaarungen und mehreren Zyklen vergeblicher DNA-Mismatch-Reparatur, die schließlich zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen führen (Ito et al., 2013). Außerdem erzeugen die methylierten

Purinbasen DNA-Einzelstranglücken (*single strand gaps*), die die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen an diesen Stellen, bei anschließender Bestrahlung im Sinne einer Radiosensitivierung, begünstigen (Bobola et al., 2010). Die O-6-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT), ein DNA-Reparaturprotein, ist in der Lage, die Methylgruppe von der O6-Position des Guaninrests zu entfernen und so einen DNA-Schaden von der Zelle abzuwenden. MGMT schützt somit die Tumorzellen vor der alkylierenden Wirkung von TMZ (Villalva et al., 2012). Bei einigen Patienten ist die Expression des MGMT-Proteins infolge einer Methylierung des Promoters des MGMT-Gens vermindert, wodurch es zu einer gesteigerten Sensitivität der Tumorzellen gegenüber TMZ kommt (Villalva et al., 2012). Der Methylierungsstatus des MGMT-Promoters liefert somit einen wichtigen Anhaltspunkt über die zu erwartende Wirksamkeit einer Therapie mit TMZ, wobei Patienten mit methyliertem MGMT-Promoter deutlich besser auf TMZ ansprechen, als Patienten mit unmethyliertem MGMT-Promoter (Stupp et al., 2009; Wilson et al., 2014). Viele tumorspezifische genetische Veränderungen in GBMs betreffen Rezeptortyrosinkinasen oder die nachgeschalteten Signalkaskaden von bestimmten Wachstumsfaktoren (Louis et al., 2016; Wilson et al., 2014). Es wird vermutet, dass die Mutationen zu einer inadäquaten Aktivierung dieser Signalwege führen und so das Tumorwachstum, die Invasion in das gesunde Hirngewebe und die Angiogenese fördern (Nakada et al., 2011). Die gezielte Hemmung dieser Signalwege könnte somit ein wichtiger Ansatzpunkt einer molekularen Tumorthherapie bei GBMs sein (Wilson et al., 2014). Relevante Signalkaskaden könnten hierbei der EGF-Signalweg (*epidermal growth factor*) oder der VEGF-Signalweg (*vascular endothelial growth factor*) sein (Nakada et al., 2011). Die molekularen Therapien, die derzeit in verschiedenen klinischen Studien entweder allein bei GBM-Rezidiven oder in Kombination mit einer Radiochemotherapie bei neudiagnostizierten GBMs eingesetzt werden, konnten bislang allerdings nur sehr geringe Therapievorteile erzielen (Wilson et al., 2014).

1.2 GBM-Rezidive und stammzellähnliche Gliomzellen

Die zentrale Schwierigkeit bei der Behandlung von GBMs ist das Auftreten von therapieresistenten Tumorrezidiven, trotz anfänglich gutem Therapieansprechen nach Tumoresektion und kombinierter Radiochemotherapie (Osuka und Van Meir, 2017). Die mediane Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs liegt bei 6,9 Monaten und in über 90% der

Fälle tritt das Rezidiv in unmittelbarer Nähe des Orts des Primärtumors auf (Nandeesh et al., 2018). Die GBM-Rezidive scheinen dabei aggressiver, invasiver und therapieresistenter als die Primärtumoren zu sein (Nandeesh et al., 2018). Für die Rezidiventstehung wird maßgeblich eine Gruppe der Tumorzellen verantwortlich gemacht, die über eine hohe Therapieresistenz verfügt, Stammzeleigenschaften aufweist und die Fähigkeit zur Tumorneubildung besitzt (Hadjipanayis und Van Meir, 2009; Osuka und Van Meir, 2017). Diese Zellen überleben im Gegensatz zu den allermeisten Tumorzellklonen die initiale Radiochemotherapie und initiieren anschließend das erneute Tumorwachstum (Osuka und Van Meir, 2017). Für eine erfolgreiche Therapie von GBMs ist es daher essenziell diese Tumorzellgruppe präzise zu charakterisieren, um sie gezielt therapeutisch anzugehen (Osuka und Van Meir, 2017).

GBMs weisen eine hohe intratumorale Heterogenität auf (Kim et al., 2015). Die tumorauslösenden Zellen (*tumor-initiating cells*, TIC) (Hadjipanayis und Van Meir, 2009), die aus verschiedenen Ursprungszellen, wie beispielsweise neuronalen Stammzellen oder Progenitoren hervorgehen können (Alcantara Llaguno et al., 2009), häufen genetische und epigenetische Veränderungen an und bringen eine Vielzahl unterschiedlicher Klone hervor. Hierdurch kommt es im GBM zu heterogenen klonalen Zellpopulationen (Osuka und Van Meir, 2017). Gemäß der Tumorstammzellhypothese bilden diese Zellpopulationen eine zelluläre Hierarchie aus, bei der die Gliomstammzelle (*glioma stem cell*, GSC) an der Spitze steht und Progenitoren und weiter differenzierte Tumorzellen aus dieser hervorgehen (Hadjipanayis und Van Meir, 2009).

Chen und Kollegen (2010) konnten zeigen, dass die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Tumorneubildung hierbei nicht auf eine uniforme Zellpopulation beschränkt ist. Sie entwickelten ein Modell, in dem sich diese Fähigkeiten auf drei verschiedene stammzellähnliche Zellpopulationen verteilen, die eine zelluläre Hierarchie ausbilden. An der Spitze dieser Hierarchie steht die CD133-negative Typ I-Zelle, die sehr tumorigen ist und CD133-positive und CD133-negative Zellen hervorbringen kann. Bei CD133 (Prominin-1) handelt es sich um ein transmembranöses Glykoprotein (Bao et al., 2006). Unterhalb der Typ I-Zelle steht in der Hierarchie die CD133-positive Typ II-Zelle, die sowohl CD133-positive Typ II-Zellen als auch CD133-negative Typ III-Zellen hervorbringen kann. Die Typ III-Zellen können sich ebenfalls selbst erhalten oder weiter differenzierte Tumorzellen hervorbringen. Die CD133-positiven Typ II- sowie die CD133-negativen Typ III-Zellen sind weniger tumorigen als die Typ I-Zellen. Typ II- und Typ III-

Zellen sind als Progenitoren zu betrachten, die im Vergleich zur Typ I-Zelle, der eigentlichen Gliomstammzelle, weiter differenziert sind. Typ I- und Typ II-Zellen zeigen eine hohe Expression von stammzellassoziierten Markern wie Nestin, SOX2 (*SRY (sex determining region Y)-box 2*) und FABP7 (*fatty acid binding protein 7*). Typ III-Zellen hingegen zeigen eine Expression von Markern intermediärer neuraler Progenitoren, wie TBR2 (*T-box brain protein 2*) und DLX2 (*distal-less homeobox 2*) (Chen et al., 2010; Abb. 1). Da die verschiedenen Tumorzellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Tumorneubildung besitzen, in vivo und in vitro gemeinsam auftreten, werden sie in dieser Arbeit unter dem Begriff „stammzellähnliche Gliomzellen“ (*stem-like glioma cells*, SLGCs) zusammengefasst. SLGCs sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur multipotenten Differenzierung in der Lage, sehr heterogene Gliome zu bilden (Osuka und Van Meir, 2017).

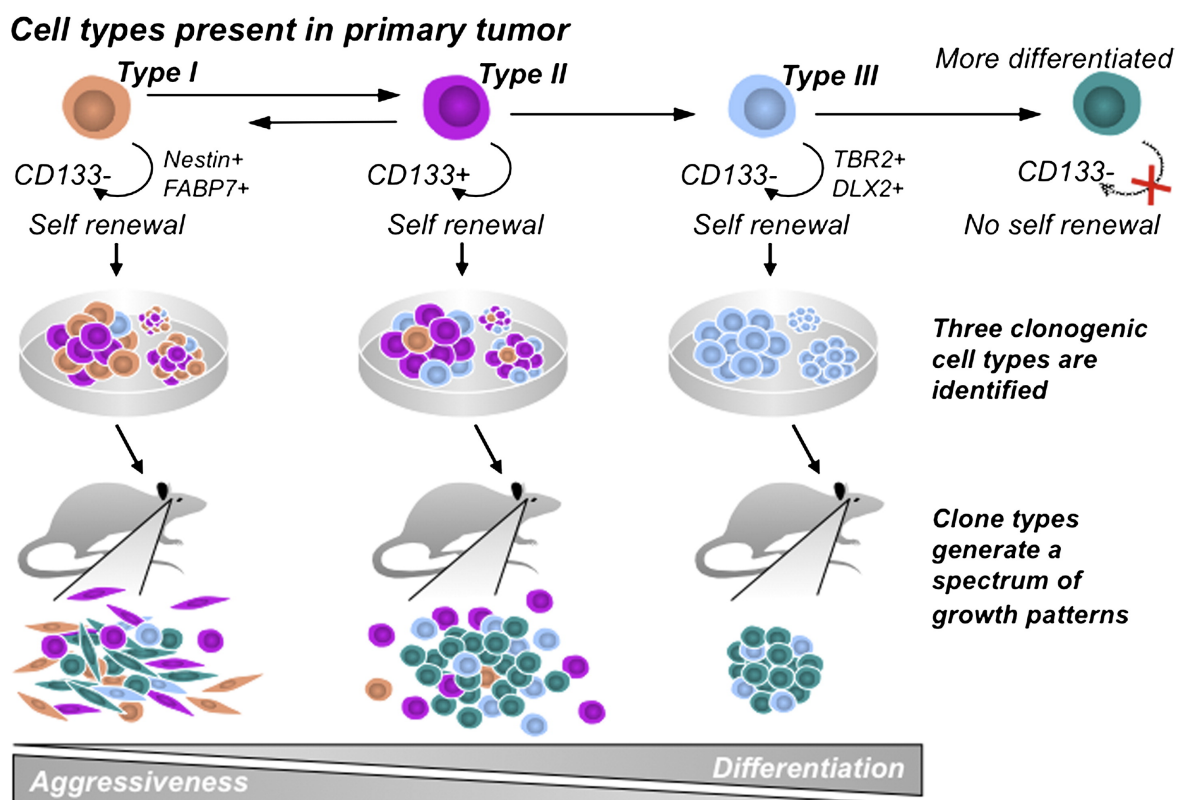


Abbildung 1: Zelluläre Hierarchie von stammzellähnlichen Gliomzellen in GBMs. Das Modell zeigt die stammzellähnlichen Typ I-, Typ II- und Typ III-Zellen sowie deren Wachstums- und Differenzierungsverhalten. Mit zunehmender Differenzierung von der Typ I-Zelle zur Typ III-Zelle kommt es zu einer Abnahme der Tumorigenität in Mausmodellen. FABP7: fatty acid binding protein 7; TBR2: T-box brain protein 2; DLX2: distal-less homeobox 2. Quelle: Chen et al., 2010

Zusätzlich zur zellulären Hierarchie ist davon auszugehen, dass in GBMs verschiedene Zellpopulationen mit einer molekularen Heterogenität am komplexen Vorgang der Rezidivbildung beteiligt sein können (Johnson et al., 2014). Somit würden verschiedene Hierarchien von SLGCs parallel existieren, die sich durch genetische und epigenetische Eigenschaften voneinander unterscheiden. Verbindende Eigenschaften aller SLGCs sind die gesteigerte Resistenz gegenüber der Radiochemotherapie und die Fähigkeit GBM-Rezidive zu bilden (Hadjipanayis und Van Meir, 2009).

SLGCs scheinen nicht nur über eine erhöhte Therapieresistenz zu verfügen, sondern auch unter der Therapie weitere Resistenzmechanismen auszubilden. Eine gesteigerte Effektivität in der Reparatur von DNA-Schäden stellt einen potenziell wichtigen Mechanismus bei der Entwicklung von Therapieresistenzen dar (Osuka und Van Meir, 2017). Bao und Kollegen (2006) konnten zeigen, dass CD133-positive SLGCs eine höhere Strahlenresistenz aufweisen, als die CD133-negativen Tumorzellen. Bei diesen Zellen kam es durch eine gesteigerte Aktivierung der DNA-Schadensantwort zu einer effektiveren Reparatur der strahleninduzierten DNA-Schäden. Die CD133-positiven SLGCs wiesen eine deutlich erhöhte Phosphorylierung der Kinasen ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*), Chk1 (*checkpoint kinase 1*) und Chk2 (*checkpoint kinase 2*) im Vergleich zu den CD133-negativen Tumorzellen auf mit einer nachfolgend erhöhten DNA-Reparaturkapazität. Das Modell von Chen und Kollegen (2010) (Abb. 1) zeigt, dass nur ein Teil der SLGCs CD133-positiv ist, die Typ II-Zellen. Hieraus ergibt sich die Frage, ob auch die CD133-negativen Typ I- und Typ III-Zellen eine erhöhte Strahlenresistenz aufgrund ähnlicher Mechanismen aufweisen. Der Zusammenhang zwischen Stammzeleigenschaften und Strahlenresistenz bei Typ I- und Typ III-Zellen wurde bisher nicht publiziert.

Ein weiterer kritischer Aspekt für die Rezidivbildung bei GBMs ist die hohe Invasivität der Tumorzellen, da diese das umliegende gesunde Hirnparenchym infiltrieren und so der operativen Resektion entgehen (Wainwright et al., 2012). Es gibt Hinweise darauf, dass SLGCs eine höhere Invasivität aufweisen als Nicht-SLGCs (Cheng et al., 2011). Weiterhin konnte bei GBM-Rezidiven eine relativ zu den Primärtumoren stark gesteigerte Invasivität beobachtet werden (Nandeesh et al., 2018).

1.3 Rad51 und die homologe Rekombination

Die Rekombinase Rad51 ist ein Schlüsselprotein bei der homologen Rekombination (HR) und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen unter Wahrung der genomischen Integrität (Godin et al., 2016; Schild und Wiese, 2010). Bei der homologen Rekombination wird eine homologe DNA-Sequenz des Schwesterchromatids als Template verwendet, wodurch eine fehlerfreie DNA-Reparatur möglich wird (Kinner et al., 2008; Oberle und Blattner, 2010). Rad51 führt die hierbei entscheidenden Schritte der Homologiesuche und Stranginvasion aus (Godin et al., 2016).

Die Proteinkinasen ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia teleangiectasia and Rad3-related protein*) spielen eine essenzielle Rolle bei der DNA-Schadensantwort und der Einleitung der DNA-Reparatur (Bohgaki et al., 2010; Santivasi und Xia, 2014). Sie erkennen Läsionen in der DNA und vermitteln über die Aktivierung mehrerer Proteine durch Phosphorylierung die weiteren Prozesse der zellulären Schadensantwort, wie den Zellzyklusarrest, wodurch die DNA-Reparatur ermöglicht wird. Weiterhin können Apoptose oder Seneszenz induziert werden (Bohgaki et al., 2010). Während ATM besonders wichtig bei der Schadensantwort bei Doppelstrangbrüchen ist, ist ATR vor allem an den Signalwegen bei Einzelstrangbrüchen beteiligt (Bohgaki et al., 2010). ATM phosphoryliert unter anderen das Histonprotein H2AX. Das entstehende γ H2AX markiert den Doppelstrangbruch und unterstützt die Rekrutierung weiterer Kinasen und Effektoren der DNA-Reparatur (Bohgaki et al., 2010; Shah und O'Shea, 2015). Außerdem aktivieren ATM und ATR die Checkpointkinasen Chk1 und Chk2, die die Zellzykluscheckpoints aktivieren und den Zellzyklus unterbrechen (Bohgaki et al., 2010).

Einer Zelle stehen verschiedene Methoden zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zur Verfügung, die jeweils unter bestimmten Umständen bevorzugt eingesetzt werden (Bernstein und Rothstein, 2009). Befinden sich die Zellen zum Zeitpunkt des Doppelstrangbruches in der S- oder G₂-Phase des Zellzyklus, findet die Reparatur bevorzugt durch homologe Rekombination statt. In den übrigen Zellzyklusphasen wird die nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ) genutzt, da hier das Schwesterchromatid nicht als homologes Template zur Verfügung steht (Bernstein und Rothstein, 2009). Außerdem entscheidet auch die Art der DNA-Läsion darüber, welcher Reparaturweg genutzt wird. So wird für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen, die durch

ionisierende Strahlung hervorgerufen werden, bevorzugt die homologe Rekombination eingesetzt. Treten Doppelstrangbrüche während der G₁-Phase auf, wird die Reparatur bis zum Eintritt in die S-Phase verzögert und dann die homologe Rekombination genutzt (Barlow et al., 2008).

Die Veränderung der Chromatinstruktur bei einem Doppelstrangbruch führt zu einer Autophosphorylierung von ATM und der Dissoziation von inaktiven ATM-Homodimeren in aktive Monomere (Bohgaki et al., 2010; Kastan und Bartek, 2004). Hierfür wird zunächst der MRN-Komplex (Mre11-Rad50-Nbs1) benötigt, der den Doppelstrangbruch erkennt und die ATM-Homodimere zum Ort der DNA-Läsion rekrutiert (Bohgaki et al., 2010).

Im ersten Schritt der homologen Rekombination bindet der MRN-Komplex an die freien DNA-Enden im Bereich des Doppelstrangbruchs und entfernt zusammen mit der Endonuklease CtIP (*C-terminal-binding protein-interacting protein*) die 5'-Enden, sodass freie 3'-Einzelstrangüberhänge entstehen (Godin et al., 2016; Makharashvili und Paull, 2015). Die freien 3'-Einzelstränge werden unmittelbar mit dem Replikationsprotein A (RPA) beladen, welches die Einzelstränge vor weiterem Abbau schützt und der Zelle einen nicht reparierten Doppelstrangbruch signalisiert (Abb. 2) (Godin et al., 2016). Im zweiten Schritt wird RPA durch Rad51 ersetzt. Hierbei wird Rad51 von dem Rekombinationsmediator BRCA2 (*breast cancer 2*) gebunden und zu den RPA-gebundenen DNA-Einzelsträngen transportiert (Abb. 2) (Schild und Wiese, 2010). Anschließend bildet Rad51 mit der DNA und weiteren Faktoren wie Rad52 ein Nukleoproteinfilament (Abb. 2) (Oberle und Blattner, 2010). Im vierten Schritt sucht dieses Filament homologe Sequenzen im Schwesterchromatid und ermöglicht eine Basenpaarung mit dem zu reparierenden Einzelstrang, wodurch eine Heteroduplex-DNA entsteht (Oberle und Blattner, 2010). Der invadierende Einzelstrang wird durch DNA-Polymerasen verlängert, wobei das Schwesterchromatid als Template dient (Abb. 2) (Oberle und Blattner, 2010). Hierdurch wird eine fehlerfreie DNA-Reparatur ermöglicht (Kinner et al., 2008). Im fünften und letzten Schritt wird die entstandene *Holiday Junction* zwischen dem invadierenden Strang und dem homologen Schwesterchromatid durch Rad51C (*Rad51 paralog C*) und XRCC3 (*X-ray repair cross complementing 3*) aufgelöst und es entstehen wieder zwei einzelne DNA-Doppelhelices (Abb. 2) (Oberle und Blattner, 2010).

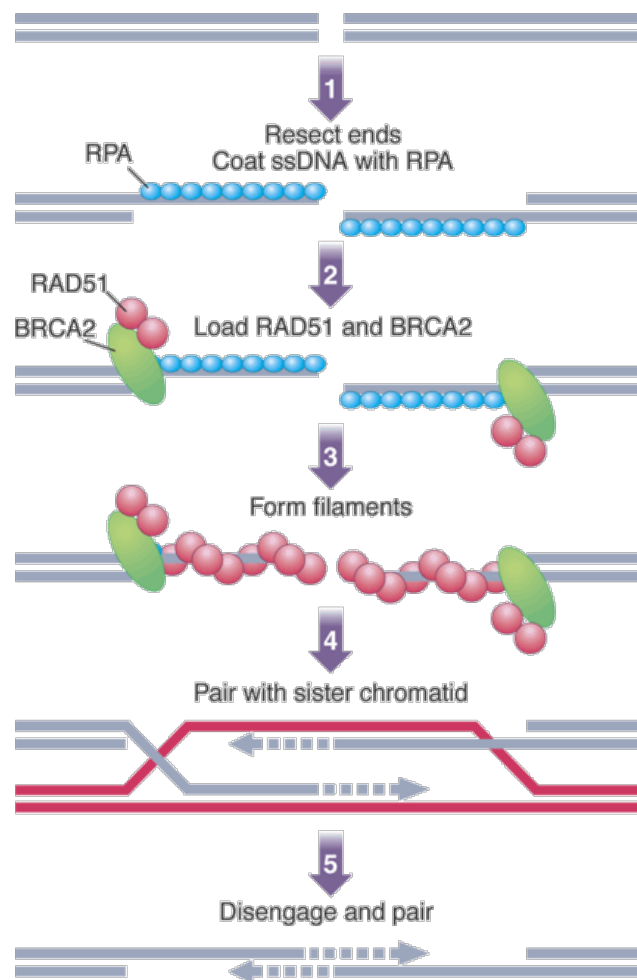


Abbildung 2: Homologe Rekombination. (1) Nachdem der MRN-Komplex einen DNA-Doppelstrangbruch erkannt hat, entfernt er zusammen mit der Endonuklease CtIP Nukleotide an den freien 5'-Enden. Die dabei entstehenden freien 3'-Einzelstrangüberhänge werden mit RPA beladen, welches diese vor dem Abbau schützt. (2) Mit Hilfe von Rekombinationsmediatoren wie BRCA2 wird RPA durch Rad51 ersetzt. (3) Rad51 bildet mit der DNA Nukleoproteinfilamente aus. (4) Diese Filamente ermöglichen eine Basenpaarung mit homologen Sequenzen im Schwesterchromatid und der invadierende Einzelstrang wird unter Zuhilfenahme des Schwesterchromatidtemplates verlängert. (5) Abschließend wird die entstandene *Holiday Junction* aufgelöst und es entstehen wieder 2 DNA-Doppelhelices. ssDNA: Einzelstrang- (*single-stranded*) DNA; RPA: Replikationsprotein A; BRCA2: *breast cancer 2*. Quelle: Wilson und Elledge, 2002

In der Mehrzahl humaner maligner Tumoren ist Rad51 überexprimiert, was mit einer verschlechterten Prognose und einem verminderten Patientenüberleben assoziiert ist (Hine et al., 2014; Klein, 2008). Während in normalen nichtmalignen Zellen die Rad51-Expression sehr streng kontrolliert ist, ist in Tumorzellen meist eine stark erhöhte Rad51-Promoteraktivität nachweisbar. Durchschnittlich ist die Promoteraktivität um das 850fache im Vergleich zu nichtmalignen Zellen gesteigert ist (Hine et al., 2014). Die diesem

Phänomen zugrunde liegenden Mechanismen sind bislang wenig erforscht, allerdings deutet viel darauf hin, dass die Regulation des Rad51-Promoters in Tumorzellen ein hochkomplexer Vorgang ist, der von multiplen Faktoren beeinflusst wird. Außerdem scheint die Rad51-Promoteraktivität mit zunehmender maligner Transformation der Tumorzellen anzusteigen (Hine et al., 2014). Ein möglicher Erklärungsansatz ist der, dass eine initial gestörte Funktion der homologen Rekombination, die über eine folgende genomische Instabilität an der Tumorentstehung beteiligt ist, zu einer kompensatorischen Rad51-Überexpression führt (Schild und Wiese, 2010). Die schlechtere Prognose von Tumoren mit einer Rad51-Überexpression könnte auf eine erhöhte Aggressivität oder Metastasierungsrate oder aber auf eine gesteigerte Therapieresistenz zurückzuführen sein (Hine et al., 2014).

1.4 TP53 Tumorsuppressor

Der Tumorsuppressor TP53 ist ein Transkriptionsfaktor, der als Tetramer an DNA-Erkennungselemente (p53 DNA RE, *DNA response elements*) bindet und die Expression von Zielgenen aktiviert (Kearns et al., 2016). TP53 spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation verschiedener zellulärer Vorgänge, insbesondere bei zellulärem Stress und im Rahmen der DNA-Schadensantwort (Nicolai et al., 2015; Vijayakumaran et al., 2015). TP53 reguliert den Zellzyklus, die DNA-Reparatur, Apoptose und Seneszenz (Nicolai et al., 2015). TP53 ist somit elementar für die Wahrung der genomischen Integrität einer Zelle (Nicolai et al., 2015).

In ungestressten Zellen wird TP53 in einer negativen Rückkopplungsschleife konstant auf einem niedrigen Level gehalten (Appella und Anderson, 2001). In dieser Rückkopplung induziert TP53 die Transkription des Gens, das für die E3 Ligase MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*) kodiert (Abb. 3). Diese besitzt die Fähigkeit, TP53 zu polyubiquitinylieren und somit dem proteasomalen Abbau zuzuführen (Hock und Vousden, 2014). Außerdem besitzt das MDM2/MDM4 (*mouse double minute 4 homolog*)-Heterodimer die Fähigkeit, ubiquitinylierungsunabhängig die transkriptionale Aktivität von TP53 direkt zu hemmen und durch Mono-Ubiquitinylierung den nukleären Export von TP53 zu bewirken (Hock und Vousden, 2014). Genotoxischer Stress führt zu einer Unterbrechung dieser negativen Rückkopplungsschleife. Dabei wird TP53 vorübergehend stabilisiert und akkumuliert im Kern. Hier aktiviert TP53 seine Zielgene, darunter den

Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1} (Appella und Anderson, 2001; Kendig et al., 2017). Nach einem DNA-Schaden, beispielsweise durch ionisierende Strahlung, kommt es zu einer Phosphorylierung von TP53 in verschiedenen Aminosäureresten. Der Serylrest S15 wird beispielsweise durch die Kinasen ATM und DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) phosphoryliert, der Serylrest S20 durch die Kinasen ATM und Chk2 (Abb. 3) (Hock und Vousden, 2014; Shieh et al., 1997). Hierdurch wird die Interaktion mit der E3 Ligase MDM2 gestört und es kommt zu der oben beschriebenen Akkumulation von TP53 (Appella und Anderson, 2001; Shieh et al., 1997). Zusätzlich wird auch MDM2 phosphoryliert, wodurch zusätzlich die Interaktion von TP53 und MDM2 vermindert wird (Hock und Vousden, 2014).

Die Akkumulation von TP53 vermittelt zunächst einen Zellzyklusarrest, wodurch die DNA-Reparatur ermöglicht wird (Williams und Schumacher, 2016). TP53 aktiviert das Gen, das für den Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1} kodiert (Brown et al., 1997). p21^{Cip1} hemmt den Cyclin E/CDK2 (*cyclin-dependent kinase 2*)- und den Cyclin D/CDK4 (*cyclin-dependent kinase 4*)-Komplex, wodurch es zu einem G1-Arrest kommt (Chen, 2016). Einen G2-Arrest bewirkt TP53 durch eine Hemmung der Bildung des Cyclin-B1/CDK1 (*cyclin-dependent kinase 1*)-Komplexes (Taylor und Stark, 2001). Der Zellzyklusarrest ist reversibel, wenn nach erfolgreicher DNA-Reparatur das TP53-Level im Zellkern fällt. Bei weiterhin fortbestehenden DNA-Schäden kann TP53 über einen verlängerten p21^{Cip1}-Anstieg den Eintritt der Zelle in die Seneszenz vermitteln (Chen, 2016). TP53 nimmt außerdem direkten Einfluss auf die Aktivierung verschiedener DNA-Reparaturmechanismen (Williams und Schumacher, 2016). So konnte gezeigt werden, dass TP53 direkt die Expression des für die homologe Rekombination wichtigen Rad51 beeinflusst (Hine et al., 2014). Schließlich kann TP53 über die Aktivierung verschiedener Gene die Apoptose induzieren. Wichtige Zielgene sind in diesem Kontext die Gene, die für die proapoptotischen Proteine PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) und BAX (*Bcl-2-associated X protein*) kodieren (Chen, 2016).

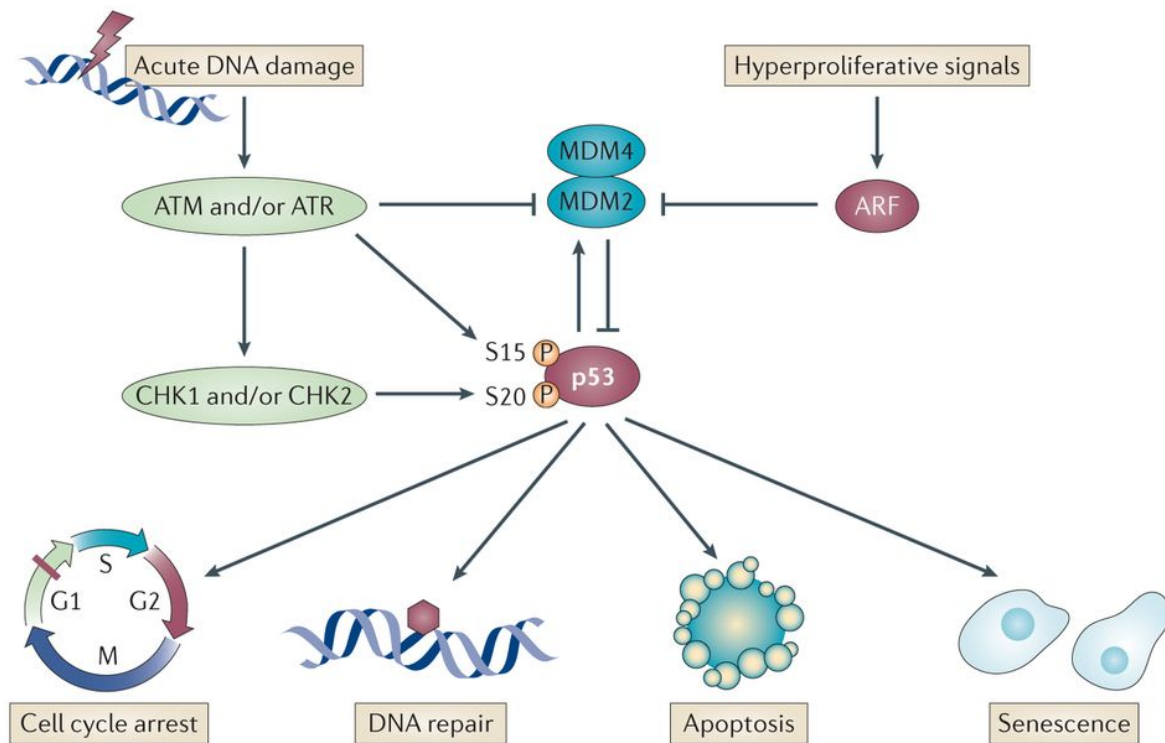


Abbildung 3: Bedeutung des Tumorsuppressors TP53 für die DNA-Schadensantwort nach Bestrahlung. Im Fall eines DNA-Schadens wird TP53 durch die Kinasen ATM oder ATR direkt im Serylrest S15 oder indirekt über die Checkpointkinasen Chk1 oder Chk2 im Serylrest S20 phosphoryliert, wodurch die negative Rückkopplungsschleife mit MDM2 und MDM4 unterbrochen wird und es zur Akkumulation und Aktivierung von TP53 kommt. Infolgedessen aktiviert TP53 Zielgene, die einen Zellzyklusarrest, die DNA-Reparatur sowie die Apoptose oder Seneszenz auslösen. Die Aufhebung der negativen Rückkopplung kann zusätzlich durch die direkte Hemmung von MDM2 durch ATM oder ATR erzielt werden. Andererseits induzieren hyperproliferative Signale über den Tumorsuppressor ARF eine Hemmung von MDM2 und somit ebenfalls eine Aktivierung von TP53. ATM: *ataxia teleangiectasia mutated*; ATR: *ataxia teleangiectasia and Rad3-related protein*; Chk1: *checkpoint kinase 1*; Chk2: *checkpoint kinase 2*; MDM2: *mouse double minute 2 homolog*; MDM4: *mouse double minute 4 homolog*; ARF: *alternative reading frame*. Quelle: Biegging et al., 2014

Mittels der Aktivierung verschiedenster Effektorproteine spielt TP53 eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung der Tumorgenese. Eine fehlerhafte Funktion von TP53 hingegen begünstigt die Tumorentstehung (Liu et al., 2014). Das für TP53 kodierende Gen ist eines der am häufigsten mutierten Gene in soliden Tumoren (Liu et al., 2014). 80% aller Mutationen im TP53-Gen in menschlichen Tumoren sind *missense*-Mutationen, das heißt es kommt zu einem Verlust der TP53-Funktion (Biegging et al., 2014). Allerdings kann ein mutiertes TP53 einen sogenannten dominant-negativen Effekt auf verbliebenes Wildtyp-TP53 ausüben (Muller und Vousden, 2014). Mutiertes und Wildtyp-TP53 bilden hierbei Heterotetramere, was zu einer eingeschränkten oder fehlerhaften Aktivität führt (Billant

et al., 2016). Es kann allerdings nicht nur zu diesen sogenannten „*loss of function*“ (LOF)-Mutationen, sondern auch zur sogenannten „*gain of function*“ (GOF)-Mutation kommen. Im Fall der GOFs weisen die TP53-Proteine Veränderungen auf, die aktiv zur Tumorprogression und Therapieresistenz beitragen (Bieging et al., 2014; Muller und Vousden, 2014; Oren und Rotter, 2010). Dieser Effekt kann auf unterschiedlichen Ursachen beruhen (Liu et al., 2014).

Vereinfachend lassen sich TP53-Mutanten in Kontakt- und Konformationsmutanten einteilen. Kontaktmutanten haben durch Veränderungen der Aminosäuresequenz in ihrer DNA-bindenden Domäne eine verminderte bis fehlende transkriptionale Aktivität, bei Konformationsmutanten ist die dreidimensionale Struktur des Proteins verändert (Muller und Vousden, 2014). Obwohl Mutationen an vielen verschiedenen Stellen des TP53-Gens identifiziert wurden, sind sechs Aminosäurereste, die sogenannten „Hotspots“, mit etwa 25% aller Veränderungen besonders häufig betroffen. Dies sind die Aminosäurereste: Arginin 175, Glycin 245, Arginin 248, Arginin 249, Arginin 273 und Arginin 282 (Liu et al., 2014; Muller und Vousden, 2014). In der Mehrheit der Fälle führen diese Mutationen zu einer stabilen Expression der TP53-GOFs in den Tumorzellen (Muller und Vousden, 2014).

Für TP53 ist bekannt, dass es Rad51 und die Aktivität der homologen Rekombination unterdrückt und damit an deren Regulierung beteiligt ist (Arias-Lopez et al., 2006). Dabei wird die Rad51-Funktion sowohl transkriptional als auch direkt durch eine physische Interaktion der beiden Proteine unterdrückt (Bertrand et al., 2004). Eine präzise Regulierung von Rad51 und der homologen Rekombination ist wichtig für die genomische Stabilität von Zellen. Während die effektive Unterdrückung von Rad51 für Wildtyp-TP53 beschrieben ist, scheint dies nicht für mutiertes TP53 zuzutreffen (Arias-Lopez et al., 2006). Eine fehlerhafte Unterdrückung von Rad51 und der homologen Rekombination durch mutiertes TP53 könnte nicht nur zu einer malignen Transformation beitragen, sondern auch zu einer gesteigerten Therapieresistenz der betroffenen Zellen (Arias-Lopez et al., 2006; Hine et al., 2014). Hieraus ergibt sich die Frage, welche Rolle TP53-Mutationen bei der Therapieresistenz von SLGCs spielen und insbesondere welche TP53-Mutationen eine fehlerhafte Unterdrückung von Rad51 bewirken.

1.5 Fragestellung

Die zentrale Schwierigkeit bei der Behandlung von GBMs ist das Auftreten von therapieresistenten Tumorrezidiven, an denen die Patienten versterben und zu deren Entstehung stammzellähnliche Gliomzellen (SLGCs) beitragen (Osuka und Van Meir, 2017). Neben der Fähigkeit, die Tumorprogression auf vielfältige Art und Weise zu fördern, zeichnen sich SLGCs durch ihre Resistenz gegenüber der Radiochemotherapie mit TMZ aus (Bao et al., 2006; Hadjipanayis und Van Meir, 2009). Die verantwortlichen Resistenzmechanismen sind bislang weitgehend unbekannt. Eine erhöhte Kapazität zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen könnte hierbei eine wichtige Rolle spielen (Bao et al., 2006; Osuka und Van Meir, 2017).

Da das Schlüsselprotein der homologen Rekombination Rad51 in der Mehrzahl maligner humaner Tumoren überexprimiert ist (Hine et al., 2014; Klein, 2008; Schild und Wiese, 2010), stellte sich die Frage, ob Rad51 für die Resistenz von SLGCs gegenüber Bestrahlung eine Rolle spielt.

Konkret wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Rad51 in SLGC-Linien aus verschiedenen Patienten mit malignen Gliomen exprimiert wird und ob die basalen Rad51-Level der unterschiedlichen SLGCs voneinander abweichen. Außerdem wurde die Frage bearbeitet, ob es nach Bestrahlung der SLGCs zu einer gesteigerten Expression und einer veränderten subzellulären Lokalisation von Rad51 kommt, als Anzeichen für eine gesteigerte Rad51-abhängige DNA-Reparatur. Darüber hinaus wurde untersucht, ob es bezüglich der Induktion und der Veränderung der subzellulären Lokalisation von Rad51 Unterschiede zwischen SLGC-Linien mit TP53-Wildtyp und TP53-Mutation gibt. Schließlich sollte ermittelt werden, ob die zusätzliche Gabe von TMZ die strahleninduzierte Rad51-Expression und die Rad51-Lokalisation beeinflusst.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden sieben verschiedene humane, stammzellähnliche SLGC-Linien mit unterschiedlichem TP53-Status verwendet. Diese Zelllinien wurden in der AG Zechel aus Tumorgewebe angelegt, das von der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Lübeck) chirurgisch gewonnen wurde. Die Verwendung des Tumormaterials für die Forschung erfolgte nach der schriftlichen Einverständniserklärung der Patienten, die nach Aufklärung durch den behandelnden Arzt gegeben wurde. Das Verfahren erfolgte nach dem positiven Votum 08-070 der Ethikkommission der Universität zu Lübeck (siehe Anhang). Das Anlegen der SLGC-Linien wurde von der Arbeitsgruppe in Choschzick et al. (2014) und Raju et al. (2015) beschrieben. Die auf diese Weise gewonnenen SLGC-Linien wurden mit „T“ für Tumorzelllinie und einer fortlaufenden Nummer bezeichnet. Die Eigenschaften der verwendeten SLGC-Linien wurden beschrieben (Choschzick et al., 2014; Hirseland, 2017; Raju et al., 2015). Zu Vergleichszwecken wurde zusätzlich die etablierte GBM-Zelllinie U87MG untersucht. Diese stammt aus einem humanen WHO-Grad IV Glioblastom und wurde vielfach als Untersuchungsmodell für humane Glioblastome eingesetzt (Xie et al., 2015). Die U87MG-Zelllinie wurde uns von den Professoren Lamszus und Westphal (Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Die für diese Arbeit wichtigen Eigenschaften der verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprungstumor	Wachstumsverhalten	TP53-Status	MGMT-Status	RT	TMZ
T1371	GSarc	adhärent	R175H (GOF)	U	20 Gy	200 µM
T1440	GBM	adhärent	WT	M	25 Gy	25 µM
T1442	GBM	adhärent	N239D (missense)	M/U	20 Gy	100 µM
T1447-cl4	GSarc	semiadhärent	R248W (GOF)	M/U	20 Gy	50 µM
T1452	GBM	sphärisch	Spleiß-Mutante	M/U	25 Gy	100 µM
T1495	GBM	adhärent	R273H (GOF)	M/U	20 Gy	100 µM
T1522	GBM	adhärent	WT	M/U	10 Gy	100 µM
U87MG	GBM	adhärent	WT	M	25 Gy	100 µM

GSarc: Gliosarkom; GBM: Glioblastom; WT: Wildtyp; GOF: *gain of function*-Mutation; missense: *missense*-Mutation; R175H: Arginin 175 durch Histidin ersetzt; N239D: Asparagin 239 durch Aspartat ersetzt; R248W: Arginin 248 durch Tryptophan ersetzt; R273H: Arginin 273 durch Histidin ersetzt; Spleiß-Mutante: Spleiß-Mutation mit Verlust der 3'-Spleiß-Stelle im Intron zwischen Exon 6 und Exon 7; MGMT: O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; M: methyliert; U: unmethyliert; M/U: gemischter MGMT-Status; RT: Bestrahlung; TMZ: Temozolomid. Die eingesetzten Bestrahlungs- und TMZ-Dosen richteten sich nach früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe. Quellen: Dahlke, 2018; Dorenberg, 2017; Hirsland, 2017; Limpert, 2018

2.1.2 Zellkulturmedien

Tabelle 2: Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anwendung
Serumhaltiges F-Medium	DMEM/ Ham's F12 (88%) FCS (10%) Penicillin/Streptomycin (1%) Amphotericin (1%)	Kultivierung U87MG
Basismedium	DMEM/ Ham's F12 (96%) L-Glutamin 200 mM (2%) Penicillin/Streptomycin (1%) Amphotericin (1%)	Komponente des N-Mediums
Serumfreies N-Medium	Basismedium (80%) BIT 9500 Serumersatz (20%) rEGF (20 ng/ml) rbFGF (20 ng/ml)	Kultivierung SLGC-Linien

DMEM: Dulbecco's Modified Eagles's Medium; FCS: fetales Kälberserum, rEGF: rekombinanter, humaner, epidermaler Wachstumsfaktor; rbFGF: rekombinanter, humaner, basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor; SLGC: *stem-like glioma cell*

2.1.3 (Bio)Chemikalien, Wachstumsfaktoren, Puffer und Lösungen

Tabelle 3: (Bio)Chemikalien und Wachstumsfaktoren

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	BioRad, München, D
Amphotericin B (1 ng/10 µl)	PromoCell, Heidelberg, D
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, München, D
BIT 9500 Serumersatz	PELOBiotech, Planegg, D
Bradford-Reagenz	BioRad, München, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Coomassie Brilliant Blue R-250	ICN Biomedicals, Aurora, USA
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Roth, Karlsruhe, D
DMEM/ Ham's F12	Biochrom, Berlin, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt, D
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt, D
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco, Karlsruhe, D

Fibronectin (1 mg/ml)	PromoCell, Heidelberg, D
Fluoromount-G TM -Lösung	Southern Biotech, Birmingham, USA
Glycerol	MP Biomedicals, Illkirch, FRA
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
L-Glutamin (200 mM)	PromoCell, Heidelberg, D
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin (1 ng/10 µl)	PromoCell, Heidelberg, D
PIC (Proteinase Inhibitor Cocktail)	Roche, Mannheim, D
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Merck, Darmstadt, D
rbFGF (basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor)	PromoCell, Heidelberg, D
rEGF (epidermaler Wachstumsfaktor)	PromoCell, Heidelberg, D
SDS (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)	Roth, Karlsruhe, D
Spectra TM Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas/ThermoScientific, Schwerte, D
Super Signal [®] West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Schwerte, D
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, München, D
Temodal (Temozolomid)	MSD Sharp & Dohme, Haar, D
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, München, D
Trockenmilchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Trypanblau	Seromed, Berlin, D
Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, D

Weitere Chemikalien und Salze, wie HCl, KCl, NaCl, EDTA, diverse Natrium- und Kaliumphosphate, NaOH und Methanol, wurden von Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) und Fluka Analytical (Seelze, D) bezogen.

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Coomassie-Entfärber	7,5% Essigsäure (v/v) 25% Ethanol (v/v)
Coomassie-Färbelösung	0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v) 10% Essigsäure (v/v) 50% Ethanol (v/v)
DAPI-Färbelösung	0,25 µg/µl 1x PBS

Ethanol-Eisessig-Fixiergemisch	95% Ethanol (v/v) 5% Eisessig (v/v)
JLB-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8) 150 mM NaCl 10% Glycerol (v/v) 0,5% Triton-X 100 (v/v)
Laemmli-Puffer (2x)	25 ml Sammelgelpuffer 40 ml 10% SDS (w/v) 20 ml 85% Glycerol (v/v) 10 ml 2-Mercaptoethanol 5 ml 2,5% Bromphenolblau (w/v)
Lösung zur Verdünnung der Antikörper für die immuncytochemische Färbung	1x PBS 10% FCS (v/v) 0,02% Natrium-Azid (v/v)
PBS (10x) pH 7,4	80 g NaCl + 2 g KCl + 11,5 g Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O + 2 g KH ₂ PO ₄ , mit H ₂ O dest. auf 1000 ml
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (5x)	25 mM Tris-Base 0,2 M Glycin 0,1% SDS (w/v)
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	12 g Tris-Base in 160 ml H ₂ O dest. lösen, mit HCl konz. auf pH 6,8 einstellen, 2 ml 10% SDS (w/v), mit H ₂ O dest. auf 200 ml
SDS-PAGE Trenngelpuffer	36,3 g Tris-Base in 160 ml H ₂ O dest. lösen, mit HCl konz. auf pH 8,8 einstellen, 2 ml 10% SDS (w/v), mit H ₂ O dest. auf 200 ml
TEN-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8) 1 mM EDTA (pH 8) 100 mM NaCl
Western Blot Blockpuffer	1x PBS 1% Trockenmilch (w/v)
Western Blot Transferpuffer	5,8 g Tris-Base + 2,9 g Glycin + 10% SDS (v/v) zu 800 ml H ₂ O dest. + 200 ml Methanol

Western Blot Waschpuffer	1x PBS
	0,5% Tween 20 (v/v)

PBS: *phosphate buffered saline*; SDS: *sodium dodecyl sulfate*; PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis*

2.1.4 Verbrauchsmaterial, Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial

Objekt	Hersteller
<i>chamber slides</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Deckgläser	Thermo Scientific, Braunschweig, D
Einmalplastikpipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Einmalplastikröhrchen (10, 15 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen (P20, P200, P1000)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Whatman 3MM Paper	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zellkulturgefäße (T25, T75)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zellkulturschalen (10 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Tabelle 6: Geräte und Hilfsmittel

Objekt	Hersteller
Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, D
Hera Cell Inkubat 80	Heraeus, Hanau, D
Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz, Wetzlar, D
Mikroliterpipetten (P20, P200, P1000)	Gilson, Middletown, USA
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht KG, Sondheim, D
Pipettierhilfen (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Gilson, Middletown, USA

Weitere Materialien, Geräte und Softwareprogramme sind an den entsprechenden Stellen im Methodenteil angegeben.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen (T25) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Die SLGCs wurden in

serumfreiem N-Medium kultiviert, das BIT 9500 als Serumersatz und die humanen rekombinanten Wachstumsfaktoren EGF und bFGF enthielt (Tab. 2). Die Zelllinie U87MG wurde in serumhaltigem F-Medium kultiviert, das 10% FCS enthielt (Tab. 2). Das Medium wurde bei allen SLGC-Linien nach zwei Tagen partiell ersetzt. Abhängig von Proliferationsrate und Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Die adhären und semi-adhären Zellen wurden passagiert, sobald eine Konfluenz von mehr als 80% erreicht war. Die sphärischen wachsenden Zellen wurden passagiert, sobald sich eine dunkle Verfärbung im Zentrum der Sphäroide bildete.

Um die Zellen zu passagieren wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml 1x PBS gewaschen. Im Fall der adhären Kulturen war dies in den T25-Zellkulturflaschen möglich, semiadhären und sphärisch wachsende Kulturen wurden dazu in einem Einmalplastikröhrchen für 3 min bei Raumtemperatur und 250 x g pelletiert und in PBS suspendiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 1 ml 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung enzymatisch und mechanisch dissoziiert. Das vollständige Dissoziieren der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurde durch Zugabe von 1 ml Medium (Tab. 2) der Trypsinverdau gestoppt, die Suspension in ein Einmalplastikröhrchen überführt und dieses für 3 min bei Raumtemperatur und 250 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet mit 1x PBS suspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in gewünschter Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche überführt. Bei Bedarf wurden die Zelllinien in gewünschter Menge expandiert.

Für die Durchführung der Versuche wurden die Zellen in einer definierten Zellzahl in 10 cm Zellkulturschalen und *chamber slides* ausplattiert. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer (Zählkammerfaktor 1×10^4) in Anwesenheit von Trypanblau bestimmt. In 10 cm Zellkulturschalen und *chamber slides*, die weniger als 24 h nach Behandlung untersucht werden sollten, wurden die Zellen mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen/cm² ausplattiert. In 10 cm Zellkulturschalen und *chamber slides*, die zu einem späteren Zeitpunkt nach Behandlung untersucht werden sollten, wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen/cm² ausplattiert. Für eine verbesserte Zelladhäsion wurden die *chamber slides* mit Fibronectin (Tab. 3) beschichtet. Dafür wurden 200 µl einer 1:100 mit 1x PBS verdünnten Fibronectinlösung in jede Kammer der *chamber slides* gegeben und für mindestens 4 h im Zellkulturschrank bei 37 °C und 5% CO₂-Begasung inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit je 500 µl 1x PBS gewaschen.

2.2.2 Behandlung der Zellen

Bestrahlung

Die Zellen wurden 24 h vor der Behandlung in die Zellkulturgefäße plattiert und bis zum Behandlungszeitpunkt im Zellkulturschrank inkubiert. Die Zellkulturschalen wurden mit Einzeildosen in Höhe von 10, 20 und 25 Gy, die *chamber slides* mit Einzeildosen in Höhe von 5 Gy bestrahlt. Dies erfolgte mit 6 MeV Photonenstrahlung am Linearbeschleuniger DHX2100 (Varian Medical Systems, Palo Alto, USA) bei einer Dosisleistung von 3 Gy/min in der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Campus Lübeck. Während der Bestrahlung waren 2 cm starke, wasseräquivalente Plexiglasplatten als Bolusmaterial unmittelbar oberhalb der Zellkulturschalen und *chamber slides* in den Strahlengang eingebracht. Die Bestrahlungsdosis wurde individuell für jede Zelllinie anhand von im Labor erstellten Dosiswirkungskurven ausgewählt (Dorenberg, 2017). Ausschlaggebend war hierfür die ermittelte ED₅₀ (Tab. 1).

Behandlung mit Temozolomid (TMZ)

Die *chamber slides* und einige Zellkulturschalen wurden mit dem Zytostatikum TMZ (Tab. 3) in einer Konzentration, bei der im BrdU-ELISA (*5-bromo-2'-deoxyuridine-enzyme-linked immunoabsorbent assay*) an Tag 5 eine 50% Senkung der Proliferation erreicht war, behandelt. In der Mehrheit der SLGCs war dies mit 100 µM TMZ möglich (Tab. 1). Die EC₅₀-Proliferation wurde zuvor im Labor von den Kollegen ermittelt (Hirseland, 2017; Limpert, 2018). Das TMZ lag in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst vor, wobei der DMSO-Anteil bei der Behandlung 1% (v/v) betrug. Daher wurden die Kontrollen ebenfalls mit 1% DMSO (Tab. 3) behandelt. Erfolgte die Behandlung mit TMZ oder DMSO zusätzlich zu der Bestrahlung, so fand diese Behandlung jeweils unmittelbar vor der Bestrahlung statt.

2.2.3 Proteinextraktion

Für die Durchführung der Western Blot Analysen wurden aus den behandelten Zellen und den Kontrollen Gesamtzellproteinextrakte (WCE, *whole cell extract*) gewonnen. Dafür wurden die Zellen zunächst unter Einsatz eines Silikonspatels zu definierten Zeitpunkten aus den 10 cm Zellkulturschalen geerntet. Die Zellernte fand auf Eis in 1 ml TEN-Puffer (Tab. 4) statt. Danach wurden die erhaltenen Zellsuspensionen jeweils in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 3 min bei Raumtemperatur und 250 x g zentrifugiert und der

Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellpellets in JLB-Puffer (Tab. 4) aufgenommen, dem die Proteaseinhibitoren PIC (1 µl/ml Puffer) und PMSF (2 µl/ml Puffer) (Tab. 3) zugefügt wurden. Es folgte eine Inkubation für 25 min auf Eis. Die Menge des jeweils benötigten JLB-Puffers wurde empirisch anhand der Pelletgröße festgelegt. Die Zellbruchstücke wurden für 10 min bei 4 °C und 20.000 x g pelletiert und der den WCE enthaltende Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die WCEs bei -20 °C gelagert.

Mittels eines Bradford-Assays (Green und Sambrook, 2012) wurde die Proteinkonzentration der WCEs photometrisch bestimmt. Dazu wurden 2 µl eines WCE mit 200 µl 5x Bradford-Reagenz (BioRad, München, D) und 800 µl 1x PBS gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde anschließend bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm gegen einen Leerwert (200 µl 5x Bradford-Reagenz und 800 µl 1x PBS) gemessen (Helios Omega UV-Vis Photometer, Thermo Scientific, Schwerte, D). Anhand einer Eichgeraden, die zuvor mit Serumalbumin erstellt wurde, wurden die Proteinkonzentrationen der WCEs graphisch ermittelt.

2.2.4 SDS-PAGE

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteinextrakte wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) nach Laemmli (Green und Sambrook, 2012) unter Verwendung des Mini-PROTEAN® 3 Elektrophoresesystems (BioRad, München, D) durchgeführt. Die Elektrophorese fand bei 200 V mit 1x Elektrophoresepuffer (Tab. 4) statt. Alle in der Untersuchung verwendeten Gele setzten sich aus einem 4% Sammelgel und einem 10% Trenngel zusammen. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele

Komponente	Sammelgel (4%)	Trenngel (10%)
H ₂ O	1,8 ml	2 ml
Sammelgelpuffer (pH 6,8) (Tab. 4)	750 µl	---
Trenngelpuffer (pH 8,8) (Tab. 4)	---	1,25 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	400 µl	1,66 ml
10% APS	15 µl	50 µl
TEMED	4 µl	3 µl

APS: Ammoniumperoxodisulfat; TEMED: Tetramethylethyldiamin

Sämtliche WCEs wurden zunächst in einem analytischen Ansatz auf ihre Integrität untersucht. Dazu wurden 5 µl WCE, 5 µl 1x PBS und 10 µl 2x Laemmli-Puffer (Tab. 4) gemischt, für 5 min auf 94 °C erhitzt und auf 10% SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Anschließend wurden die analytischen Gele für 20 min mit Coomassie-Färbelösung (Tab. 4) gefärbt und für mindestens 2 x 20 min mit Coomassie-Entfärber (Tab. 4) entfärbt (Green und Sambrook, 2012).

Für die Western Blot Analyse wurden 20 µg WCE pro Geltasche aufgetragen. Außerdem wurde Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Tab. 3) als Proteinlängenmarker parallel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese und vor dem Assemblieren des Western Blots (2.2.5) wurden die die SDS-Gele für 15 min in Transferpuffer inkubiert (Tab. 4).

2.2.5 Western Blot

Für den Western Blot wurde das Semi-Dry-Verfahren angewendet und das Trans-Blot SD System (BioRad, München, D) eingesetzt. Der Proteintransfer von den SDS-Gelen auf Nitrozellulosemembranen (BioRad, München, D) erfolgte für 1 h bei 15 V. Anschließend wurden die unbesetzten Bindestellen der Nitrozellulosemembranen durch 15 min Inkubation mit Blockpuffer (Tab. 4) abgesättigt. Die SDS-Gele wurden nach dem Blotten mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (Green und Sambrook, 2012), um auf einen gleichmäßigen Transfer zu prüfen.

Die Inkubation der Nitrozellulosemembranen mit den primären Antikörpern erfolgte in verschweißten Folientaschen über Nacht bei 4 °C mit je 5 ml einer Antikörperverdünnung, die mit Western Blot-Blockpuffer angesetzt wurde. Die Antikörperverdünungen sind in Tabelle 8 angegeben. Danach wurde dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Die

Membranen wurden dann für 60 min bei Raumtemperatur mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (GAMPO oder GARPO) (Tab. 9) in analogem Verfahren inkubiert.

Abschließend wurden die Nitrozellulosemembranen erneut dreimal für 10 min in Waschpuffer gewaschen und unter Einsatz des Detektionsreagenz Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate (Tab. 3) am ChemiDoc XRS System (BioRad, München, D) detektiert. Mithilfe der Software Quantity One (BioRad, München, D) wurden die Chemolumineszenz ermittelt und die Bandenintensitäten quantifiziert.

Um Unterschiede der Bandenintensitäten, die durch ungleiche Proteinbeladung hervorgerufen worden sein könnten zu erkennen und auszugleichen, wurden alle Nitrozellulosemembranen zusätzlich mit Antikörpern gegen die *house keeping* Proteine Aktin und GAP-DH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) inkubiert (Tab. 8). Die Signale von Rad51 und TP53 wurden durch die der *house keeping* Proteine dividiert. Da der GAP-DH Antikörper bereits Peroxidase gekoppelt war, entfiel hierbei die Inkubation mit einem Sekundärantikörper.

Tabelle 8: Primärantikörper Western Blot

Antikörper	Hersteller	MW	Verdünnung
αpanAktin (mo, MAB1501R)	Merck Millipore, Schwalbach, D	43 kDa	1:5000
αGAPDH (HRP Conjugate) (rb, #3683)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	37 kDa	1:1000
αp53 (rb, #9282)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	53 kDa	1:1000
αRad51 (mo, ab1837)	abcam, Cambridge, UK	37 kDa	1:500

α : Symbol für Antikörper; mo: *mouse* Antikörper; rb: *rabbit* Antikörper; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; HRP Conjugate: *horseradish peroxidase* gekoppelt; MW: *molecular weight* des Zielproteins; kDa: Kilodalton

Tabelle 9: Sekundärantikörper Western Blot

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Goat F(ab') ₂ Fragment Anti- <i>Mouse</i> IgG (H+L)-Peroxidase [GAMPO] (PN IM0817)	Beckman Coulter, Krefeld, D	1:5000
Goat F(ab') ₂ Fragment Anti- <i>Rabbit</i> IgG (H+L)-Peroxidase [GARPO] (PN IM0831)	Beckman Coulter, Krefeld, D	1:5000

H+L: *heavy* und *light chain* des Immunglobulins

2.2.6 Immuncytochemische Analysen

Die subzelluläre Lokalisation von Rad51 wurde nach immuncytochemischer Färbung fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Dazu wurden die in *chamber slides* kultivierten und behandelten Zellen zu definierten Zeitpunkten fixiert. Das Medium wurde hierfür entfernt, die Zellen nach einem Wachschriff mit 1x PBS mit einem auf -20 °C temperierten Ethanol-Eisessig-Fixiergemisch (Tab. 4) überschichtet und für 7 min bei -20 °C inkubiert. Danach wurde einmal für 1 min und zweimal für 10 min mit 1x PBS bei Raumtemperatur gewaschen.

Für die immuncytochemische Färbung wurden zunächst der Silikonauflauf entfernt und die zu färbenden Areale mit einem Fettstift (DAKO PEN, Dako, Hamburg, D) umrandet. Danach wurden pro Areal 25 µl Primärantikörperverdünnung (Tab. 4) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschriffen mit 1x PBS für je 10 min erfolgte die Inkubation mit den Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern analog zu den Primärantikörpern. Diesmal wurde für 45 min unter Abdunklung bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die verwendeten Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Primär- und Sekundärantikörper Immuncytochemie

Antikörper	Hersteller	MW	Verdünnung
αRad51 (mo, ab1837)	abcam, Cambridge, UK	37 kDa	1:10
DyLight® 488 <i>Goat-anti-Mouse IgG (H+L)</i> (35502)	Thermo Scientific, Schwerte, D	–	1:400

α: Symbol für Antikörper; mo: *mouse* Antikörper; MW: *molecular weight* des Zielproteins; kDa: Kilodalton; H+L: reagiert mit *heavy* und *light chain* des Immunglobulins

Abschließend erfolgte eine Chromatinfärbung mit DAPI (Tab. 4) nach Standardprotokoll für 10 min bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren Waschschritten für 10 min mit 1x PBS wurden die *chamber slides* mit Fluoromount-GTM-Lösung und einem Deckglas eingedeckt und unter Verwendung von Nagellack versiegelt. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei -20°C.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit dem Mikroskop Biozero BZ-8000 und dem Programm BZ-9000 Observation Application (Keyence, Neu-Isenburg, D) durchgeführt. Die Belichtungszeiten wurden für alle Präparate identisch gewählt. Diese Werte waren zuvor im Labor empirisch ermittelt worden.

Bei jeder untersuchten Zelllinie wurde für die verschiedenen Behandlungen jeder Zeitpunkt in einer Doppelbestimmung untersucht. Dabei wurden je zehn repräsentative Mikrofotografien angefertigt, die für die Auswertung verwendet wurden. Es wurde der Anteil der Zellen mit intranukleären Rad51-Signalen relativ zur Gesamtzahl der Zellen pro Mikrofotographie bestimmt. Nur eindeutige intranukleäre Rad51-Foci wurden als positives Signal gewertet (Abb. 15).

2.2.7 Statistik

Aufgrund der geringen Fallzahlen und der experimentellen Parameter wurden die Western Blot-Daten deskriptiv ausgewertet. Für die graphische Darstellung der Western Blot Analysen wurde ein empirisch ermittelter experimenteller Fehler von 10% angegeben, der sich aus Tests der Arbeitsgruppe ableitet. Die Anzahl der biologischen Replikate (Serien) betrug für die SLGCs zwei, für U87MG drei. Sofern ausreichend Proteinextrakt gewonnen wurde, wurden zwei bis drei technische Replikate der Western Blots angefertigt. Die

Abbildungen der Western Blots zeigen das Ergebnis eines für die jeweilige Serie repräsentativen Experiments.

Alle immuncytochemischen Analysen erfolgten in einer Doppelbestimmung (ein biologisches Replikat, zwei technische Replikate). Bei der Auswertung der immuncytochemischen Analysen wurden je zehn repräsentative Mikrofotografien ausgezählt und der Mittelwert des relativen Anteils der Rad51-positiven Kerne graphisch dargestellt. Die verschiedenen Mikrofotografien wiesen Unterschiede auf. Diese beruhten einerseits auf der Induktion von Zelltod durch die Behandlung, andererseits auf der unterschiedlichen Adhärenz der SGLC-Linien. So wurden nach Behandlung bei einigen SLGC-Linien nur noch wenige Zellen auf den *chamber slides* beobachtet. Auch hier wurden die Daten daher deskriptiv ausgewertet. Für die graphische Darstellung wurde auch hier ein empirisch ermittelter systematischer Fehler von 10% angegeben, der sich aus Kontrollexperimenten ergab.

3 Ergebnisse

3.1 Veränderung der Rad51-Expression nach Bestrahlung und Behandlung mit TMZ

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Rad51- und TP53-Expression in den verschiedenen SLGC-Linien zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung mittels Western Blot Analyse untersucht. Aufgrund der Daten früherer Arbeiten im Labor (Dahlke, 2018; Dorenberg, 2017; Hirseland, 2017) wurden die Zeitpunkte so gewählt, dass sowohl die Früh- als auch die Spätphasen nach Behandlung abgebildet wurden. Da die untersuchten SLGC-Linien eine deutlich verschiedene Sensitivität gegenüber der Bestrahlung aufwiesen, wurden verschiedene Dosen für die Behandlungen gewählt, um Effekte erzielen zu können (Tab. 1). Daraus ergaben sich Serien, die Aufschluss über das Ausmaß und den zeitlichen Verlauf der Veränderungen gaben. Dabei wurden die Rad51- und die TP53-Expression in denselben Proteinextrakten bestimmt, um die Expression der beiden Proteine miteinander vergleichen zu können. Der Schwerpunkt lag bei diesem Teil der Arbeit auf der alleinigen Bestrahlung. Exemplarisch wurde die TP53^{GOF}-Linie T1495 zusätzlich zur Bestrahlung mit TMZ und mit TMZ allein behandelt. Die etablierte GBM-Linie U87MG, die einen TP53-Wildtyp trägt, aber keine Stammzeleigenschaften aufweist, wurde ebenfalls untersucht. In den Abbildungen werden Western Blots und gegen Aktin bzw. GAP-DH normalisierte Werte der Quantifizierungen gezeigt, die Daten von 2-3 Analysen repräsentieren.

3.1.1 Basislevel der Rad51- und TP53-Expression

Alle untersuchten SLGC-Linien, wie auch die etablierte GBM-Linie U87MG wiesen eine geringe Rad51-Expression auf, die im Fall von U87MG, T1442 und T1522 an der Nachweisgrenze des Antikörpers lag (Abb. 4). Um die verschiedenen Zelllinien vergleichen zu können wurde im Graphen der Abbildung 4 das Rad51-Level in der Zelllinie T1371 als 1 definiert und die übrigen Zelllinien relativ dazu dargestellt. Die Quantifizierung ergab in den Fällen mit erkennbarem Rad51-Signal nur geringe Unterschiede in der Bandenstärke. Aufgrund der schwachen Signale und des ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnisses sind die Ergebnisse der Quantifizierung jedoch nur bedingt aussagekräftig.

Die TP53-Level waren in den SLGC-Linien T1440 und T1522 sowie der etablierten GBM-Linie U87MG an der Nachweisgrenze (Abb. 4). Dies reflektiert den TP53-Wildtypstatus dieser Zellen, da ungestresste Zelllinien mit einem Wildtyp-TP53 den Tumorsuppressor konstant auf einem niedrigen Level halten (Appella und Anderson, 2001). Deutlich höhere TP53-Level wurden für die TP53_{GOF}-Mutanten T1371 (R175H) und T1495 (R273H), aber insbesondere bei der TP53_{GOF}-Mutante T1447 (R248W) festgestellt (Tab. 1; Abb. 4). Dabei war das TP53-Level im TP53_{GOF}-Klon T1447-cl4 (R248W) 1,5fach höher als in der T1447-Mutterkultur, von der sich der Klon ableitet. Die TP53_{missense}-Mutante T1442 (N239D) und die TP53-Spleiß-Mutante T1452 wiesen vergleichbare Proteinlevel wie die TP53_{GOF}-Mutanten T1371 und T1495 auf (Abb. 4).

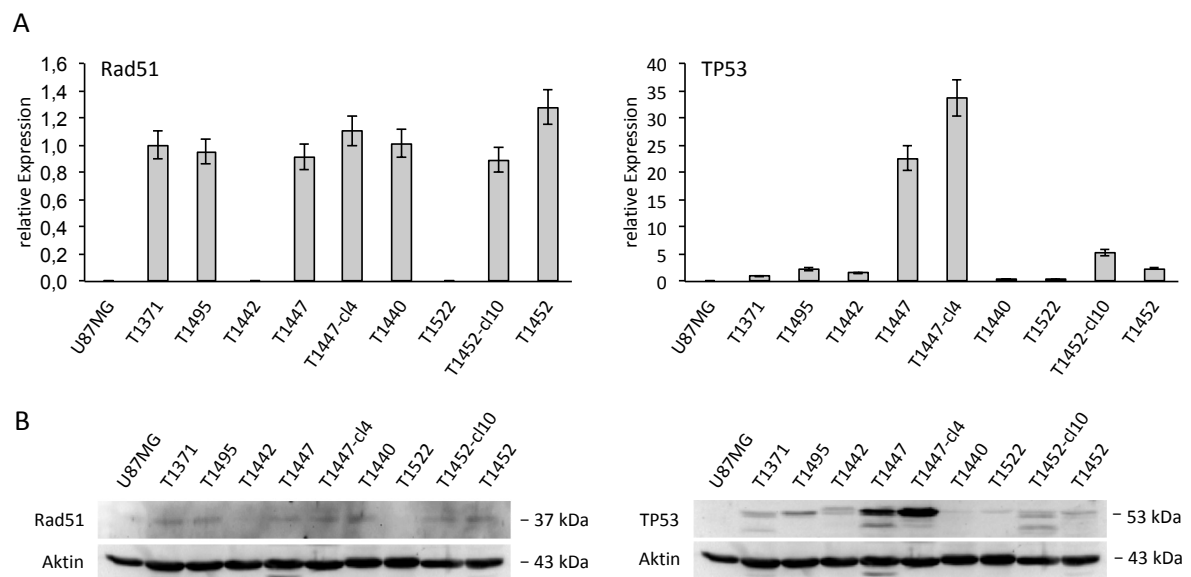


Abbildung 4: Relative Expression von Rad51 und TP53 in U87MG und SLGC-Linien. (A) Graphische Darstellung der relativen Expression von Rad51 und TP53 der Western Blots in (B) normalisiert gegen die darunter gezeigten Ladekontrollen (Aktin). Der empirisch ermittelte, systematische Fehler von 10% ist angegeben. Die relative Expression in T1371 wurde als 1 definiert. (B) Beispiele für Chemilumineszenz-Aufnahmen der untersuchten Proteine. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für die Daten von zwei biologischen Replikaten mit je zwei identisch durchgeführten technischen Replikaten ($n = 2 \times 2$).

3.1.2 Induzierbarkeit der Rad51- und TP53-Expression in SLGC-Linien mit TP53-Wildtyp

Von den im Labor verfügbaren SLGC-Linien mit TP53-Wildtyp-Status wurden die Linien T1440 und T1522 untersucht, deren Empfindlichkeit gegenüber der Bestrahlung deutlich

verschieden ist (Dorenberg, 2017). Beide Zelllinien wiesen in den Kontrollen eine geringe Rad51-Expression auf (Abbs. 5 und 6).

Die Bestrahlung von T1440 erfolgte mit einer Einzeldosis von 25 Gy, die Expressionsänderungen wurden bis zum Tag d2 untersucht. Zum Zeitpunkt 6 h nach Bestrahlung war die Rad51-Expression nur schwach um den Faktor 1,5 gesteigert (Abb. 5). Bis zum Tag d1 nahm die Expression wieder leicht ab und erreichte am Tag d2 fast wieder das Ausgangslevel der unbehandelten Probe. Eine TP53-Expression war in der T1440-Kontrolle nicht detektierbar. Nach 6 h hatte die Bestrahlung mit 25 Gy eine starke TP53-Expression induziert, die bis zum Tag d2 um 20% sank (Abb. 5). Erstaunlicherweise wurde an Tag d1 reproduzierbar eine etwas geringere TP53-Expression gemessen als an Tag d2. Messwerte an späteren Tagen konnten aufgrund experimenteller Probleme nicht erhoben werden.

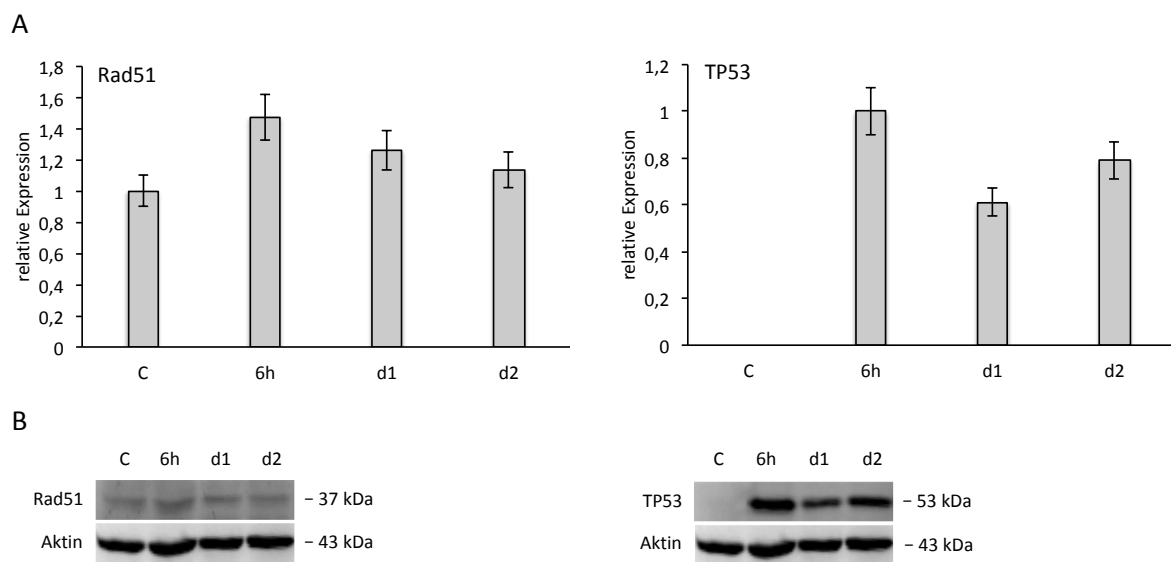


Abbildung 5: Relative Expression von Rad51 und TP53 in der Zelllinie T1440 nach Bestrahlung mit 25 Gy. (A) Graphische Darstellung der relativen Expression von Rad51 und TP53 der Western Blots in (B) normalisiert gegen die darunter gezeigten Ladekontrollen (Aktin). Der empirisch ermittelte, systematische Fehler von 10% ist angegeben. (B) Beispiele für Chemilumineszenz-Aufnahmen der untersuchten Proteine. C: Kontrolle. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für die Daten von zwei biologischen Replikaten mit je zwei identisch durchgeführten technischen Replikaten ($n = 2 \times 2$).

Nach den früheren Untersuchungen im Labor reagiert die SLGC-Linie T1522 empfindlicher auf Bestrahlung als die Mehrheit der anderen SLGC-Linien (Tab. 1). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestrahlung von T1522 Kulturen mit 10 Gy. In der unbehandelten T1522-Kontrolle wurde eine geringe Rad51-Expression detektiert.

Innerhalb von 6 h nach Bestrahlung stieg die Rad51-Expression um den Faktor 1,2 an, sank bis zum Tag d1 allerdings wieder leicht und blieb danach für 48 h nahezu unverändert. Von Tag d3 zu Tag d4 sank die Rad51-Expression deutlich und nahm zum Tag d5 noch weiter ab. Insgesamt lagen die Rad51-Signale an den Tagen d4 und d5 unter dem Level der unbehandelten Probe (Abb. 6). Da die Rad51-Signale generell und reproduzierbar schwach waren, sind die Unterschiede in den Quantifizierungen nur bedingt aussagekräftig (Abb. 6B). Eine geringe TP53-Expression war bereits in den T1522-Kontrollen feststellbar. Die TP53-Expression stieg innerhalb der ersten 6 h nach der Bestrahlung auf das 15fache an und sank bis zum Tag d1 um 45%. Von Tag d2 an war das TP53-Level kontinuierlich rückläufig, lag an Tag d5 aber noch messbar über dem der Kontrolle (Abb. 6).

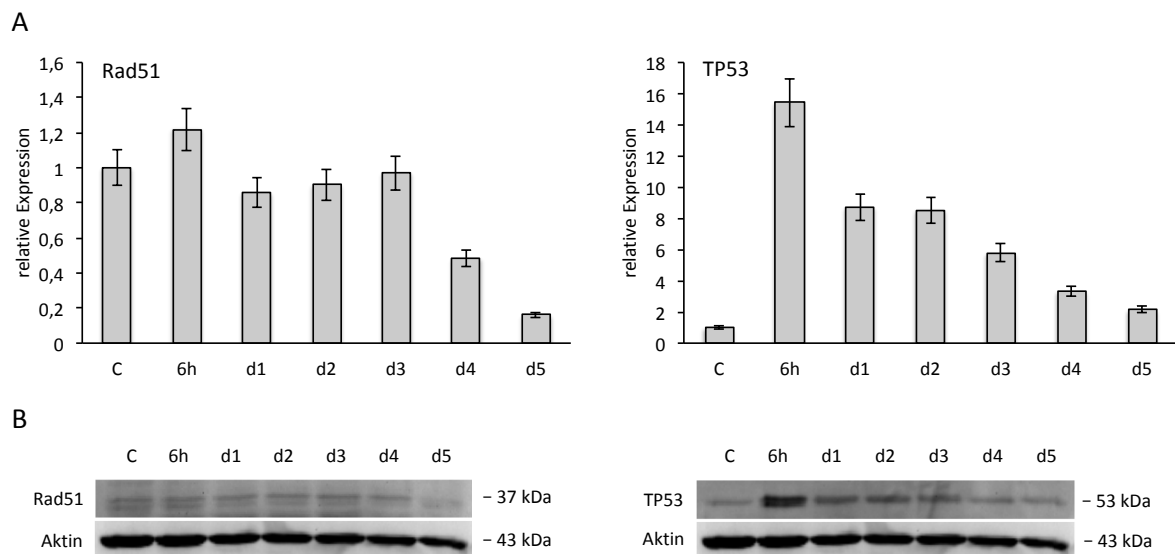


Abbildung 6: Relative Expression von Rad51 und TP53 in der Zelllinie T1522 nach Bestrahlung mit 10 Gy. (A) Graphische Darstellung der relativen Expression von Rad51 und TP53 der Western Blots in (B) normalisiert gegen die darunter gezeigten Ladekontrollen (Aktin). Der empirisch ermittelte, systematische Fehler von 10% ist angegeben. (B) Beispiele für Chemilumineszenz-Aufnahmen der untersuchten Proteine. C: Kontrolle. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für die Daten von zwei biologischen Replikaten mit je zwei identisch durchgeführten technischen Replikaten ($n = 2 \times 2$).

Somit zeigten beide TP53_{WT}-SLGC-Linien reproduzierbar eine messbare, wenn auch geringe Steigerung der Rad51-Expression nach Bestrahlung, die nach 6 h ein Maximum erreichte und nach 1-2 Tagen auf das Level der Kontrolle sank. Die TP53-Expression stieg in beiden TP53-Wildtyplinen innerhalb von 6 h sehr stark an und blieb für mindestens 48 h auf einem deutlich erhöhten Niveau. Damit waren sowohl das Rad51- als auch das

TP53-Level induzierbar, allerdings mit deutlichen Unterschieden der Signalstärke zwischen den beiden SLGC-Linien.

Zusätzlich zu den beiden TP53_{WT}-SLGC-Linien wurde die etablierte GBM-Zelllinie U87MG untersucht, die ebenfalls einen TP53-Wildtyp aufweist. In den U87MG-Kontrollen lagen sowohl die Rad51- als auch die TP53-Expression an der Nachweisgrenze. Nach der Bestrahlung mit 25 Gy zeigte sich nach 6 h eine deutliche Rad51-Expression, die in den nächsten Stunden noch geringfügig anstieg und dann von Tag d1 zu Tag d2 um 55% abfiel. Am Tag d4 lag das Rad51-Level wieder unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 7). Hinsichtlich der TP53-Expression wurde nach 6 h eine drastische Steigerung des TP53-Levels in U87MG beobachtet. Bereits an Tag d1 war die Expression relativ zum 6 h-Wert um 53% reduziert. Bis zum Tag d2 nahm das TP53-Level dagegen nur moderat ab. Von Tag d2 zu Tag d4 sank die Expression um weitere 74% und blieb danach auf einem konstant niedrigen Level, das über dem der Kontrolle lag (Abb. 7).

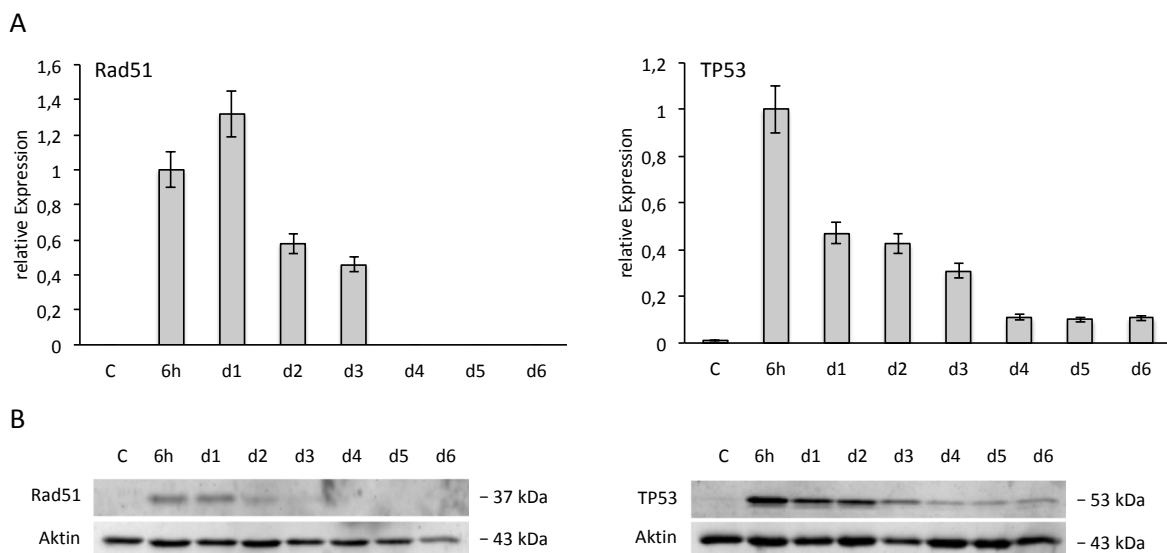


Abbildung 7: Relative Expression von Rad51 und TP53 in der Zelllinie U87MG nach Bestrahlung mit 25 Gy. (A) Graphische Darstellung der relativen Expression von Rad51 und TP53 der Western Blots in (B) normalisiert gegen die darunter gezeigten Ladekontrollen (Aktin). Der empirische ermittelte, systematische Fehler von 10% ist angegeben. (B) Beispiele für Chemilumineszenz-Aufnahmen der untersuchten Proteine. C: Kontrolle. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für die Daten von drei biologischen Replikaten mit je drei identisch durchgeführten technischen Replikaten ($n = 3 \times 3$).

3.1.3 Induzierbarkeit der Rad51- und TP53-Expression in SLGC-Linien mit TP53-*gain of function*-Mutation

Es wurden drei SLGC-Linien mit einer TP53_{GOF}-Mutation untersucht (T1371, T1447-cl4 und T1495). Die Bestrahlung erfolgte mit Einzeildosen in Höhe von 20 Gy.

Die T1371-Kulturen wiesen eine deutlich detektierbare Rad51-Expression auf, die innerhalb von 6 h nach Bestrahlung mit 20 Gy auf das 2,8fache anstieg. Bereits nach 2 h hatte sich das Rad51-Level verdoppelt. Die erhöhte Rad51-Expression blieb über 48 h nahezu konstant und fiel von Tag d2 zu Tag d3 um 33% ab. Bis zum Tag d5 lag das Rad51-Level wieder auf dem Niveau der Kontrolle (Abb. 8).

Wie für eine TP53-Mutante zu erwarten, wies die Kontrolle im ungestressten Zustand eine deutliche TP53 R175H-Expression auf (Freed-Pastor und Prives, 2012). Diese stieg innerhalb von 2 h auf das 2,4fache und blieb für weitere 22 h auf einem hohen Level. Von Tag d1 zu Tag d2 fiel die Expression dagegen deutlich und erreichte an Tag d3 einen Wert unterhalb dem der Kontrolle (Abb. 8). Der Tag d5 konnte wegen der zu geringen Menge an WCE nicht untersucht werden.

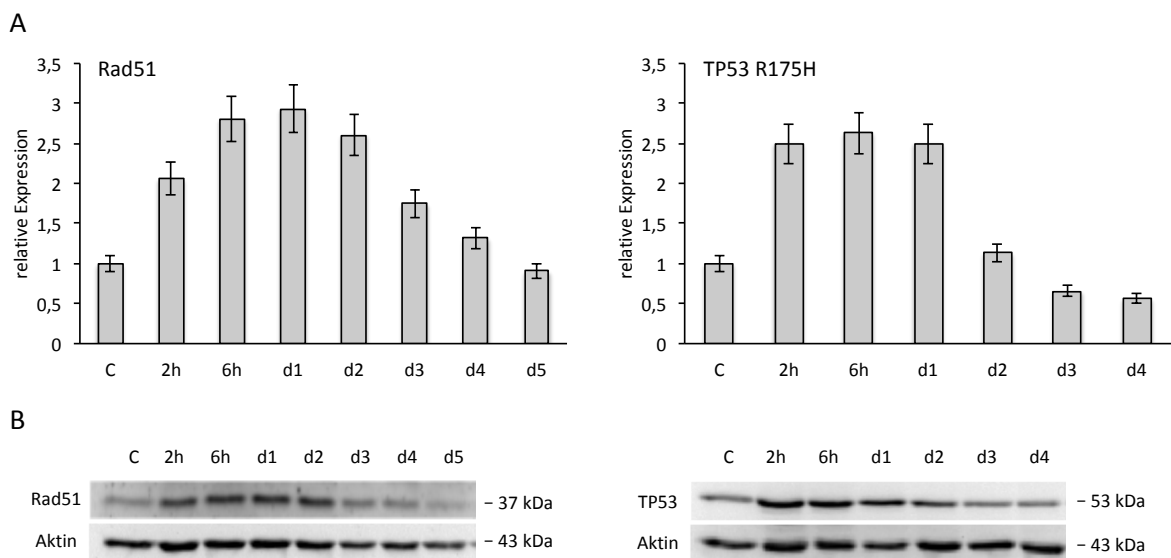


Abbildung 8: Relative Expression von Rad51 und TP53 R175H in der Zelllinie T1371 nach Bestrahlung mit 20 Gy. (A) Graphische Darstellung der relativen Expression von Rad51 und TP53 R175H der Western Blots in (B) normalisiert gegen die darunter gezeigten Ladekontrollen (Aktin). Der empirisch ermittelte, systematische Fehler von 10% ist angegeben. (B) Beispiele für Chemilumineszenz-Aufnahmen der untersuchten Proteine. C: Kontrolle. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für die Daten von zwei biologischen Replikaten mit je zwei identisch durchgeführten technischen Replikaten (n = 2 x 2).

Für die Untersuchung der TP53_{GOF}-Mutante T1447 wurde der Klon T1447-cl4 verwendet, da dieser in der Untersuchung der Basislevel eine höhere Rad51- und TP53-Expression aufwies als die Mutterkultur (Abb. 4). Im Behandlungsexperiment wies T1447-cl4 in den Kontrollen eine sehr geringe Rad51-Expression auf, die sich infolge der Bestrahlung nur wenig änderte. Die Quantifizierung der Western Blots (Abb. 9A) legt die Vermutung nahe, dass das Rad51-Level nach Bestrahlung mit 20 Gy leicht gesteigert werden konnte und danach unter ein detektierbares Level sank (Abb. 9B). Die Expression an Tag d3 konnte wegen zu geringer Proteinmengen nicht untersucht werden.

Die TP53 R248W-Expression war in den T1447-cl4-Kontrollen bereits sehr hoch, wurde aber nach Bestrahlung mit 20 Gy innerhalb von 6 h auf das 1,5fache gesteigert. Von Tag d1 zu Tag d2 fiel die Expression um 25% und sank danach kontinuierlich bis zum Tag d5 (Abb. 9).

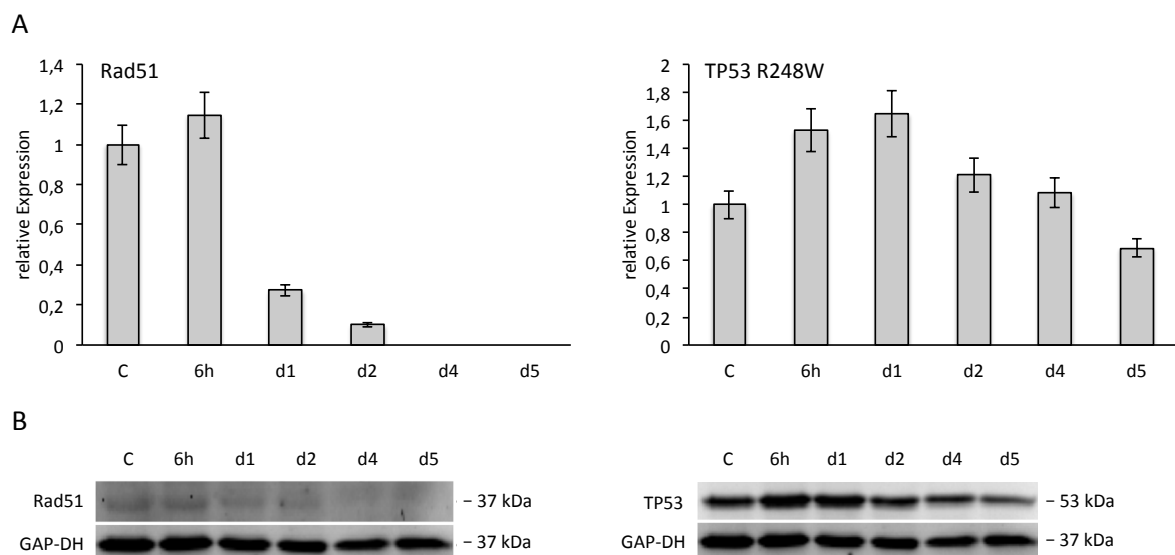


Abbildung 9: Relative Expression von Rad51 und TP53 R248W in der Zelllinie T1447-cl4 nach Bestrahlung mit 20 Gy. (A) Graphische Darstellung der relativen Expression von Rad51 und TP53 R248W der Western Blots in (B) normalisiert gegen die darunter gezeigten Ladekontrollen (GAP-DH). Der empirisch ermittelte, systematische Fehler von 10% ist angegeben. (B) Beispiele für Chemilumineszenz-Aufnahmen der untersuchten Proteine. C: Kontrolle. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für die Daten von zwei biologischen Replikaten mit je zwei identisch durchgeführten technischen Replikaten ($n = 2 \times 2$).

In den Kontrollen der TP53_{GOF}-Mutante T1495 wurden eine geringe Rad51- und eine deutliche TP53 R273H-Expression nachgewiesen. Die Bestrahlung mit 20 Gy induzierte einen deutlichen Anstieg der Rad51-Expression, die an Tag d1 auf das 2,7fache

angestiegen war. Bereits an Tag d2 war das Rad51-Level wieder deutlich gesunken und erreichte an Tag d3 das Level der Kontrolle (Abb. 10).

Für TP53 R273H wurde nach der Bestrahlung ein deutlicher Anstieg der Expression auf das 3,7fache nach 6 h und auf das 4,5fache an Tag d1 beobachtet. Ein Rückgang der TP53 R273H-Expression konnte über fünf Tage nicht beobachtet werden. Vielmehr legten einige Blots die Vermutung nahe, dass die Expression von Tag d1 bis Tag d4 geringfügig zunahm (Abb. 10). Die Ladekontrolle GAP-DH wies im Beispiel am Tag d5 eine partielle Ausbleichung auf, weshalb diese für die Quantifizierung nicht berücksichtigt wurde.

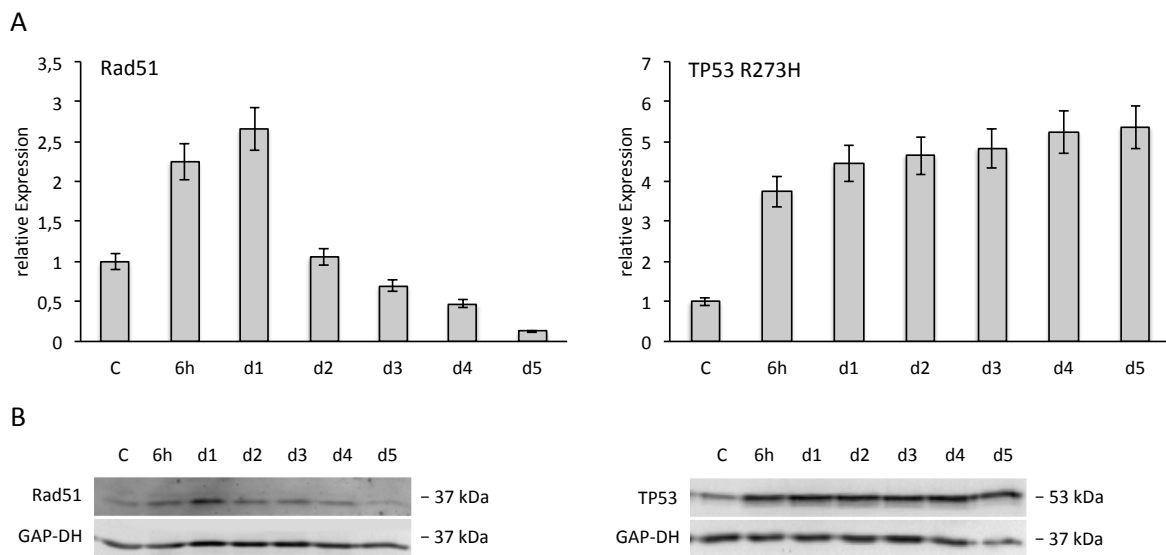


Abbildung 10: Relative Expression von Rad51 und TP53 R273H in der Zelllinie T1495 nach Bestrahlung mit 20 Gy. (A) Graphische Darstellung der relativen Expression von Rad51 und TP53 R273H der Western Blots in (B) normalisiert gegen die darunter gezeigten Ladekontrollen (GAP-DH). Der empirisch ermittelte, systematische Fehler von 10% ist angegeben. (B) Beispiele für Chemilumineszenz-Aufnahmen der untersuchten Proteine. C: Kontrolle. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für die Daten von zwei biologischen Replikaten mit je zwei identisch durchgeführten technischen Replikaten ($n = 2 \times 2$).

Insgesamt wiesen alle drei TP53_{GOF}-Mutanten T1371, T1447-cl4 und T1495 eine Steigerung des Rad51- und TP53_{GOF}-Levels nach Bestrahlung mit 20 Gy auf. Dabei waren die Kinetiken und die maximalen Expressionslevel verschieden. Die stärkste Rad51-Induktion wies T1371-R175H auf, die geringste T1447-cl4-R248W. Am stärksten war das TP53_{GOF}-Level in T1495-R273H erhöht und hier persistierte die Erhöhung auch länger als bei den anderen beiden Zelllinien. In T1371-R175H war die Erhöhung des TP53_{GOF}-Levels am schnellsten rückläufig.

3.1.4 Induzierbarkeit der Rad51- und TP53-Expression in einer SLGC-Linie mit TP53-*missense*-Mutation

Die TP53_{missense}-Mutante T1442-N239D wies in den Kontrollen eine messbare Rad51- und eine, für TP53-Mutanten zu erwartende, starke TP53_{mut}-Expression auf (Freed-Pastor und Prives, 2012). Die Rad51-Expression war 6 h nach Bestrahlung mit 20 Gy auf das Dreifache gestiegen und blieb bis zum Tag d2 auf einem erhöhten Niveau (Abb. 11A). Danach nahm die Expression ab und war an Tag d4 nicht mehr eindeutig nachweisbar (Abb. 11B). Aufgrund einer zu geringen Proteinmenge entfiel die Analyse am Tag d3.

Die sehr starke TP53 N239D-Expresion nahm innerhalb von 6 h nach Bestrahlung auf das 1,6fache zu und fiel nach einer Plateauphase von zwei Tagen ab. Von Tag d2 zu d4 und von Tag d4 zu d5 sank das TP53-Level jeweils um 15% (Abb. 11). Somit zeigte die TP53_{missense}-Mutante T1442 nach Bestrahlung mit 20 Gy eine Steigerung der Rad51- und TP53-Expressionen innerhalb von 6 h, dabei waren die Rad51-Level sehr gering und die TP53 N239D-Level auf einem sehr hohen Niveau (Abb. 11).

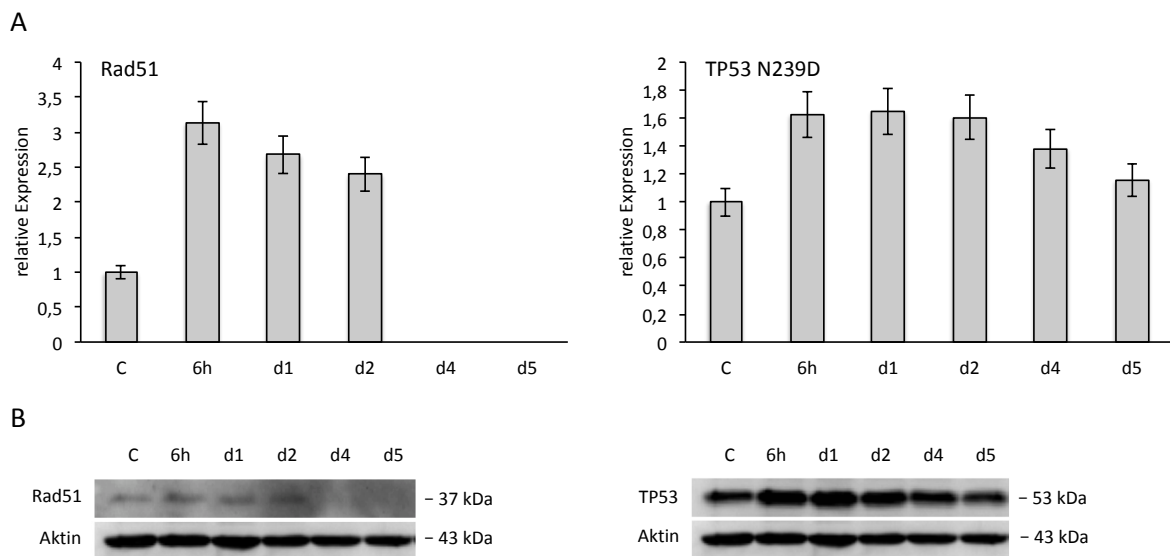


Abbildung 11: Relative Expression von Rad51 und TP53 N239D in der Zelllinie T1442 nach Bestrahlung mit 20 Gy. (A) Graphische Darstellung der relativen Expression von Rad51 und TP53 N239D der Western Blots in (B) normalisiert gegen die darunter gezeigten Ladekontrollen (Aktin). Der empirisch ermittelte, systematische Fehler von 10% ist angegeben. (B) Beispiele für Chemilumineszenz-Aufnahmen der untersuchten Proteine. C: Kontrolle. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für die Daten von zwei biologischen Replikaten mit je zwei identisch durchgeführten technischen Replikaten (n = 2 x 2).

3.1.5 Induzierbarkeit der Rad51- und TP53-Expression in einer SLGC-Linie mit TP53-Spleiß-Mutation

Bei der TP53-Spleiß-Mutante T1452 zeigte sich eine klare Steigerung der basalen Rad51-Expression um 80% 6 h nach Bestrahlung mit 25 Gy. Nach einer leichten Senkung über die nächsten 48 h erreichte die Rad51-Expression an Tag d3 wieder das Ausgangsniveau und fiel an den Folgetagen sogar darunter (Abb. 12).

Die TP53-Expression war bereits in der Kontrolle sehr stark und zeigte keine eindeutige Steigerung in den ersten fünf Tagen nach der Bestrahlung. Lediglich an Tag d4 und d5 ergaben die Quantifizierungen leichte Expressionssteigerungen, die maximal das 1,5fache der Kontrolle erreichten (Abb. 12). Damit zeigte die Rad51-, nicht aber die TP53-Expression eine eindeutige Zeitkinetik.

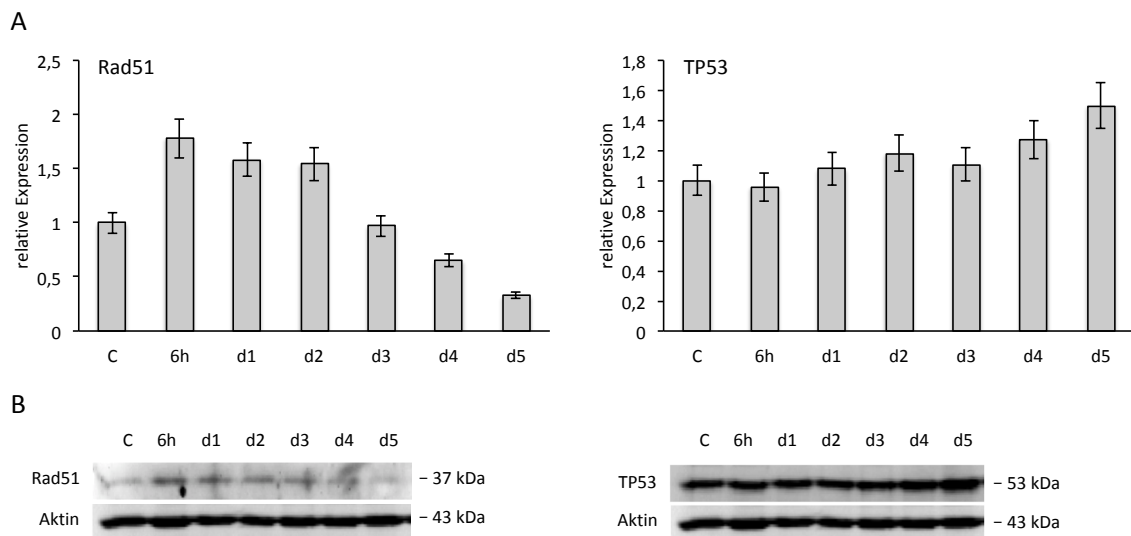


Abbildung 12: Relative Expression von Rad51 und TP53 in der Zelllinie T1452 nach Bestrahlung mit 25 Gy. (A) Graphische Darstellung der relativen Expression von Rad51 und TP53 der Western Blots in (B) normalisiert gegen die darunter gezeigten Ladekontrollen (Aktin). Der empirisch ermittelte, systematische Fehler von 10% ist angegeben. (B) Beispiele für Chemilumineszenz-Aufnahmen der untersuchten Proteine. C: Kontrolle. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für die Daten von zwei biologischen Replikaten mit je zwei identisch durchgeführten technischen Replikaten ($n = 2 \times 2$).

3.1.6 Induzierbarkeit der Rad51- und TP53- Expression nach Einfach- und Doppelbehandlung der TP53_{GOF}-SLGC-Linie T1495

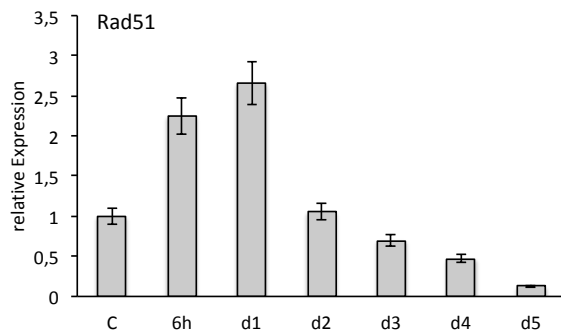
Die Behandlung mit 100 μ M TMZ führte in T1495-Kulturen zu einer geringfügigen Erhöhung der Rad51-Levels um 50% bis zum Tag d1. Bereits an Tag d2 war das Rad51-Level wieder deutlich abgefallen. Damit fiel der Anstieg der Rad51-Expression deutlich

geringer aus als nach der Bestrahlung mit 20 Gy (Abbs. 13 und 14). Die TP53 R273H-Expression wurde nach Behandlung mit 100 μ M TMZ innerhalb von 6h deutlich gesteigert und erreichte an Tag d2 das 2,3fache des Ausgangslevels. Im Anschluss blieb das TP53 R273H-Level weiterhin erhöht und lag auch an Tag d5 noch deutlich über dem der Kontrolle. Relativ zur Bestrahlung mit 20 Gy fiel der Anstieg der TP53-Expression eindeutig geringer aus. Weiterhin war die Erhöhung des TP53 R273H-Levels nach Behandlung mit 100 μ M TMZ nur transient, während die Erhöhung nach Bestrahlung mit 20 Gy für fünf Tage stabil blieb (Abbs. 13 und 14).

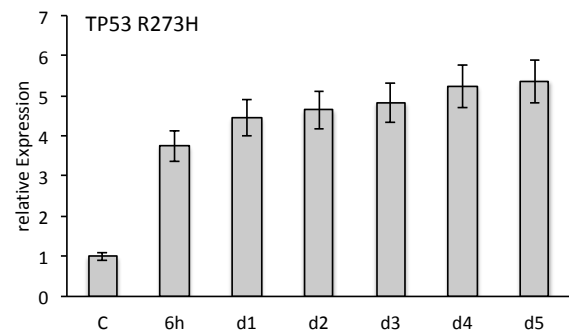
Die Doppelbehandlung mit 20 Gy und 100 μ M TMZ führte zu einer sehr starken Steigerung der Rad51-Expression. An Tag d1 war das Rad51-Level auf das 12fache gesteigert. Trotz schrittweisem Rückgang war das Rad51-Level am Tag d5 relativ zur Kontrolle immer noch verdreifacht. Somit führte die Doppelbehandlung zu einer Induktion der Rad51-Expression, die deutlich über dem Effekt der Einzelbehandlungen mit 20 Gy und 100 μ M TMZ lag. Da die Steigerung des Rad51-Levels bis zum Tag d1 nach Behandlung mit 20 Gy 2,7fach und nach Behandlung mit 100 μ M TMZ 1,5fach war, war der Effekt der Doppelbehandlung mehr als additiv (Abbs. 13 und 14). Das TP53 R273H-Level war 6 h nach der Doppelbehandlung auf das 3fache gesteigert und blieb bis zum Tag d5 relativ konstant um das 2,8fache bis 4,6fache erhöht. Die Induktion der TP53 R273H-Expression 6h nach Behandlung mit 20 Gy betrug dagegen das 3,8fache, 6h nach Behandlung mit 100 μ M TMZ das Doppelte (Abbs. 13 und 14). Damit war die Erhöhung des ohnehin hohen TP53 R273H-Levels nach alleiniger Bestrahlung am effizientesten. Auch die maximale Steigerung war nach alleiniger Bestrahlung höher als nach der Behandlung mit TMZ sowie der Doppelbehandlung (5,4fach an Tag d5) (Abbs. 13 und 14).

Zu allen Zeitpunkten wurden zusätzlich Zellextrakte aus DMSO-behandelten Kulturen geerntet und analysiert. Dabei zeigten sich nur sehr geringe Veränderungen der Rad51- und TP53-Expression, die im Bereich des empirisch ermittelten systematischen Fehlers lagen (Abb. 20, Anhang).

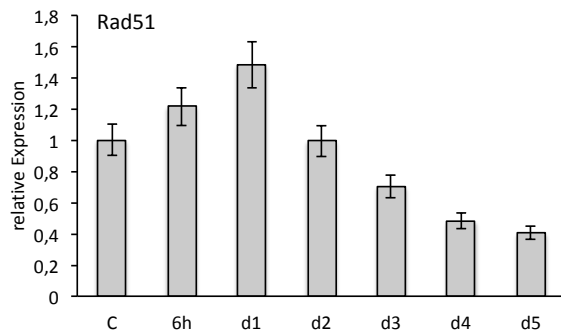
RT



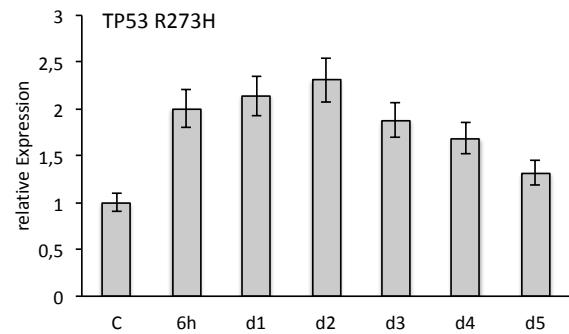
RT



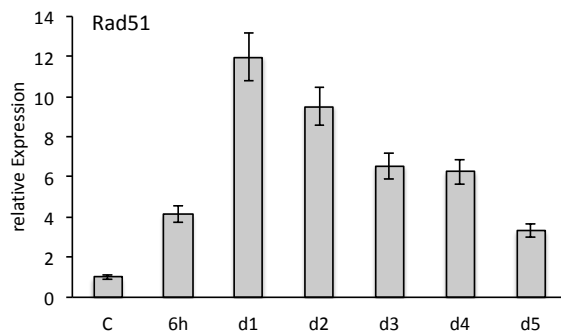
TMZ



TMZ



RT+TMZ



RT+TMZ

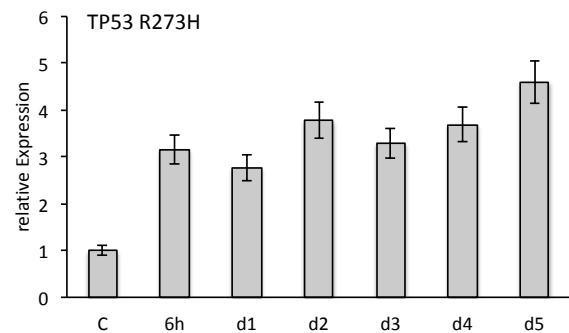
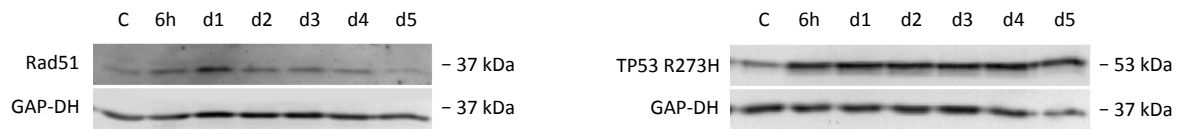
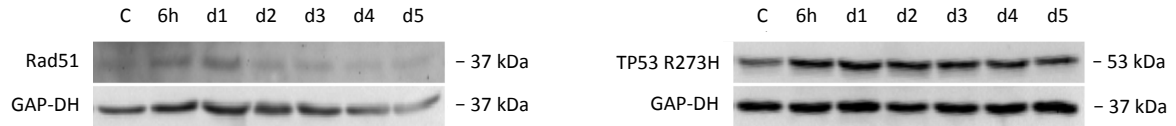


Abbildung 13: Graphische Darstellung der relativen Expression von Rad51 und TP53 R273H in der Zelllinie T1495 nach Behandlung mit 20 Gy, mit 100 μ M TMZ und mit 20 Gy und 100 μ M TMZ. Graphische Darstellung der relativen Expression von Rad51 und TP53 R273H der Western Blots in Abb. 14 normalisiert gegen die darunter gezeigten Ladekontrollen (GAP-DH). Der empirisch ermittelte, systematische Fehler von 10% ist angegeben. RT: Behandlung mit 20 Gy, TMZ: Behandlung mit 100 μ M TMZ, RT+TMZ: Behandlung mit 20 Gy und 100 μ M TMZ. C: Kontrolle. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für die Daten von zwei biologischen Replikaten mit je zwei identisch durchgeführten technischen Replikaten ($n = 2 \times 2$).

RT



TMZ



RT+TMZ



Abbildung 14: Western Blots von Rad51 und TP53 R273H in der Zelllinie T1495 nach Behandlung mit 20 Gy, mit 100 μ M TMZ und mit 20 Gy und 100 μ M TMZ. Beispiele für Chemilumineszenz-Aufnahmen von Rad51 und TP53 R273H, sowie der Ladekontrolle GAP-DH. RT: Behandlung mit 20 Gy, TMZ: Behandlung mit 100 μ M TMZ, RT+TMZ: Behandlung mit 20 Gy und 100 μ M TMZ. C: Kontrolle. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ zwei biologische Replikate mit je zwei identisch durchgeführten technischen Replikaten ($n = 2 \times 2$).

3.2 Veränderung der subzellulären Lokalisation von Rad51 nach Bestrahlung und Behandlung mit TMZ

Durch die Western Blot Analysen wurde eine Steigerung der Rad51-Expression in U87MG und den verschiedenen SLGC-Linien nach Bestrahlung belegt (Kapitel 3.1). Ein wichtiges Kriterium der Rad51-Aktivität ist jedoch die Lokalisation im Nukleus und die Bildung von Filamenten an der DNA-Läsion (Gildemeister et al., 2009). Daher wurde die Rad51-Expression zusätzlich auf Einzelzellniveau mittels immuncytochemischer Färbung untersucht. Hierbei wurden insbesondere die Frühphasen nach der Behandlung der Zellen untersucht (1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h), da bei den Western Blot Analysen die deutlichsten Veränderungen der Rad51-Expression zwischen 6 h und 24 h nach der Bestrahlung beobachtet wurden. Die immuncytochemischen Analysen wurden als Doppelbehandlungen mit TMZ angelegt und in allen Fällen mit 5 Gy bestrahlt, um kooperative Effekte zwischen beiden Behandlungsformen erkennen zu können. Auch bei dieser Analyse wurde die etablierte GBM-Zelllinie U87MG als Referenzzelllinie in die Experimente einbezogen. Als Kontrollen dienten unbestrahlte Kulturen.

Zu Beginn der Arbeit wurden zunächst die Spezifität des Antikörpers überprüft und die Assay-Bedingungen etabliert. Dabei wurden unbehandelte U87MG-Zellen für die Ermittlung der optimalen Antikörperversdünnung (1:5, 1:10, 1:20) und des Signal-Rausch-Verhältnisses eingesetzt. Die Verdünnung von 1:10 erwies sich als gut geeignet (Positivkontrolle in Abb. 27, Anhang). Weiterhin wurde überprüft, dass die gewählte 1:400 Verdünnung des Sekundärantikörpers in Abwesenheit des Primärantikörpers keine erkennbaren Signale ergab (Negativkontrolle, Abb. 27, Anhang). Im nächsten Schritt wurden die Bedingungen etabliert, die zum Nachweis von Rad51 im Zellkern geeignet waren. Hierfür wurden bestrahlte Präparate von U87MG-Zellen genutzt, die zum Teil von Dr. Hirsland zur Verfügung gestellt wurden.

Bei der immuncytochemischen Analyse kernständiger Rad51-Signale erwies sich das Signal-Rausch-Verhältnis als ungünstig (s. z.B. Abb. 16). Dennoch konnten in den Kernen der behandelten Zellen punktuelle Signale beobachtet werden, die als Rad51-Focibildung an DNA-Läsionen interpretiert wurden (siehe Pfeil in Abb. 15). Zellkerne mit solchen Signalen wurden als Rad51-positiv bewertet. Der relative Anteil Rad51-positiver Zellkerne an der Gesamtzahl der Zellkerne in einem Präparat wurde ermittelt und graphisch dargestellt (Abbs. 17-19). Es wurden jeweils zehn repräsentative Areale pro Zelllinie, Behandlung und Zeitpunkt bewertet und die Anzahl Rad51-positiver Kerne ermittelt. Eine

typische Kollektion von Mikrofotografien einer untersuchten Zelllinie ist in Abbildung 16 zusammengestellt, die weiteren werden im Anhang gezeigt (Abbs. 21-26, Anhang). Abbildung 16 zeigt exemplarisch an der Zelllinie U87MG, die im Western Blot eine der effizientesten Rad51-Induktionen aufwies, dass die Rad51-Level zwischen den Zellen eines Präparats variieren. Weiterhin war die Rad51-Expression im perinukleären zytoplasmatischen Bereich am höchsten. Dies traf auch auf die untersuchten SLGC-Linien zu (Abbs. 21-26, Anhang). Die Anzahl der Rad51-Foci im Zellkern war stets gering. Der Anteil der Zellkerne mit deutlichen Rad51-Foci wird im Folgenden anhand der Graphen besprochen, die sich aus den Auszählungen ergaben. Dabei werden die Zelllinien, wie in Kapitel 3.1, aufgrund ihres TP53-Status in Gruppen besprochen.

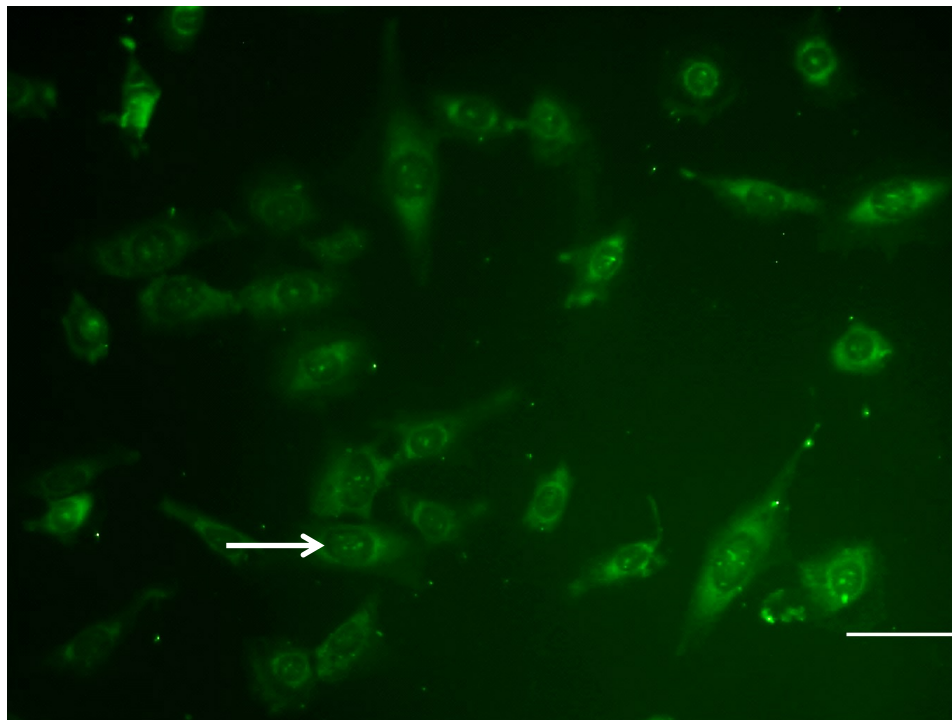


Abbildung 15: Exemplarische immuncytochemische Analyse mit dem Rad51-Antikörper. Es wurde ein Präparat gewählt, das 1 h nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M TMZ fixiert wurde. Die immuncytochemische Färbung fand mit der Antikörperkombination α Rad51/DyLight[®] statt. Der Pfeil zeigt einen als Rad51-positiv gewerteten Zellkern, der drei deutlich positive punktuelle Rad51-Signale aufweist. Messbalken 50 μ m.

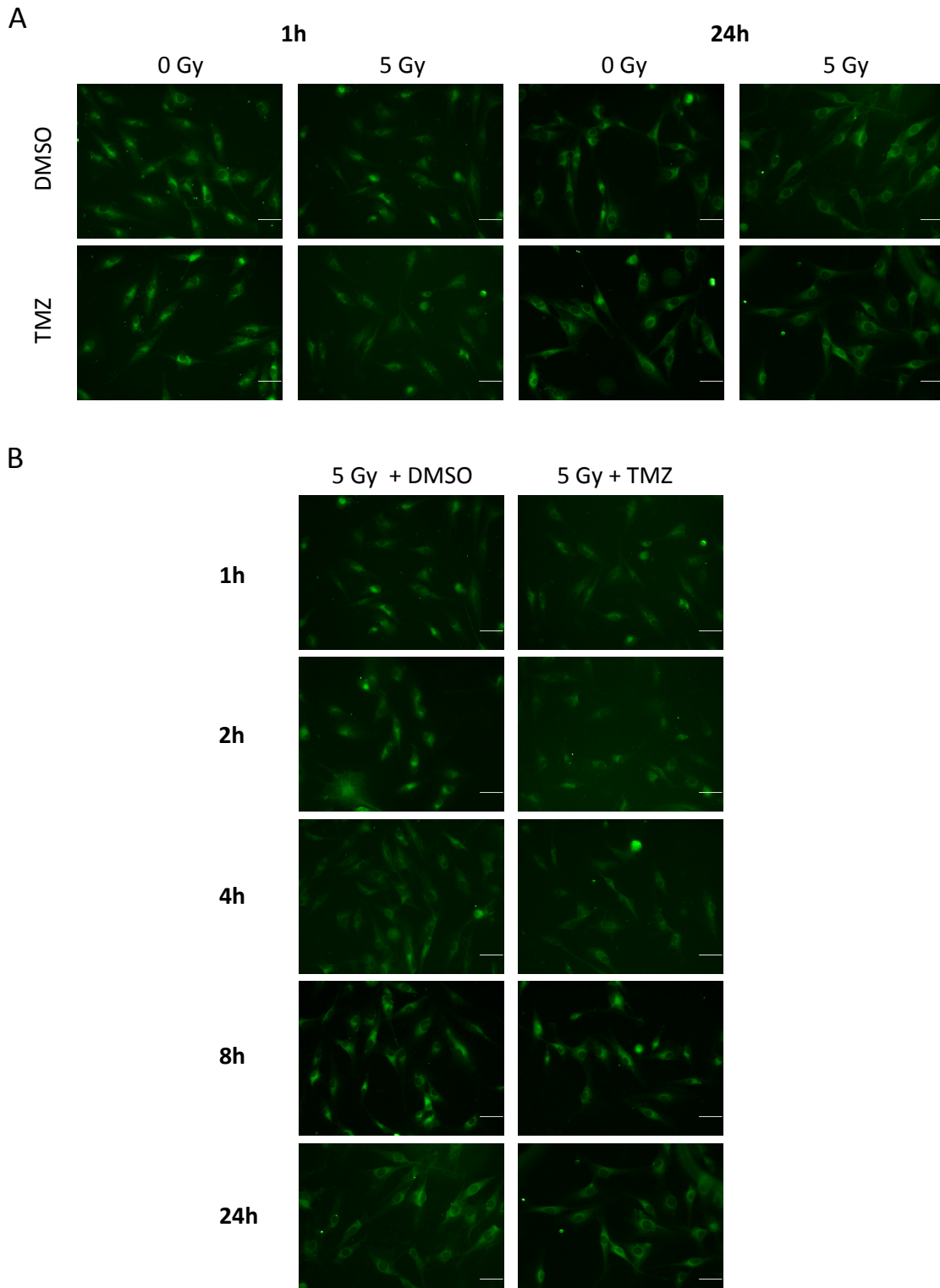


Abbildung 16: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der Zelllinie U87MG nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 μ M TMZ. Die Mikrofotografien zeigen die immuncytochemische Färbung mit der Antikörperkombination α Rad51/DyLight®. (A) Direkter Vergleich von Proben 1 h und 24 h nach Beginn der Analyse. (B) Bestrahlte und doppelbehandelte Kulturen im zeitlichen Verlauf. DMSO: Behandlung mit DMSO; TMZ: Behandlung mit 100 μ M Temozolomid; 5 Gy: Bestrahlung mit 5 Gy. Messbalken 50 μ m. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für zwei identisch durchgeführte immuncytochemische Analysen (n = 2).

3.2.1 Rad51-positive Zellkerne in Zelllinien mit TP53-Wildtyp

Bei allen untersuchten TP53_{WT}-Linien war der Anteil der Rad51-positiven Kerne in den Kontrollen sehr gering (T1440: 4%, T1522: 2%, U87MG: 4%), stieg aber nach Bestrahlung mit 5 Gy deutlich an und erreichte nach 8 h ein Maximum (T1440: 49%, T1522: 51%, U87MG: 56%). 24 h nach Bestrahlung war der Anteil Rad51-positiver Kerne wieder gesunken (T1440: 31%, T1522: 38%, U87MG: 42%), lag aber immer noch deutlich über dem der Kontrollen. Die Doppelbehandlung mit 5 Gy und TMZ verstärkte die Zunahme des Anteils der Rad51-positiven Kerne im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung (Maximalwerte: T1440: 65% nach 8 h, T1522: 61% nach 4 h, U87MG: 68% nach 8 h). 24 h nach Beginn der Doppelbehandlung war der Anteil der Rad51-positiven Kerne wieder vermindert (T1440: 32%, T1522: 39%, U87MG: 55%), obwohl das TMZ nach wie vor präsent war. Die alleinige Behandlung mit TMZ führte über 24 h ebenfalls zu einem allerdings deutlich geringeren Anstieg des Anteils an Rad51-positiven Kernen bei den beiden SLGC TP53_{WT}-Linien (T1440: 15%, T1522: 18%). Im Fall von U87MG war der TMZ-vermittelte Effekt deutlich höher (49% Rad51-positive Zellkerne nach 24 h) und könnte damit hier einen ähnlich starken Effekt auf die Rad51-Focibildung haben wie die Bestrahlung (Abb. 17). Bei keiner der untersuchten TP53_{WT}-Linien konnte somit ein synergistischer Effekt der Doppelbehandlung bezüglich der Rad51-Focibildung beobachtet werden.

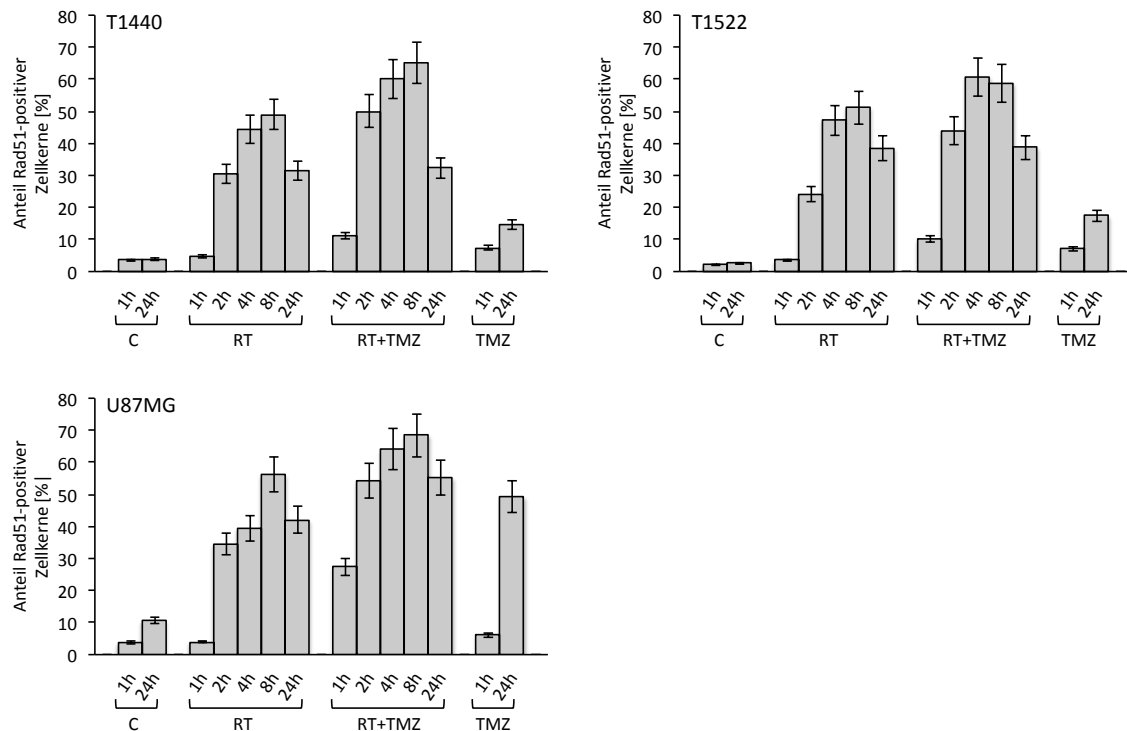


Abbildung 17: Veränderung des Anteils Rad51-positiver Zellkerne zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 5 Gy und Doppelbehandlung mit 5 Gy und TMZ in den TP53_{WT}-Linien T1440, T1522 und U87MG. Quantifizierung des Anteils nach immunzytochemischer Färbung mit der Antikörperkombination α Rad51/DyLight[®]. Der empirisch bestimmte Zählfehler von 10% ist angegeben. C: Kontrolle, RT: Bestrahlung mit 5 Gy, RT+TMZ: Behandlung mit 5 Gy und TMZ (T1440: 25 μ M, T1522 & U87MG: 100 μ M), TMZ: Behandlung mit TMZ (T1440: 25 μ M, T1522 & U87MG: 100 μ M). Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für zwei identisch durchgeführte immunzytochemische Analysen (n=2) und zeigen die Mittelwerte des relativen Anteils Rad51-positiver Zellkerne von je zehn repräsentativen Mikrofotografien.

3.2.2 Rad51-positive Zellkerne in SLGC-Linien mit TP53-*gain of function*-Mutation

Die TP53_{GOF}-Linien T1371-R175H und T1495-R273H wiesen in den Kontrollen einen deutlich höheren Anteil an Rad51-positiven Kernen auf als die TP53_{WT}-Linien (T1371: 12%, T1495: 27%), bei T1447-cl4-R248W lag der Anteil mit 4% im Bereich der TP53_{WT}-Linien. Bei allen TP53_{GOF}-SLGCs wurde durch die Bestrahlung mit 5 Gy der Anteil der Rad51-positiven Zellkernen deutlich gesteigert (Maximalwerte: T1371: 59% nach 4 h, 1447-cl4: 61% nach 4 h, T1495: 65% nach 8 h). Die Doppelbehandlung mit 5 Gy und TMZ verstärkte die Zunahme des Anteils an Rad51-positiven Kernen im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung im Fall von T1371 deutlich (Maximalwert: T1371: 95% nach 1 h), und hatte auch im Fall von T1447-cl4 und T1495 einen zusätzlichen Effekt (Maximalwerte: T1447-cl4: 76% nach 8 h, T1495: 74% nach 4 h). Somit wurde bei zwei

der TP53_{GOF}-SLGCs der Anteil der Rad51-positiven Kerne durch die Doppelbehandlung vergleichbar zu den TP53_{WT}-SLGCs gesteigert, bei T1371-R175H dagegen deutlich stärker (Abbs. 17 und 18).

Die alleinige Behandlung mit TMZ führte über 24 h ebenfalls zu einem Anstieg des Anteils an Rad51-positiven Kernen (T1371: 22%; 33%, T1447-cl4: 28% T1495: 43%). Dabei konnte bei T1447-cl4 der stärkste Anstieg relativ zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 18). Lediglich für T1371 könnte hier ein synergistischer Effekt der Doppelbehandlung bezüglich der Rad51-Focibildung abgeleitet werden.

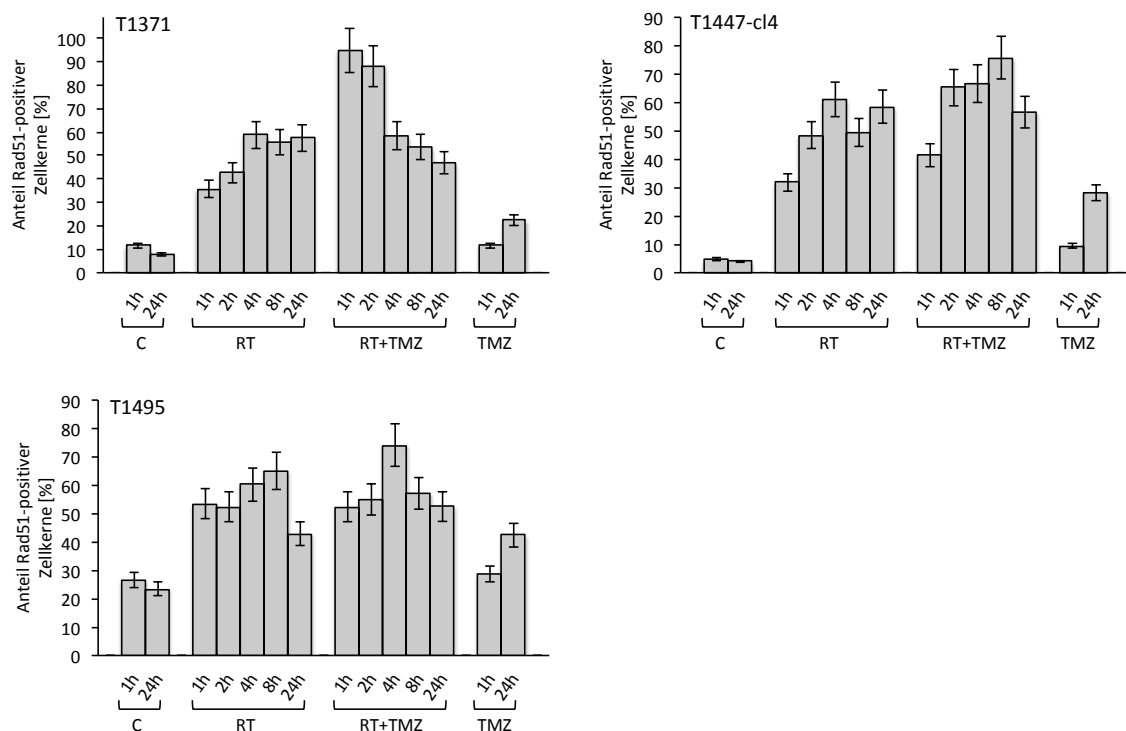


Abbildung 18: Veränderung des Anteils Rad51-positiver Zellkerne zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 5 Gy und Doppelbehandlung mit 5 Gy und TMZ in den TP53_{GOF}-Linien T1371, T1447-cl4 und T1495. Quantifizierung des Anteils nach immunzytochemischer Färbung mit der Antikörperkombination α Rad51/DyLight[®]. Der empirisch bestimmte Zählfehler von 10% ist angegeben. C: Kontrolle, RT: Bestrahlung mit 5 Gy, RT+TMZ: Behandlung mit 5 Gy und TMZ (T1371: 200 μ M, T1447-cl4: 50 μ M, T1495: 100 μ M), TMZ: Behandlung mit TMZ (T1371: 200 μ M, T1447-cl4: 50 μ M, T1495: 100 μ M). Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für zwei identisch durchgeführte immunzytochemische Analysen (n = 2) und zeigen die Mittelwerte des relativen Anteils Rad51-positiver Zellkerne von je zehn repräsentativen Mikrofotografien.

3.2.3 Rad51-positive Zellkerne in einer SLGC-Linie mit TP53-*missense*-Mutation

Die TP53_{missense}-Linie T1442-N239D wies in der Kontrolle mit 13% einen deutlich höheren Anteil an Rad51-positiven Zellkernen auf als die TP53_{WT}-Linien. 8 h nach Bestrahlung mit 5 Gy war dieser Anteil mit 70% deutlich gesteigert. Die Doppelbehandlung mit 5 Gy und TMZ verstärkte auch bei T1442 die Zunahme des Anteils der Rad51-positiven Kerne im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung. Mit 80% nach 8 h lag der Anteil auch bei dieser TP53-Mutante höher als bei den TP53_{WT}-SLGCs nach Doppelbehandlung. Die alleinige Behandlung mit TMZ führte über 24 h zu einem Anstieg des Anteils der Rad51-positiven Zellkerne auf 46% (Abb. 19). Hier lässt sich weder ein additiver, noch ein synergistischer Effekt der Doppelbehandlung ableiten.

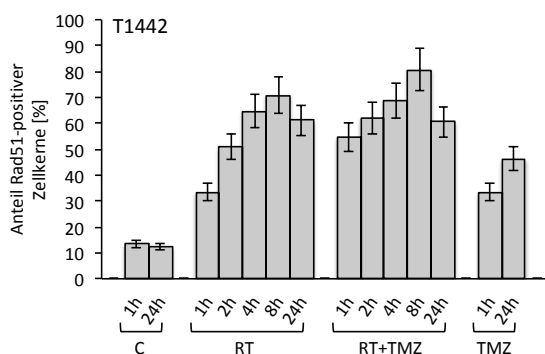


Abbildung 19: Veränderung des Anteils Rad51-positiver Zellkerne zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 5 Gy und Doppelbehandlung mit 5 Gy und TMZ in der TP53_{missense}-Linie T1442.

Quantifizierung des Anteils nach immunzytochemischer Färbung mit der Antikörperkombination α Rad51/DyLight®. Der empirisch bestimmte Zählfehler von 10% ist angegeben. C: Kontrolle, RT: Bestrahlung mit 5 Gy, RT+TMZ: Behandlung mit 5 Gy und 100 µM TMZ, TMZ: Behandlung mit 100 µM TMZ. Die gezeigte Abbildung ist repräsentativ für zwei identisch durchgeführte immunzytochemische Analysen (n = 2) und zeigt die Mittelwerte des relativen Anteils Rad51-positiver Zellkerne von je zehn repräsentativen Mikrofotografien.

3.2.4 Zusammenhang zwischen Rad51-positiven Zellkernen und den Analyseparametern

Bei allen untersuchten Zelllinien konnte eine deutliche Zunahme des Anteils an Rad51-positiven Zellkernen in der Frühphase nach Bestrahlung mit 5 Gy beobachtet werden. Die Doppelbehandlung mit 5 Gy und TMZ verstärkte bei jeder Zelllinie diesen Anstieg, allerdings waren die Effekte meist weniger als additiv. Bis auf T1447-cl4 wurde bei allen

TP53-Mutanten bereits in den Kontrollen ein höherer Anteil Rad51-positiver Zellkerne beobachtet als bei den TP53_{WT}-SLGCs.

4 Diskussion

Die Therapieresistenz von stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs), die an der Entstehung von therapieresistenten Tumorrezidiven beteiligt sind, ist ein zentrales Problem bei der Behandlung von GBMs (Hadjipanayis und Van Meir, 2009; Osuka und Van Meir, 2017). Als ein möglicher Mechanismus für die Therapieresistenz von SLGCs wird eine erhöhte Kapazität zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen angenommen (Bao et al., 2006; Osuka und Van Meir, 2017). Hieran könnte Rad51 als Schlüsselprotein der homologen Rekombination beteiligt sein. Es wurde beobachtet, dass Rad51 in der Mehrzahl maligner humaner Tumoren überexprimiert ist (Hine et al., 2014), über die Expression von Rad51 in SLGCs aus Glioblastomen und Gliosarkomen ist jedoch nichts bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Rad51 in SLGCs aus verschiedenen Patienten mit malignen Gliomen exprimiert wird und ob es nach Bestrahlung zu einer Steigerung der Rad51-Expression und einer Veränderung der subzellulären Lokalisation von Rad51 kommt, als Anzeichen für eine gesteigerte Aktivität der Rad51-abhängigen DNA-Reparatur. Außerdem wurde analysiert, ob es Unterschiede zwischen SLGC-Linien mit Wildtyp-TP53 und TP53-Mutation bezüglich der Induktion und der Veränderung der subzellulären Lokalisation gibt. Schließlich wurde untersucht, ob die zusätzliche Gabe von TMZ die strahleninduzierte Rad51-Expression und die Rad51-Lokalisation beeinflusst.

4.1 Rad51 wird in SLGCs aus verschiedenen Patienten exprimiert

In den meisten humanen malignen Tumorzellen kommt es zu einer starken Überexpression von Rad51 (Hine et al., 2014). Diese hängt unmittelbar mit einer erhöhten Aktivität des Rad51-Promoters zusammen, die im Vergleich zu nicht malignen Zellen durchschnittlich um das 850fache gesteigert ist. Die Regulierung des Rad51-Promoters ist ein komplexer Vorgang, zu dem noch wenig bekannt ist. Es wurde allerdings beschrieben, dass die Rad51-Promoteraktivität mit zunehmender maligner Transformation der Tumorzellen ansteigt (Hine et al., 2014).

Für die in dieser Arbeit untersuchten SLGC-Linien sowie für die etablierte GBM-Linie U87MG konnte eine Expression von Rad51 nachgewiesen werden. Die mittels Western

Blot Analyse nachgewiesenen Rad51-Proteinlevel waren bei unbehandelten SLGCs allerdings insgesamt niedrig und bewegten sich zum Teil an der Nachweisgrenze dieses Verfahrens, wenn 20 µg Gesamtzellproteinextrakt eingesetzt wurden. Aus diesem Grund konnten auch keine deutlichen Unterschiede in den basalen Levels der Rad51-Expression zwischen den verschiedenen SLGC-Linien festgestellt werden. Dies schließt das Fehlen von nachweisbaren Unterschieden zwischen unbehandelten SLGCs mit Wildtyp-TP53 und TP53-Mutation ein. Eine PCR-Untersuchung könnte hierbei eventuell auch geringe Unterschiede der Rad51-Expressionslevel bei den verschiedenen unbehandelten SLGC-Linien aufzeigen. Interessanter wären dabei Analysen zur Methylierung des Rad51-Promoters in den verschiedenen SLGCs durch sogenannte methylierungsspezifische PCRs (MSP) (Ramalho-Carvalho et al., 2018) oder *methyalted DNA immunoprecipitation* (MeDIP) (Weber et al., 2005). Hierdurch könnten möglicherweise Unterschiede in der Regulierung der Rad51-Genexpression aufgedeckt werden.

4.2 Die Bestrahlung von SLGCs führt zu einem Anstieg der Rad51- und TP53-Expression

Bao und Kollegen (2006) konnten für Gliomstammzellen, die den Marker CD133 exprimieren, eine erhöhte und effektivere Reparatur von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung feststellen. Rezente Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass in SLGCs insbesondere der Rad51-abhängigen homologen Rekombination eine gesteigerte Bedeutung in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung zukommen könnte (King et al., 2017). Außerdem vermutete diese Arbeitsgruppe eine signifikante Assoziation zwischen der Expression von Stammzellmarkern wie SOX2 und der Expression von Rad51 (King et al., 2017). Bei allen in dieser Arbeit untersuchten SLGC-Linien konnte eine Steigerung der Rad51-Expression nach Bestrahlung festgestellt werden. Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass der Rad51-abhängigen DNA-Reparatur in SLGCs nach Bestrahlung eine wichtige Bedeutung zukommen könnte und dieser Mechanismus zu der erhöhten DNA-Reparaturkapazität der SLGCs beitragen könnte.

Die als Referenzzelllinie untersuchte etablierte GBM-Linie U87MG (Wildtyp-TP53) zeigte eine effiziente Induktion der Rad51-Expression nach Bestrahlung, die vergleichbar mit der einiger SLGCs war. Diese Zelllinie exprimiert kein SOX2 (Hirsland, 2017). Die

in dieser Arbeit verwendeten SLGC-Linien exprimieren alle den Transkriptionsfaktor SOX2, wobei die Expressionslevel zwischen den SLGC-Linien variieren (Choschzick et al., 2014; Hirsland, 2017). Unmittelbare Auswirkungen der Behandlungen auf die SOX2-Expression wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die Arbeiten von Hirsland (2017) lassen aber indirekt den Rückschluss zu, dass eine Assoziation der Rad51-Expression mit der Expression von Stammzellmarkern, die King und Kollegen (2017) beschrieben, nicht bestätigt werden kann. So ist das SOX2-Level in den SLGC-Linien, insbesondere T1440, T1442 und T1452 hoch, in T1495-Kulturen, in denen neben Typ I- auch viele Typ II- und Typ III-Zellen vorliegen (Chen et al., 2010) (Abb. 1), reduziert und fehlt in den U87MG-Zellen (Hirsland, 2017). Die Induktion von Rad51 war insbesondere in U87MG-Zellen und auch bei T1495 effizient.

In diesem Kontext sind zunächst einmal die Bestrahlungsdosen von Bedeutung. Während Bao und Kollegen (2006) die Bestrahlung mit Einzeldosen zwischen 2 und 5 Gy durchführten, lagen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Dosen deutlich darüber. Dies begründet sich darin, dass in der Arbeitsgruppe festgestellt wurde, dass die Strahlendosis, bei der die Proliferation der SLGC-Zellen auf die Hälfte gesenkt wurde (ED_{50} Proliferation), zum Teil 20 Gy und mehr beträgt (Dahlke, 2018; Dorenberg, 2017). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Beobachtung, da die Rad51-Induktion für die SLGC-Linie T1452 mit 25 Gy effizient war.

Die SLGC-Linie T1440 wurde ebenfalls mit 25 Gy bestrahlt. Strahlendosen von 20 Gy wurden in dieser Arbeit für die SLGC-Linien T1371, T1447-cl4, T1495 und T1442 eingesetzt. Lediglich T1522 wurde, analog zu früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe, mit einer niedrigeren Dosis, im vorliegenden Fall mit 10 Gy, bestrahlt.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob der TP53-Status der SLGCs einen Einfluss auf die Induktion der Rad51-Expression nach Bestrahlung haben könnte.

Die Analysen der Proteinlevels des Tumorsuppressors und Transkriptionsfaktors TP53 ergaben in den unbestrahlten Zelllinien mit Wildtyp-TP53 T1440, T1522 und U87MG sehr geringe TP53-Levels, die SLGCs mit TP53-Mutation wiesen deutlich höhere TP53-Levels auf. Ein stark erhöhtes TP53-Level ist in Tumorzellen mit mutiertem TP53 ein häufig beschriebenes Phänomen (Freed-Pastor und Prives, 2012). Für das Einhalten des Wildtyp-TP53-Levels auf einem geringen Niveau, ebenso wie das von mutiertem TP53 auf erhöhtem Niveau (Freed-Pastor und Prives, 2012; Poyurovsky und Prives, 2006), scheint explizit die Wechselwirkung zwischen der Mikroumgebung einer Tumorzelle und dem TP53 verantwortlich zu sein (Terzian et al., 2008). Neben verschiedenen Mechanismen,

wie einer grundlegend aktivierten DNA-Schadensantwort in Tumorzellen, die die für den TP53-Abbau entscheidende Polyubiquitinylierung beeinträchtigt (Frum et al., 2016), scheint vor allem die Interaktion des mutierten TP53 mit dem Hitzeschockprotein HSP90 eine bedeutsame Erklärung für die starke Akkumulation von mutiertem TP53 in Tumorzellen zu liefern. Hierbei bildet HSP90 Komplexe sowohl mit TP53 als auch mit MDM2 und verhindert so den Abbau des mutierten TP53 (Li et al., 2011).

Die Bestrahlung induzierte bei allen untersuchten Zelllinien innerhalb von 6 h eine deutliche Steigerung der TP53-Levels. Dieser Effekt war am deutlichsten in den Zelllinien mit Wildtyp-TP53 (T1440, T1522 und U87MG). Typischerweise sank das TP53-Level in diesen Zelllinien innerhalb weniger Stunden stark, sodass das TP53 nach 24 h meist nur noch etwa die Hälfte des Levels nach 6 h erreichte. Die SLGC-Linien mit TP53-Mutation (hohe TP53-Basisexpression) wiesen hingegen eine weniger starke Erhöhung des TP53-Levels nach Bestrahlung auf, die zudem meist länger im Bereich des Maximalwertes blieb. Besonders deutlich war dies bei der TP53_{GOF}-Mutante T1495-R273H und der TP53_{missense}-Mutante T1442-N239D zu beobachten. Bei T1495-R273H handelt es sich um eine Kontaktmutante (Liu et al., 2010). Aus den bisher publizierten Daten kann abgeleitet werden, dass es sich bei T1442-N239D ebenfalls um eine Kontaktmutante handelt (Jia et al., 2012). Inwiefern TP53-N239D funktional ist, ist bislang unklar, vereinzelt wird sie jedoch als „*loss of function*“-Mutation beschrieben (Jordan et al., 2010). Bei der TP53_{GOF}-Mutante T1447-cl4-R248W handelt es sich um eine Kontaktmutante (Liu et al., 2010). Die TP53_{Spleiß}-Mutante T1452 wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben, ihre Funktionalität ist daher ebenfalls bislang unbekannt. Für die TP53_{GOF}-Mutante T1371-R175H, bei der es sich um eine Konformationsmutante handelt (Liu et al., 2010), wurde auch das TP53-Level 2 h nach Bestrahlung ermittelt, was aus organisatorischen Gründen für die anderen Zelllinien nicht möglich war. Die Analyse belegte hier, dass das maximale TP53-Level in T1371-R175H bereits nach 2 h erreicht wurde. Damit kann davon ausgegangen werden, dass es hierbei vor allem zu einer Stabilisierung des Proteins kam. Nach einem DNA-Schaden durch ionisierende Strahlung kommt es zu einer Phosphorylierung von TP53 an verschiedenen Aminosäureresten durch die Kinasen ATM, DNA-PK und Chk2 (Hock und Vousden, 2014; Shieh et al., 1997). Die Interaktion mit der E3 Ligase MDM2 wird gestört und es kommt zur Akkumulation von TP53 (Appella und Anderson, 2001; Shieh et al., 1997).

4.3 Induktion von Rad51 in SLGCs mit unterschiedlichem TP53-Status

Der Tumorsuppressor TP53 kann durch Binden an den Rad51-Promoter die Rad51-mRNA- und damit die Proteinexpression vermindern (Arias-Lopez et al., 2006). Damit ist er an der Regulierung der homologen Rekombination beteiligt (Arias-Lopez et al., 2006). Eine fehlerhafte Repression von Rad51 infolge von TP53-Mutationen könnte über eine gesteigerte Rad51-abhängige DNA-Reparatur zu einer erhöhten Therapieresistenz der betroffenen Zellen führen. Es wurden Hinweise darauf gewonnen, dass bestimmte TP53-Mutanten keine Repression von Rad51 ermöglichen. So ließ sich in Zellen mit der TP53-Kontaktmutante R280K eine fehlerhafte Unterdrückung der Rad51-mRNA- und Proteinexpression und der Rad51-Focibildung infolge von DNA-Doppelstrangbrüchen feststellen (Arias-Lopez et al., 2006).

Bei der Mehrheit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten primären GBM- und GSarc-Zelllinien konnte in SLGCs mit TP53-Mutation eine effizientere Induktion der Rad51-Expression nach Bestrahlung beobachtet werden als bei den SLGCs mit Wildtyp-TP53. Dies betraf T1371-R175H (2,9fach an Tag d1), T1495-R273H (2,7fach an Tag d1) und T1442-N239D (3,1fach nach 6 h). Weniger deutlich war der Effekt für die TP53-Spleiß-Mutante T1452 (1,8fach nach 6 h) und bei T1447-cl4-R248W betrug die Induktion der Rad51-Expression nach Bestrahlung maximal 1,2fach gegenüber von 1,2fach (T1522) und 1,5fach (T1440) bei den TP53_{WT}-SLGCs. Dieses Ergebnis könnte einerseits auf eine suffiziente Rad51-Suppression durch TP53-R248W hindeuten. Andererseits war das TP53-Proteinlevel bei T1447-cl4-R248W im unbehandelten Zustand gegenüber allen anderen untersuchten Zelllinien deutlich erhöht und wurde durch die Bestrahlung weiter gesteigert. Dieses stark erhöhte Proteinlevel könnte sich kompensatorisch auf eine eingeschränkte Rad51-Unterdrückung durch TP53-R248W auswirken. Um die Funktion von TP53-R248W in T1447-cl4 zu analysieren, wäre eine Untersuchung der für die Hyperstabilisierung des mutierten TP53 verantwortlichen Faktoren interessant. Hierbei könnte man beispielsweise HSP90 durch Gen-*Knockdown* oder eine pharmakologische Hemmung seiner Aktivität unterdrücken und so der starken Akkumulation von TP53-R248W in den Zellen entgegenwirken (Li et al., 2011).

In diesem Kontext könnte weiterhin wichtig sein, dass die Zelllinie T1447 aus einem Gliosarkom-Rezidiv angelegt wurde und sie, wie auch der davon abgeleitete Subklon T1447-cl4, nachweislich eine Deregulierung mehrerer Signalkaskaden und vielfache

Mutationen aufweist (Choschzick et al., 2014; Hirseland, 2017). Es wäre daher denkbar, dass außer TP53 weitere Proteine der DNA-Schadensantwort dereguliert sind.

Die etablierte GBM-Zelllinie U87MG, die einen TP53-Wildtyp aufweist, zeigte eine effiziente Rad51-Induktion, die deutlich stärker war als in den untersuchten TP53_{WT}-SLGC-Linien. Dies wurde auch durch die immunzytochemischen Untersuchungen bestätigt, auf die weiter unten eingegangen wird.

Die oben besprochenen Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass bestimmte TP53-Mutationen in SLGCs zu einer verminderten Repression von Rad51 führen könnten. Dies könnte wiederum die Regulation der homologen Rekombination beeinflussen und zu einer erhöhten Therapieresistenz der betroffenen Tumorzellen führen.

Für die effiziente Funktion von Rad51 in der homologen Rekombination sind weiterhin Rad51-Mediatoren wie die Paralogen Rad51C und XRCC3 bedeutsam (Sullivan und Bernstein, 2018). Obwohl diese schon sehr lange bekannt sind, ist ihre genaue Funktion in vielen Bereichen noch immer nicht geklärt (Sullivan und Bernstein, 2018). Zudem ist die Regulierung des Rad51-Promoters ein komplexer Vorgang, der von multiplen Faktoren beeinflusst wird und zu dem noch wenig bekannt ist (Hine et al., 2014). In einer Arbeit von Hasselbach und Kollegen wurde ein Cis-Element im Rad51-Promoter identifiziert, das die basale Expression erhöht, sowie zwei Cis-Elemente, die die Rad51-Expression limitieren (Hasselbach et al., 2005). Weitere Untersuchungen im Bereich der Rad51-Mediatoren sowie der Regulierung des Rad51-Promoters sind notwendig, um die Rolle von Rad51 in der Therapieresistenz von Zellen besser zu verstehen.

4.4 Die Bestrahlung von SLGCs führt zu einer Translokation von Rad51 in den Zellkern

Eine gesteigerte Rad51-Expression infolge von Bestrahlung, wie sie für die in dieser Arbeit untersuchten SLGCs nachgewiesen werden konnte, deutet auf eine gesteigerte Aktivität der Rad51-abhängigen homologen Rekombination in diesen Zellen nach Behandlung hin (Klein, 2008). Das zentrale Kriterium der Rad51-Aktivität ist jedoch die Lokalisation im Nukleus und die Bildung von Filamenten an den DNA-Läsionen (Gildemeister et al., 2009), die immunzytochemisch als intranukleäre Rad51-Foci erkennbar sind (Mladenov et al., 2006). Hierfür ist zunächst eine Translokation von Rad51 aus dem Zytoplasma in den Nukleus essenziell (Browning und Wise, 2017). Bei den in der

vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien konnte infolge der Bestrahlung eine Translokation von Rad51 in den Zellkern und eine Zunahme an intranukleären Rad51-Foci innerhalb von 24 h beobachtet werden. In allen untersuchten Zelllinien war jedoch über den untersuchten Zeitraum das Rad51-Signal im Zytoplasma stärker als im Kern. Die stärksten Rad51-Signale wurden in perinukleären Bereichen beobachtet. Da sich die Effizienz der Rad51-Translokation bei den verschiedenen Zelllinien unterschied, wird dieser Aspekt im nächsten Abschnitt genauer besprochen.

4.5 Intranukleäre Translokation von Rad51 in SLGCs mit unterschiedlichem TP53-Status

Zunächst ist anzumerken, dass entgegen der Western Blot Analyse, bei der die Zelllinien mit Bestrahlungsdosen entsprechend der ED_{50} Proliferation (Dorenberg, 2017) behandelt wurden, die *chamber slides* für die Analyse der Rad51-Translokation in allen Fällen mit 5 Gy bestrahlt wurden. Der Grund dafür war, dass auf kooperative Effekte zwischen Bestrahlung und Behandlung mit TMZ getestet werden sollte. Hierfür sind suboptimale Dosen besser geeignet. Allerdings wurden die TMZ-Dosen dem MGMT-Status der jeweiligen Zelllinie angepasst (siehe Angaben in Tab. 1).

Die SLGCs mit TP53-Mutation erreichten nach Bestrahlung etwas höhere Anteile an Rad51-positiven Zellkernen (59 – 65% bei T1371-R175H, T1447cl4-R248W, T1495-R273H und 71% bei T1442-N239D gegenüber von 49 – 51% für T1440 und T1522), wiesen jedoch mit Ausnahme von T1447-cl4 schon vor der Behandlung einen höheren Anteil an Rad51-positiven Kernen auf als die TP53_{WT}-SLGCs. Die Zeitkinetik (es wurden Werte nach 1, 2, 4, 8 und 24 h erhoben) zeigt, dass das Maximum an Rad51-positiven Zellkernen in fünf von sieben untersuchten Zelllinien nach 8 h erreicht wurde. Lediglich im Fall von T1371-R175H und T1447-cl4-R248W wurde der maximale Anteil an Rad51-positiven Zellkernen bereits nach 4 h ermittelt. Zwischen dem Maximum und dem Anteil an Rad51-positiven Zellkernen nach 24 h änderte sich bei den Mutanten, mit Ausnahme von T1495-R273H, nur wenig, während der Anteil an Rad51-positiven Zellkernen im Fall der Zelllinien mit TP53-Wildtyp deutlicher abnahm.

Die hier erhobenen Werte könnten somit auf eine Bedeutung von TP53-Mutationen für die intranukleäre Lokalisation von Rad51 hinweisen. Ein direkter Einfluss von TP53 auf den Vorgang der intranukleären Translokation von Rad51 wurde bisher nicht beschrieben.

Rad51-Monomere können frei zwischen Zytoplasma und Zellkern diffundieren, allerdings liegt ein großer Teil des Rad51 im Zytoplasma in Form von Oligomeren vor, denen der spontane Eintritt in den Zellkern nicht möglich ist. Für eine effiziente Translokation, wie sie im Rahmen einer DNA-Schadensantwort auftritt, benötigt das Rad51 daher ein Trägerprotein mit einem *nuclear localization signal* (NLS), das das Rad51 in den Zellkern transportiert (Jeyasekharan et al., 2013). Diese Funktion wurde für das Tumorsuppressorprotein BRCA2 beschrieben, das nicht nur die Bindung von Rad51 an ssDNA im Bereich eines DNA-Schadens kontrolliert (Jensen et al., 2010), sondern schon den vorangeschalteten Import von Rad51 aus dem Zytoplasma in den Zellkern steuert (Davies et al., 2001). Der Import wird hierbei nicht nur direkt durch die Bildung von BRCA2-Rad51-Komplexen, die die Kernmembran passieren können, gesteuert, sondern auch durch die Unterdrückung der Oligomerisierung von Rad51. Dadurch stehen Rad51-Monomere zur Bindung an diverse Transportproteine, die ebenfalls ein NLS tragen und mit Rad51 interagieren können, zur Verfügung (Jeyasekharan et al., 2013). Das Rad51-Paralog Rad51C, das während der homologen Rekombination für die Stabilisierung des Rad51-Nucleoproteinfilamentes zuständig ist (Amunugama et al., 2013), ist hierbei ein weiteres wichtiges Transportprotein für den nukleären Import von Rad51 (Gildemeister et al., 2009). Diese Funktion scheint Rad51C sogar zum Teil unabhängig von funktionellem BRCA2 und ohne vorangegangenen DNA-Schaden ausführen zu können, was die zum Teil erhöhten intranukleären Rad51-Level bei den unbehandelten Zelllinien mit TP53-Mutation erklären könnte (Gildemeister et al., 2009). Weder für BRCA2 noch für Rad51C wurde bisher ein Einfluss von TP53 auf die Expression oder die Funktionsweise beschrieben und damit auch nicht, welchen Einfluss eine eventuelle TP53-Mutation auf die intranukleäre Translokation von Rad51 haben könnte. Für das Tumorsuppressorprotein BRCA2 hingegen ist bekannt, dass die tumorassoziierte Missense-Mutation D2723H zu einer verminderten Translokation von Rad51 in den Zellkern führt (Jeyasekharan et al., 2013). Durch eine beeinträchtigte Bindung von DSS1 an BRCA2 wird hierbei ein *nuclear export signal* (NES) nur unzureichend maskiert, wodurch der nukleäre Import des Komplexes stark beeinträchtigt ist (Jeyasekharan et al., 2013). Um den möglichen Einfluss von TP53 oder anderen Faktoren auf die intranukleäre Translokation von Rad51 in SLGCs zu beurteilen, wäre es daher sinnvoll zu prüfen, ob gegebenenfalls Mutationen im BRCA2-Gen oder einem der Rad51-Paralogen vorliegen. Solche Mutationen könnten mittels Next-Generation-Sequencing bestimmt werden (Kamps et al., 2017).

4.6 Die zusätzliche TMZ-Behandlung kann die Induktion und intranukleäre Translokation von Rad51 beeinflussen

Bei der Therapie eines GBM wird nach erfolgter Resektion neben einer adjuvanten Bestrahlung des Tumorbetts zusätzlich eine begleitende Therapie mit TMZ eingeleitet, die nach Ende der Strahlentherapie für einige Zyklen weitergeführt wird, da diese kombinierte Radiochemotherapie ein signifikant erhöhtes Gesamtüberleben gegenüber der alleinigen Bestrahlung bewirkt (Stupp et al., 2009). Bobola und Kollegen konnten bei GBM-Zelllinien feststellen, dass der zytotoxische Effekt dieser Doppelbehandlung bestehend aus Bestrahlung und TMZ supraadditiv ist (Bobola et al., 2010). Bei dieser sogenannten Radiosensitivierung durch TMZ wird die tumorizide Wirkung fast ausschließlich über die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen vermittelt (Bobola et al., 2010).

Im Rahmen der Western Blot Analysen der vorliegenden Arbeit wurde die Kooperativität von Bestrahlung und TMZ exemplarisch an der SLGC-Linie T1495-R273H untersucht. Die hierbei eingesetzte Strahlendosis betrug 20 Gy, die Konzentration von TMZ 100 μ M. Es zeigte sich, dass 100 μ M TMZ das Rad51-Level steigern können (1,5fach), allerdings weniger effizient als 20 Gy (2,7fach), wobei in beiden Fällen die maximale Expressionssteigerung nach 24 h erreicht wurde. Nach der Doppelbehandlung mit 20 Gy und 100 μ M TMZ war das Rad51-Level nach 24 h auf das 12fache gesteigert, nach 6 h war bereits eine 4fache Steigerung feststellbar. Der Anstieg lag damit deutlich über dem additiven Effekt der Einzelbehandlungen. Dieser synergistische Effekt der Doppelbehandlung auf die Rad51-Induktion könnte darauf hindeuten, dass es auch in T1495-R273H zu einer Radiosensitivierung durch TMZ kam. Außerdem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Rad51-abhängige DNA-Reparatur eine wichtige Rolle bei der Schadensantwort von SLGCs nach Doppelbehandlung mit Bestrahlung und TMZ spielen könnte.

Hinsichtlich der Translokation von Rad51 in den Nukleus und der Bildung von intranukleären Rad51-Foci, die, wie bereits beschrieben, wichtige Kriterien für die Beschreibung der Rad51-Aktivität sind (Browning und Wise, 2017; Gildemeister et al., 2009; Mladenov et al., 2006), wurden in den immunocytochemischen Analysen für T1495-R273H keine synergistischen oder additiven Effekte von Bestrahlung und TMZ beobachtet. So waren 4 h nach der Doppelbehandlung 74% der Kerne Rad51-positiv, 8 h nach alleiniger Bestrahlung mit 20 Gy aber immerhin 65% und zu den restlichen Zeitpunkten waren die Unterschiede noch geringer.

Die in den Western Blots beobachtete, relativ zu den Einzelbehandlungen mehr als additive Zunahme der Rad51-Expression nach Doppelbehandlung könnte somit als eine Steigerung des zytoplasmatischen Rad51-Levels interpretiert werden. Allerdings ist es aufgrund des ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnisses in der immunocytochemischen Analyse möglich, dass hinsichtlich der Translokation ein additiver oder synergistischer Effekt existierte, dieser jedoch in den Präparaten nicht erkennbar war. Außerdem wurden die Zellen für die Western Blot Analysen mit 20 Gy bestrahlt, die Zellen für die immunocytochemischen Analysen hingegen nur mit 5 Gy. Entgegen des Konzeptes, synergistische Effekte mit geringeren Strahlendosen besser detektieren zu können, wäre es möglich, dass 5 Gy hier nicht ausgereicht haben, um additive oder synergistische Effekte von Bestrahlung und TMZ darzustellen. In diesem Kontext soll darauf hingewiesen werden, dass Patienten mit einem GBM eine fraktionierte Bestrahlung mit 60 Gy über 6 Wochen erhalten, bei der die Einzeldosis bei 1,8-2 Gy liegt (Mann et al., 2017). Auch die *in vitro* Untersuchungen zur Induktion der DNA-Schadensantwort an CD133-positiven bzw. CD133-negativen GBM-Zellen durch Bao und Kollegen erfolgten fast ausschließlich mit 2-5 Gy (Bao et al., 2006). Um die Responsivität der von Bao und Kollegen (2006) untersuchten GBM-Linien, über deren TP53-Status jedoch nichts bekannt ist, mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten vergleichen zu können, wurden die hier für die immunocytochemischen Analysen eingesetzten SLGC-Linien mit 5 Gy bestrahlt.

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Rad51 in SLGCs aus verschiedenen Patienten mit malignen Gliomen exprimiert wird und dass es nach Bestrahlung zu einer Steigerung der Rad51-Expression sowie zu einer Translokation von Rad51 in den Zellkern kommt. Diese Beobachtungen wurden als Anzeichen für eine gesteigerte Aktivität der Rad51-abhängigen DNA-Reparatur interpretiert und deuten darauf hin, dass die Rad51-abhängige DNA-Reparatur für die Therapieresistenz von SLGCs eine wichtige Rolle spielen könnte.

Aus den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die gezielte Hemmung von Rad51 eine lohnenswerte Strategie für die Entwicklung neuer GBM-Therapien sein könnte. Die Arbeiten von An und Kollegen zur Radiosensitivierung von Zervixkarzinomzellen könnten hierfür ein richtungsweisendes Beispiel sein (An et al.,

2016). So beschrieb diese Arbeitsgruppe, dass der PPAR γ -Inhibitor T007 eine Hemmung von Rad51 und der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination bewirkte, die in einem erhöhten Zellsterben resultierte (An et al., 2016). Ob ein solches Szenario für eine Verringerung des Überlebens von SLGCs funktionieren könnte, wäre ein experimenteller Ansatz zur Weiterführung der vorliegenden Arbeit.

Ein weiterer in dieser Arbeit untersuchter Aspekt betrifft den TP53-Status von SLGCs. 20-30% der primären GBMs und 60-70% der sekundären GBMs weisen eine TP53-Mutation auf, wodurch diese die häufigste molekulare Anomalität in GBMs überhaupt darstellt (England et al., 2013). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Expression von mutiertem GOF-TP53 in GBMs mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Zhang et al., 2018).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass bestimmte TP53-Mutationen in SLGCs zu einer fehlerhaften Repression von Rad51 führen könnten. Ein Eingriff in die Funktionsweise des mutierten TP53 zur Wiederherstellung der TP53-Wildtypfunktion könnte das Therapieansprechen von SLGCs verbessern. In verschiedenen Phase 1 Studien an malignen Gliomen wurde dieser Ansatz bereits verfolgt. Lang und Kollegen etwa transfizierten intaktes TP53 mittels Adenoviren in die Tumoren von 15 Patienten mit einem Gliomrezidiv (Lang et al., 2003). Bei allen Patienten konnten sie die Expression des funktionsfähigen exogenen TP53 nachweisen und eine Induktion der Apoptose bewirken (Lang et al., 2003). Ein weiterer Ansatz ist die Modifizierung der Wirkung von mutierten TP53-Proteinen mittels sogenannter *small molecules*, die in die Tumorzelle eingeschleust werden, die Faltung der Proteine beeinflussen und somit die Wildtypfunktion zumindest teilweise wiederherstellen (Stegh, 2012). Die Moleküle PRIMA-1, STIMA-1 und MIRA-3 gehören in diese Gruppe und können die Faltung der DNA-Bindungsdomäne des mutierten TP53 beeinflussen und so eine gesteigerte Induktion der Apoptose bewirken (Stegh, 2012). Als Fortführung dieser Arbeit wäre es möglich, SLGCs mit TP53-Mutation mit *small molecules* zu behandeln und danach ihre Fähigkeit zur Induktion von DNA-Reparatur und Apoptose zu untersuchen.

Seit einigen Jahren hat sich in der Therapie des GBM ein relativ festes Therapieschema aus Operation und Bestrahlung mit adjuvanter Chemotherapie etabliert (Stupp et al., 2005). Der individuelle Therapieweg orientiert sich dabei vor allem an etablierten Markern wie

MGMT und IDH (Louis et al., 2016; Olar und Aldape, 2014). Die individuelle, gezielte molekulare Therapie bei GBMs steht allerdings noch ganz am Anfang. Durch eine Fokussierung der Therapie auf die Eliminierung oder Differenzierung von SLGCs unter Einbezug molekularer Ansätze zur Modulation der DNA-Schadensantwort könnten möglicherweise in der Zukunft therapeutische Erfolge bei der Behandlung von malignen Gliomen erzielt werden.

5 Zusammenfassung

Die zentrale Schwierigkeit bei der Behandlung von Glioblastomen ist das Auftreten von therapieresistenten Tumorrezidiven, an denen die Patienten versterben und zu deren Entstehung stammzellähnliche Gliomzellen beitragen. Neben der Fähigkeit, die Tumorprogression auf vielfältige Art und Weise zu fördern, zeichnen sich stammzellähnliche Gliomzellen durch ihre Therapieresistenz aus. Als ein möglicher Mechanismus für diese Therapieresistenz wird eine erhöhte Kapazität zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen angenommen. Hieran könnte Rad51 als Schlüsselprotein der homologen Rekombination beteiligt sein. In der Literatur wurde beschrieben, dass Rad51 in der Mehrzahl maligner humaner Tumoren überexprimiert ist, über die Expression von Rad51 in stammzellähnlichen Gliomzellen aus Glioblastomen und Gliosarkomen ist jedoch nichts bekannt. Die vorliegende Studie befasst sich mit der Frage, ob Rad51 für die Resistenz von stammzellähnlichen Gliomzellen gegenüber Bestrahlung eine Rolle spielt.

Mittels Western Blot und immunocytochemischer Analysen wurden die Expression und die subzelluläre Lokalisation von Rad51 in stammzellähnlichen Gliomzellen aus verschiedenen Patienten mit malignen Gliomen untersucht und analysiert, ob es durch Bestrahlung der stammzellähnlichen Gliomzellen zu einer gesteigerten Expression und zu einer veränderten subzellulären Lokalisation von Rad51 kommt.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Rad51 in stammzellähnlichen Gliomzellen aus verschiedenen Patienten mit malignen Gliomen exprimiert wird. Nach Bestrahlung wurden eine Steigerung der Rad51-Expression sowie eine Translokation von Rad51 in den Zellkern beobachtet. Diese beiden Beobachtungen wurden als Anzeichen für eine gesteigerte Aktivität der Rad51-abhängigen DNA-Reparatur gedeutet. Das Ausmaß von Induktion und intranukleärer Translokation von Rad51 unterschied sich bei den verschiedenen stammzellähnlichen Gliomzellen mit unterschiedlichem Mutationsstatus des Tumorsuppressors TP53. Die zusätzliche Behandlung mit dem alkylierenden Zytostatikum Temozolomid konnte die Rad51-Induktion verstärken und die intranukleäre Translokation von Rad51 fördern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Rad51-abhängige DNA-Reparatur für die Therapieresistenz von stammzellähnlichen Gliomzellen eine wichtige Rolle spielen könnte.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Internationale Journale und Bücher

Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, Jackson EL, Yanjiao L, Burns DK, Alvarez-Buylla A, Parada LF (2009) Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell* 15, 45-56

Amunugama R, Groden J, Fishel R (2013) The HsRAD51B-HsRAD51C stabilizes the HsRAD51 nucleoprotein filament. *DNA Repair* 12, 723-732

An Z, Yu JR, Park WY (2016) T0070907 inhibits repair of radiation-induced DNA damage by targeting RAD51. *Toxicol In Vitro* 37, 1-8

Appella E, Anderson CW (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 268, 2764-2772

Arias-Lopez C, Lazaro-Trueba I, Kerr P, Lord CJ, Dexter T, Iravani M, Ashworth A, Silva A (2006) p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep* 7, 219-224

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

Barlow JH, Lisby M, Rothstein R (2008) Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1. *Mol Cell* 30, 73-85

Bernstein KA, Rothstein R (2009) At loose ends: Resecting a double-strand break. *Cell* 137, 807-810

Bertrand P, Saintigny Y, Lopez BS (2004) p53's double life: transactivation-independent repression of homologous recombination. *Trends Genet* 20, 235-243

Bieging KT, Mello SS, Attardi LD (2014) Unravelling mechanisms of p53-mediated tumor suppression. *Nat Rev Cancer* 14, 359-370

Billant O, Léon A, Le Guellec S, Friocourt G, Blondel M, Voisset C (2016) The dominant-negative interplay between p53, p63 and p73: A family affair. *Oncotarget* 7, 69549-69564

Bobola MS, Kolstoe DD, Blank A, Silber JR (2010) Minimally cytotoxic doses of temozolomide produce radiosensitization in human glioblastoma cells regardless of MGMT expression. *Mol Cancer Ther* 9, 1208-1218

Bohgaki T, Bohgaki M, Hakem R (2010) DNA double-strand break signaling and human disorders. *Genome Integr* 1, e15

Brown JP, Wie W, Sedivy JM (1997) Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277, 831-834

Browning CL, Wise JP Sr (2017) Prolonged exposure to particulate chromate inhibits RAD51 nuclear import mediator proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 331, 101-107

Chen J (2016) The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a026104

Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS, Modrusan Z, Nacu S, Guerrero S, Edgar KA, Wallin JJ, Lamszus K, Westphal M, Heim S, James CD, Vandenberg SR, Costello JF, Moorefield S, Cowdrey CJ, Prados M, Phillips HS (2010) A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 17, 362-375

Cheng L, Wu Q, Guryanova OA, Huang Z, Huang Q, Rich JN, Bao S (2011) Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 406, 643-648

Cho SY, Park C, Na D, Han JY, Lee J, Park OK, Zhang C, Sung CO, Moon HE, Kim Y, Kim JH, Kim JJ, Khang SK, Nam DH, Choi JW, Suh YL, Kim DG, Park SH, Youn H,

Yun K, Kim JI, Lee C, Paek SH, Park H (2017) High prevalence of TP53 mutations is associated with poor survival and an EMT signature in gliosarcoma patients. *Exp Mol Med* 49, e317

Choschzick I, Hirsland E, Cramer H, Schultz S, Leppert J, Tronnier V, 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

Clarke J, Butowski N, Chang S (2010) Recent advances in therapy for glioblastoma. *Arch Neurol* 67, 279-283

Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, West SC (2001) Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* 7, 273-282

England B, Huang T, Karsy M (2013) Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumour Biol* 34, 2063-2074

Freed-Pastor WA, Prives C (2012) Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev* 26, 1268-1286

Frum RA, Love IM, Damle P, Mukhopadhyay ND, Deb SP, Deb S, Grossman SR (2016) Constitutive activation of DNA damage checkpoint signaling contributes to mutant p53 accumulation via modulation of p53 ubiquitination. *Mol Cancer Res* 14, 423-436

Gildemeister OS, Sage JM, Knight KL (2009) Cellular redistribution of Rad51 in response to DNA damage: Novel role for Rad51C. *J Biol Chem* 284, 31945-31952.

Godin SK, Sullivan MR, Bernstein KA (2016) Novel insights into RAD51 activity and regulation during homologous recombination and DNA replication. *Biochem Cell Biol* 94, 407-418

Green MR, Sambrook J (2012) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 4. Auflage; Kapitel 2, 7, 19; 81, 455, 1481. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Hadjipanayis CG, Van Meir EG (2009) Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy. *J Mol Med* 87, 363-374

Hasselbach L, Haase S, Fischer D, Kolberg HC, Stürzbecher HW (2005) Characterisation of the promoter region of the human DNA-repair gene Rad51. *Eur J Gynaecol Oncol* 26, 589-598

Hine CM, Li H, Xie L, Mao Z, Seluanov A, Gorbunova V (2014) Regulation of Rad51 promoter. *Cell Cycle* 13, 2038-2045

Hock AK, Vousden KH (2014) The role of ubiquitin modification in the regulation of p53. *Biochim Biophys Acta* 1843, 137-149

Ito M, Ohba S, Gaensler K, Ronen SM, Mukherjee J, Pieper RO (2013) Early Chk1 phosphorylation is driven by temozolomide-induced, DNA double strand break- and mismatch repair-independent DNA damage. *PLoS One* 8, e62351

Jensen RB, Carreira A, Kowalczykowski SC (2010) Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* 467, 678-683

Jeyasekharan AD, Liu Y, Hattori H, Pisupati V, Jonsdottir AB, Rajendra E, Lee M, Sundaramoorthy E, Schlachter S, Kaminski C, Ofir-Rosenfeld Y, Sato K, Savill J, Ayoub N, Venkitaraman AR (2013) A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization. *Nat Struct Mol Biol* 20, 1191-1198

Jia S, Zhao L, Tang W, Luo Y (2012) The Gain of Function of p53 Mutant p53S in Promoting Tumorigenesis by Cross-talking with H-RasV12. *Int J Biol Sci* 8, 596-605

Johnson BE, Mazor T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, Fouse SD, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Asthana S, Jalbert LE, Nelson SJ, Bollen AW, Gustafson WC, Charron E, Weiss WA, Smirnov IV, Song JS, Olshen AB, Cha S, Zhao Y, Moore RA, Mungall AJ, Jones SJM, Hirst M, Marra MA, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger

MS, Chang SM, Taylor BS, Costello JF (2014) Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science* 343, 189–193

Jordan JJ, Inga A, Conway K, Edmiston S, Carey LA, Wu L, Resnick MA (2010) Altered-function p53 missense mutations indentified in breast cancers can have subtle effects on transactivation. *Mol Cancer Res* 8, 701-716

Kamps R, Brandão RD, van den Bosch BJ, Paulussen ADC, Xanthoulea S, Blok MJ, Romano A (2017) Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci* 18, e308

Kastan MB, Bartek J (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323

Kearns S, Lurz R, Orlova EV, Okorokov AL (2016) Two p53 tetramers bind one consensus DNA response element. *Nucleic Acids Res* 44, 6185-6199

Kendig RD, Kai F, Fry EA, Inoue K (2017) Stabilization of the p53-DNA complex by the nuclear protein Dmp1 α . *Cancer Invest* 35, 301-312

Kim H, Zheng S, Amini SS, Virk SM, Mikkelsen T, Brat DJ, Grimsby J, Sougnez C, Muller F, Hu J, Sloan AE, Cohen ML, Van Meir EG, Scarpace L, Laird PW, Weinstein JN, Lander ES, Gabriel S, Getz G, Meyerson M, Chin L, Barnholtz-Sloan JS, Verhaak RGW (2015) Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome Res* 25, 316-327

King HO, Brend T, Payne HL, Wright A, Ward TA, Patel K, Egnuni T, Stead LF, Patel A, Wurdak H, Short SC (2017) RAD51 is a selective DNA repair target to radiosensitize glioma stem cells. *Stem Cell Reports* 8, 125-139

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

Klein HL (2008) The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair* 7, 686-693

- Lang FF, Bruner JM, Fuller GN, Aldape K, Prados MD, Chang S, Berger MS, McDermott MW, Kunwar SM, Junck LR, Chandler W, Zwiebel JA, Kaplan RS, Yung WK (2003) Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results. *J Clin Oncol* 21, 2508-2518
- Li D, Marchenko ND, Schulz R, Fischer V, Velasco-Hernandez T, Talos F, Moll UM (2011) Functional inactivation of endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 causes aberrant stabilization of mutant p53 in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 9, 577-588
- Liu DP, Song H, Xu Y (2010) A common Gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene* 29, 949-956
- Liu J, Zhang C, Feng Z (2014) Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta Biochim Biophys Sin* 46, 170-179
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016) The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathol* 131, 803-820
- Makharashvili N, Paull TT (2015) CtIP: A DNA damage response protein at the intersection of DNA metabolism. *DNA Repair* 32, 75-81
- Mann J, Ramakrishna R, Magge R, Wernicke AG (2017) Advances in Radiotherapy for Glioblastoma. *Front Neurol* 8, e748
- Mladenov E, Anachkova B, Tsaneva I (2006) Sub-nuclear localization of Rad51 in response to DNA damage. *Genes Cells* 11, 513-524
- Muller PAJ, Vousden KH (2014) Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 25, 304-317

Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, Hamada J (2011) Aberrant signaling pathways in glioma. *Cancers* 3, 3242-3278

Nandeesh BN, Naskar S, Shashtri AH, Arivazhagan A, Santosh V (2018) Recurrent glioblastomas exhibit higher expression of biomarkers with stem-like properties. *J Neurosci Rural Pract* 9, 86-91

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

Oberle C, Blattner C (2010) Regulation of the DNA damage response to DSBs by post-translational modifications. *Curr Genomics* 11, 184-198

Ohgaki H, Kleihues P (2005) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 479-489

Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19, 764-772

Olar A, Aldape KD (2014) Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol* 232, 165-177

Oren M, Rotter V (2010) Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001107

Osuka S, Van Meir EG (2017) Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest* 127, 415-426

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (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

Poyurovsky MV, Prives C (2006) Unleashing the power of p53: lessons from mice and men. *Genes Dev* 20, 125-131

Raju EN, Kuechler J, Behling S, Sridhar S, Hirseland E, Tronnier V, Zechel C (2015) Maintenance of stemlike glioma cells and microglia in an organotopic glioma slice model. *Neurosurgery* 77, 629-643

Ramalho-Carvalho J, Henrique R, Jerónimo C (2018) Methylation-Specific PCR. *Methods Mol Biol* 1708, 447-472

Santivasi WL, Xia F (2014) Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxid Redox Signal* 21, 251-259

Schild D, Wiese C (2010) Overexpression of RAD51 suppresses recombination defects: a possible mechanism to reverse genomic instability. *Nucleic Acids Res* 38, 1061-1070

Shah GA, O'Shea CC (2015) Viral and cellular genomes activate distinct DNA damage responses. *Cell* 162, 987-1002

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334

Stegh AH (2012) Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy - The promises, challenges, and perils. *Expert Opin Ther Targets* 16, 67-83

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

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D,

Cairncross JG, Mirimanoff RO (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10, 459-466

Sullivan MR, Bernstein KA (2018) RAD-ical New Insights into RAD51 Regulation. *Genes* 9, e629

Taylor WR, Stark GR (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815

Terzian T, Suh YA, Iwakuma T, Post SM, Neumann M, Lang GA, Van Pelt CS, Lozano G (2008) The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16^{INK4a} loss. *Genes Dev* 22, 1337-1344

Vijayakumaran R, Tan KH, Miranda PJ, Haupt S, Haupt Y (2015) Regulation of mutant p53 protein expression. *Front Oncol* 5, e284

Villalva C, Cortes U, Wagner M, Tourani JM, Rivet P, Marquant C, Martin S, Turhan AG, Karayan-Tapon L (2012) O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) promoter methylation status in glioma stem-like cells is correlated to temozolomide sensitivity under differentiation-promoting conditions. *Int J Mol Sci* 13, 6983-6994

Wainwright D, Nigam P, Thaci B, Dey M, Lesniak MS (2012) Recent developments on immunotherapy for brain cancer. *Expert Opin Emerg Drugs* 17, 181-202

Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6, 217-223

Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schübeler D (2005) Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 37, 853-862

Welinder C, Ekblad L (2011) Coomassie staining as loading control in western blot analysis. *J Proteome Res* 10, 1416-1419

Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359, 492-507

Williams AB, Schumacher B (2016) p53 in the DNA damage repair process. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a026070

Wilson JH, Elledge SJ (2002) BRCA2 enters the fray. *Science* 297, 1822-1823

Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH (2014) Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int* 5, e64

Xie Y, Bergström T, Jiang Y, Johansson P, Marinescu VD, Lindberg N, Segerman A, Wicher G, Niklasson M, Baskaran S, Sreedharan S, Everlien I, Kastemar M, Hermansson A, Elfineh L, Libard S, Holland EC, Hesselager G, Alafuzoff I, Westermark B, Nelander S, Forsberg-Nilsson K, Uhrbom L (2015) The human glioblastoma cell culture resource: Validated cell models representing all molecular subtypes. *EBioMedicine* 2, 1351-1363

Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD (2012) Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol* 5, 102-114

Zhang Y, Dube C, Gibert M Jr, Cruickshanks N, Wang B, Coughlan M, Yang Y, Setiady I, Deveau C, Saoud K, Grello C, Oxford M, Yuan F, Abounader R (2018) The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers* 10, e297

6.2 Zitierte Dissertationen der Arbeitsgruppe

Dahlke M (2018) Radio- und Chemosensitivität stammzellähnlicher Gliomzellen und Aspekte der strahleninduzierten DNA-Schadensantwort. Med. Diss. Lübeck

Dorenberg AM (2017) In vitro Effekt ionisierender Strahlung auf die Proliferation und Vitalität von Stammzell-ähnlichen Gliomzellen in Abhängigkeit von der adjuvanten Behandlung mit Temozolomid. Med. Diss. Lübeck

Hirsland E (2017) Zelluläre und molekulare Heterogenität stammzellähnlicher Gliomzellen und Bedeutung für die Therapiesensibilität. Naturwiss. Diss. Lübeck

Limpert AM (2018) Effekte von Chloroquin auf stammzellähnliche Gliomzellen aus Glioblastomen und Gliosarkomen in An- und Abwesenheit von Temozolomid. Med. Diss. Lübeck

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zelluläre Hierarchie von stammzellähnlichen Gliomzellen in GBMs	5
Abbildung 2: Homologe Rekombination	9
Abbildung 3: Bedeutung des Tumorsuppressors TP53 für die DNA-Schadensantwort nach Bestrahlung	12
Abbildung 4: Relative Expression von Rad51 und TP53 in U87MG und SLGC-Linien ...	30
Abbildung 5: Relative Expression von Rad51 und TP53 in der Zelllinie T1440 nach Bestrahlung mit 25 Gy	31
Abbildung 6: Relative Expression von Rad51 und TP53 in der Zelllinie T1522 nach Bestrahlung mit 10 Gy	32
Abbildung 7: Relative Expression von Rad51 und TP53 in der Zelllinie U87MG nach Bestrahlung mit 25 Gy	33
Abbildung 8: Relative Expression von Rad51 und TP53 R175H in der Zelllinie T1371 nach Bestrahlung mit 20 Gy.....	34
Abbildung 9: Relative Expression von Rad51 und TP53 R248W in der Zelllinie T1447-cl4 nach Bestrahlung mit 20 Gy	35
Abbildung 10: Relative Expression von Rad51 und TP53 R273H in der Zelllinie T1495 nach Bestrahlung mit 20 Gy.....	36
Abbildung 11: Relative Expression von Rad51 und TP53 N239D in der Zelllinie T1442 nach Bestrahlung mit 20 Gy.....	37
Abbildung 12: Relative Expression von Rad51 und TP53 in der Zelllinie T1452 nach Bestrahlung mit 25 Gy	38
Abbildung 13: Graphische Darstellung der relativen Expression von Rad51 und TP53 R273H in der Zelllinie T1495 nach Behandlung mit 20 Gy, mit 100 µM TMZ und mit 20 Gy und 100 µM TMZ.....	40
Abbildung 14: Western Blots von Rad51 und TP53 R273H in der Zelllinie T1495 nach Behandlung mit 20 Gy, mit 100 µM TMZ und mit 20 Gy und 100 µM TMZ	41
Abbildung 15: Exemplarische immuncytochemische Analyse mit dem Rad51-Antikörper.....	43
Abbildung 16: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der Zelllinie U87MG nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 µM TMZ	44

Abbildung 17: Veränderung des Anteils Rad51-postiver Zellkerne zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 5 Gy und Doppelbehandlung mit 5 Gy und TMZ in den TP53 _{WT} -Linien T1440, T1522 und U87MG	46
Abbildung 18: Veränderung des Anteils Rad51-postiver Zellkerne zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 5 Gy und Doppelbehandlung mit 5 Gy und TMZ in den TP53 _{GOF} -Linien T1371, T1447-cl4 und T1495.....	47
Abbildung 19: Veränderung des Anteils Rad51-postiver Zellkerne zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 5 Gy und Doppelbehandlung mit 5 Gy und TMZ in der TP53 _{missense} -Linie T1442	48
Abbildung 20: Relative Expression von Rad51 und TP53 R273H in der Zelllinie T1495 nach Behandlung mit 1% DMSO.....	77
Abbildung 21: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der TP53 _{WT} -Linie T1440 nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 25 µM TMZ	78
Abbildung 22: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der TP53 _{WT} -Linie T1522 nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 µM TMZ	79
Abbildung 23: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der TP53 _{GOF} -Linie T1371 nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 200 µM TMZ	80
Abbildung 24: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der TP53 _{GOF} -Linie T1447-cl4 nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 50 µM TMZ	81
Abbildung 25: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der TP53 _{GOF} -Linie T1495 nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 µM TMZ	82
Abbildung 26: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der TP53 _{missense} -Linie T1442 nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 µM TMZ	83
Abbildung 27: Positiv- und Negativkontrolle für die immuncytochemische Färbung unbehandelter U87MG-Zellen mit dem Rad51-Antikörper (αRad51, mo, ab1837; Tab. 10).....	84

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien	16
Tabelle 2: Zellkulturmedien	17
Tabelle 3: (Bio)Chemikalien und Wachstumsfaktoren	17
Tabelle 4: Puffer und Lösungen	18
Tabelle 5: Verbrauchsmaterial.....	20
Tabelle 6: Geräte und Hilfsmittel	20
Tabelle 7: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele	24
Tabelle 8: Primärantikörper Western Blot.....	25
Tabelle 9: Sekundärantikörper Western Blot	26
Tabelle 10: Primär- und Sekundärantikörper Immuncytochemie	27
Tabelle 11: Induktion der Proteinexpressionen nach Bestrahlung bei den untersuchten Zelllinien (vereinfachte schematische Darstellung der Expression bis einschließlich Tag d2)	77

9 Anhang

Tabelle 11: Induktion der Proteinexpressionen nach Bestrahlung bei den untersuchten Zelllinien (vereinfachte schematische Darstellung der Expression bis einschließlich Tag d2)

Zelllinie	TP53-Status	RT	Rad51-Expression	TP53-Expression
T1440	WT	25 Gy	(+) ↗ ↘	(-) ↑↑ ↘
T1522	WT	10 Gy	(+) ~	(+) ↑↑ ↘
U87MG	WT	25 Gy	(-) ↗ ↘	(-) ↑↑ ↘
T1371	R175H	20 Gy	+ ↑ ~	+ ↑ ↘
T1447-cl4	R248W	20 Gy	(+) ~	++ ↗ ↘
T1495	R273H	20 Gy	+ ↑ ↘	+ ↑↑ →
T1442	N239D	20 Gy	+ ↑ ↘	++ ↗ →
T1452	Spleiß	25 Gy	+ ↗ ↘	++ ~

Alle Angaben beziehen sich auf das Basislevel in den Kontrollen. Es wurden die Veränderungen bis einschließlich Tag d2 erfasst. RT: Bestrahlung; Basislevel der Expressionen: (-): nicht nachweisbar, (+): schwach, +: deutlich, ++: stark, ++: sehr stark; ↗: moderater Anstieg, ↑: deutlicher Anstieg, ↑↑: starker Anstieg, ↘: moderate Senkung, →: gleichbleibend, ~: leicht variabel. SLGCs: n = 2 x 2; U87MG: n = 3 x 3.

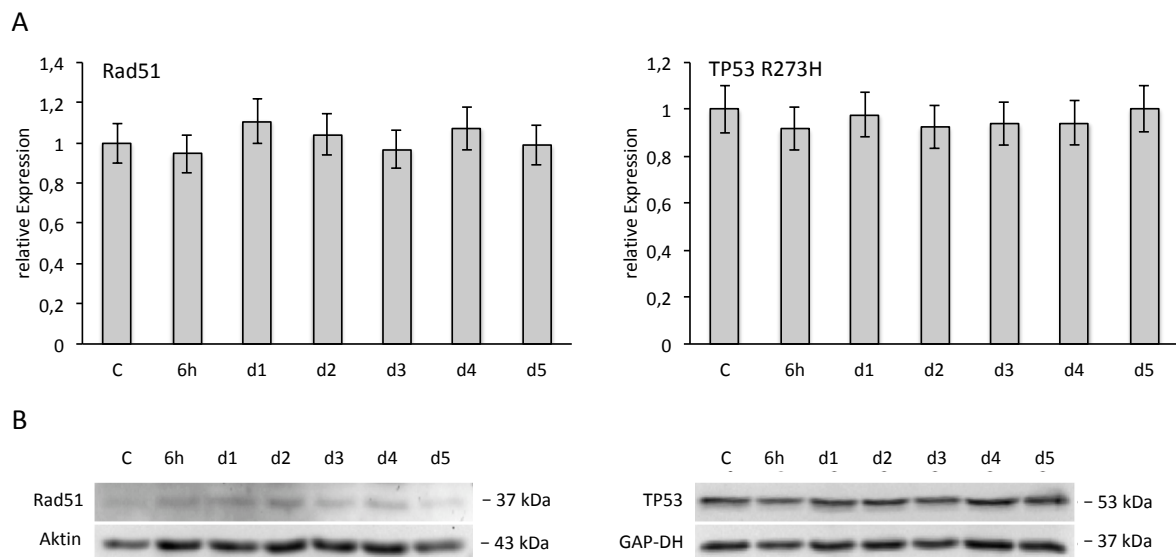


Abbildung 20: Relative Expression von Rad51 und TP53 R273H in der Zelllinie T1495 nach Behandlung mit 1% DMSO. (A) Graphische Darstellung der relativen Expression von Rad51 normalisiert gegen die Ladekontrolle Aktin und TP53 R273H normalisiert gegen die Ladekontrolle GAP-DH. Der systematische Fehler von 10% ist angegeben. (B) Chemilumineszenz-Aufnahmen der untersuchten Proteine. C: Kontrolle. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für die Daten von zwei biologischen Replikaten mit je zwei identisch durchgeführten technischen Replikaten (n = 2 x 2).

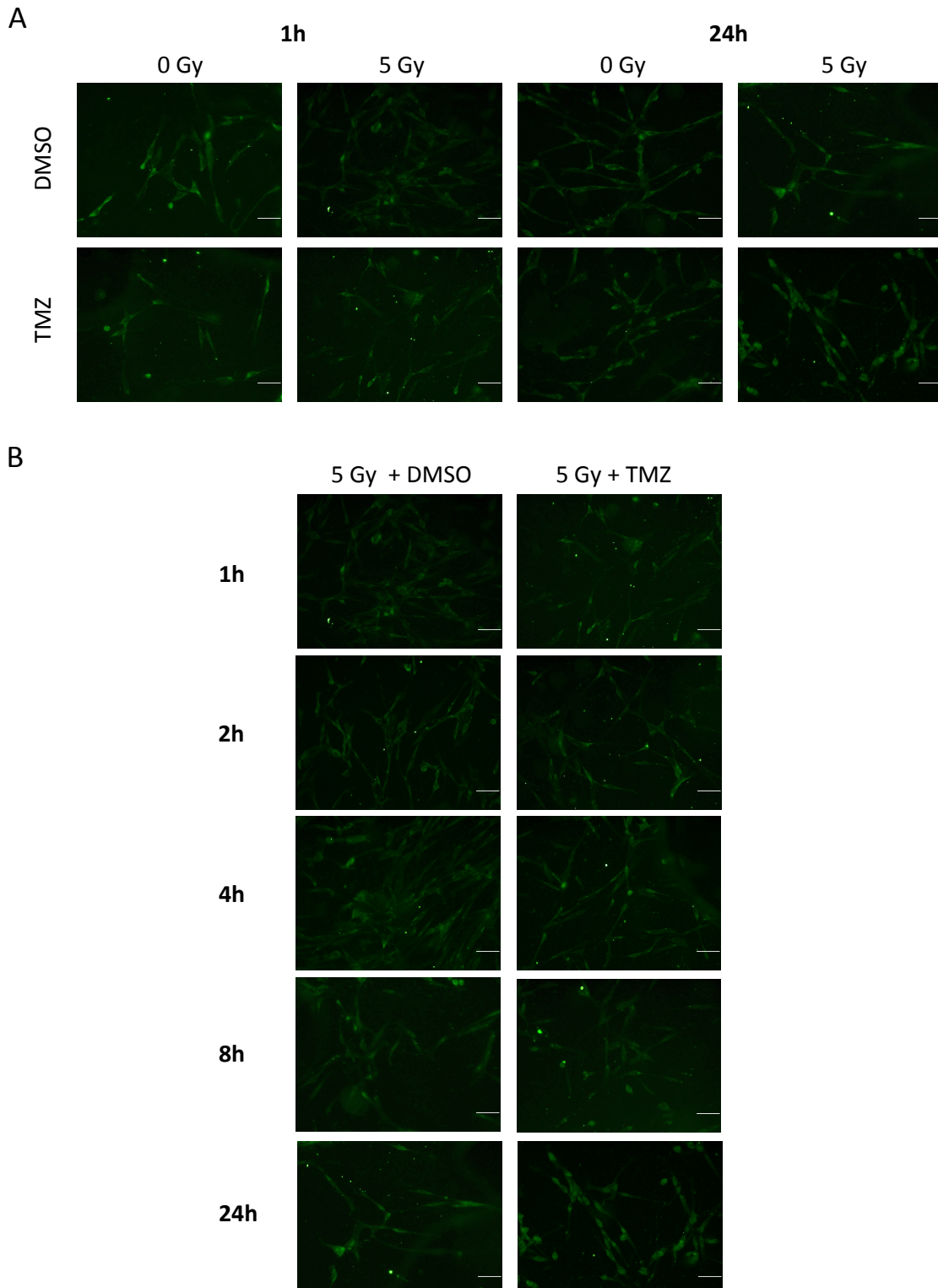


Abbildung 21: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der TP53_{WT}-Linie T1440 nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 25 µM TMZ. Die Mikrofotografien zeigen die immuncytochemische Färbung mit der Antikörperkombination αRad51/DyLight®. (A) Direkter Vergleich von Proben 1 h und 24 h nach Beginn der Analyse. (B) Bestrahlte und doppelbehandelte Kulturen im zeitlichen Verlauf. DMSO: Behandlung mit DMSO; TMZ: Behandlung mit 25 µM Temozolomid; 5 Gy: Bestrahlung mit 5 Gy. Messbalken 50 µm. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für zwei identisch durchgeführte immuncytochemische Analysen (n = 2).

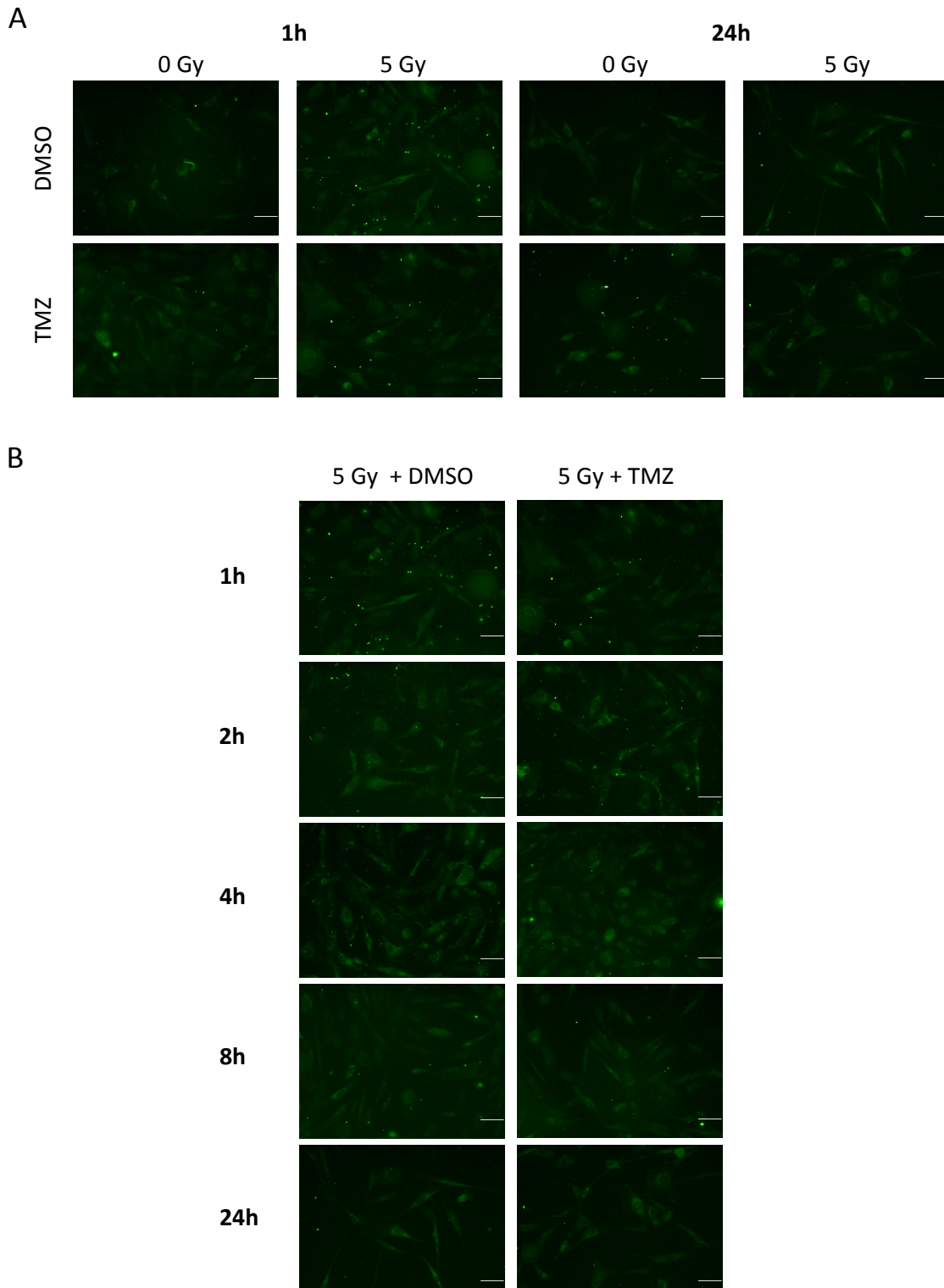


Abbildung 22: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der TP53_{WT}-Linie T1522 nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 µM TMZ. Die Mikrofotografien zeigen die immuncytochemische Färbung mit der Antikörperkombination αRad51/DyLight®. (A) Direkter Vergleich von Proben 1 h und 24 h nach Beginn der Analyse. (B) Bestrahlte und doppelbehandelte Kulturen im zeitlichen Verlauf. DMSO: Behandlung mit DMSO; TMZ: Behandlung mit 100 µM Temozolomid; 5 Gy: Bestrahlung mit 5 Gy. Messbalken 50 µm. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für zwei identisch durchgeführte immuncytochemische Analysen (n = 2).

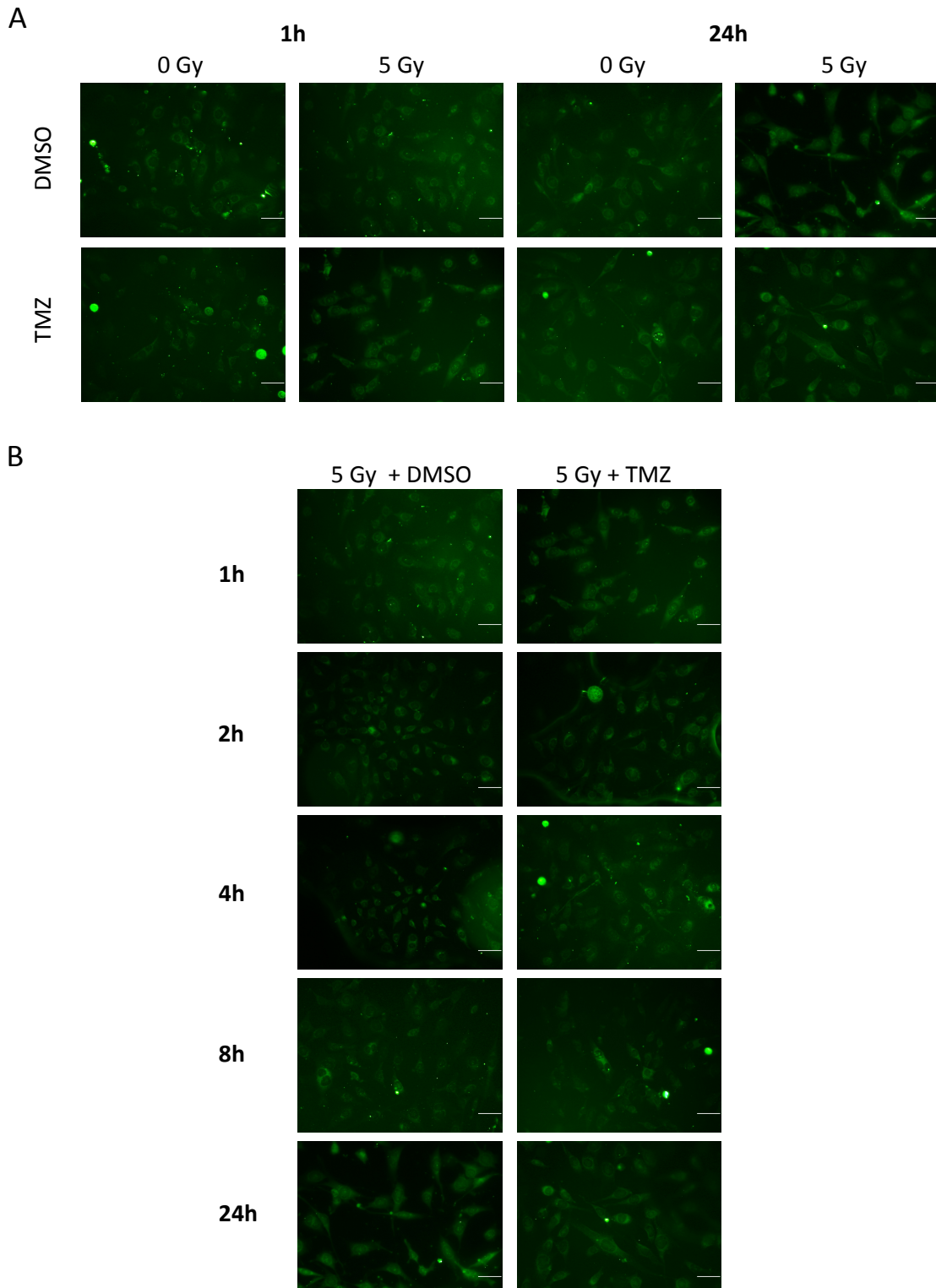


Abbildung 23: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der TP53^{GOF}-Linie T1371 nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 200 μ M TMZ. Die Mikrofotografien zeigen die immuncytochemische Färbung mit der Antikörperkombination α Rad51/DyLight[®]. (A) Direkter Vergleich von Proben 1 h und 24 h nach Beginn der Analyse. (B) Bestrahlte und doppelbehandelte Kulturen im zeitlichen Verlauf. DMSO: Behandlung mit DMSO; TMZ: Behandlung mit 200 μ M Temozolomid; 5 Gy: Bestrahlung mit 5 Gy. Messbalken 50 μ m. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für zwei identisch durchgeführte immuncytochemische Analysen (n = 2).

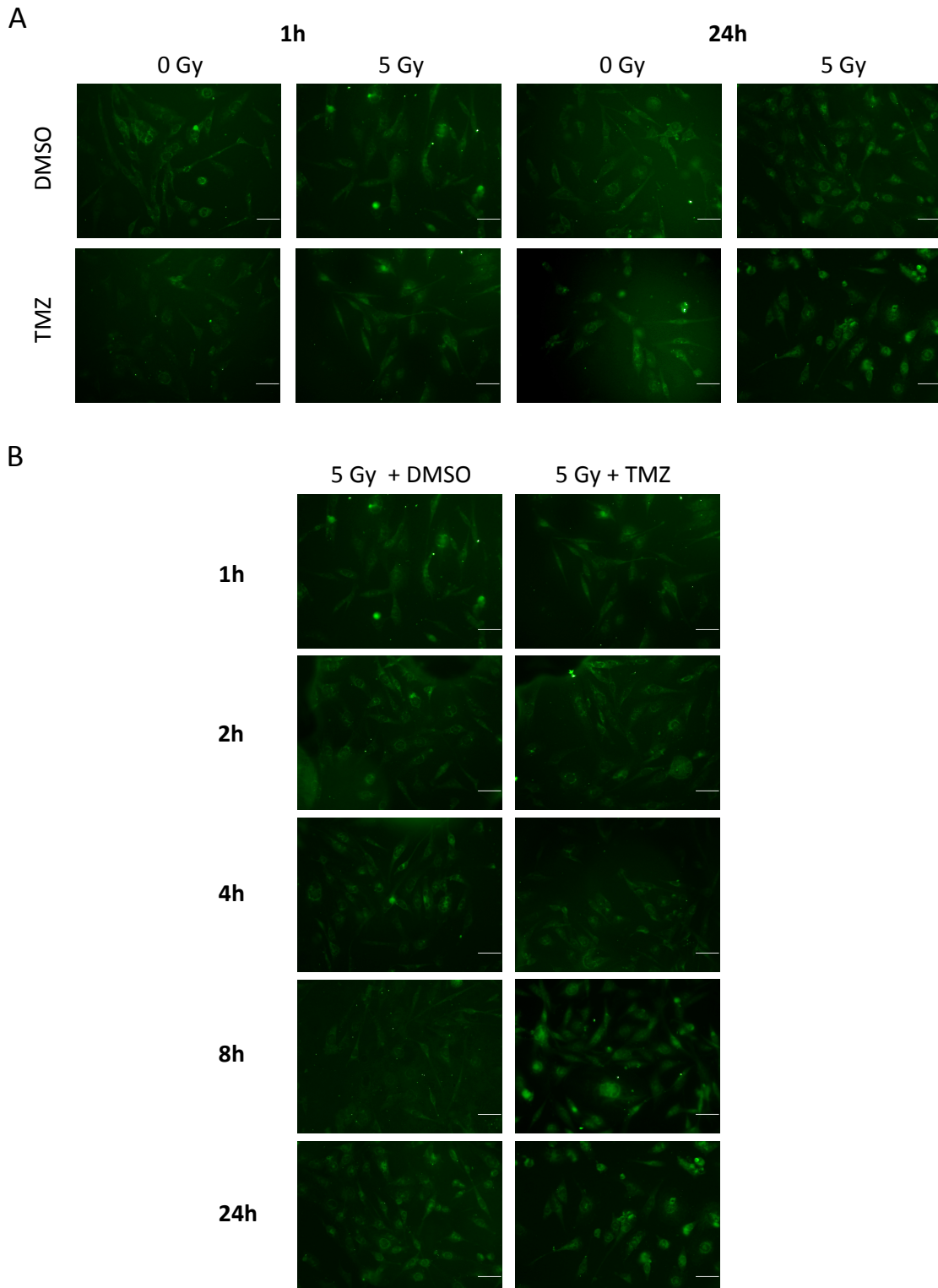


Abbildung 24: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der TP53_{GOF}-Linie T1447-cl4 nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 50 µM TMZ. Die Mikrofotografien zeigen die immuncytochemische Färbung mit der Antikörperkombination αRad51/DyLight®. (A) Direkter Vergleich von Proben 1 h und 24 h nach Beginn der Analyse. (B) Bestrahlte und doppelbehandelte Kulturen im zeitlichen Verlauf. DMSO: Behandlung mit DMSO; TMZ: Behandlung mit 50 µM Temozolomid; 5 Gy: Bestrahlung mit 5 Gy. Messbalken 50 µm. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für zwei identisch durchgeführte immuncytochemische Analysen (n = 2).

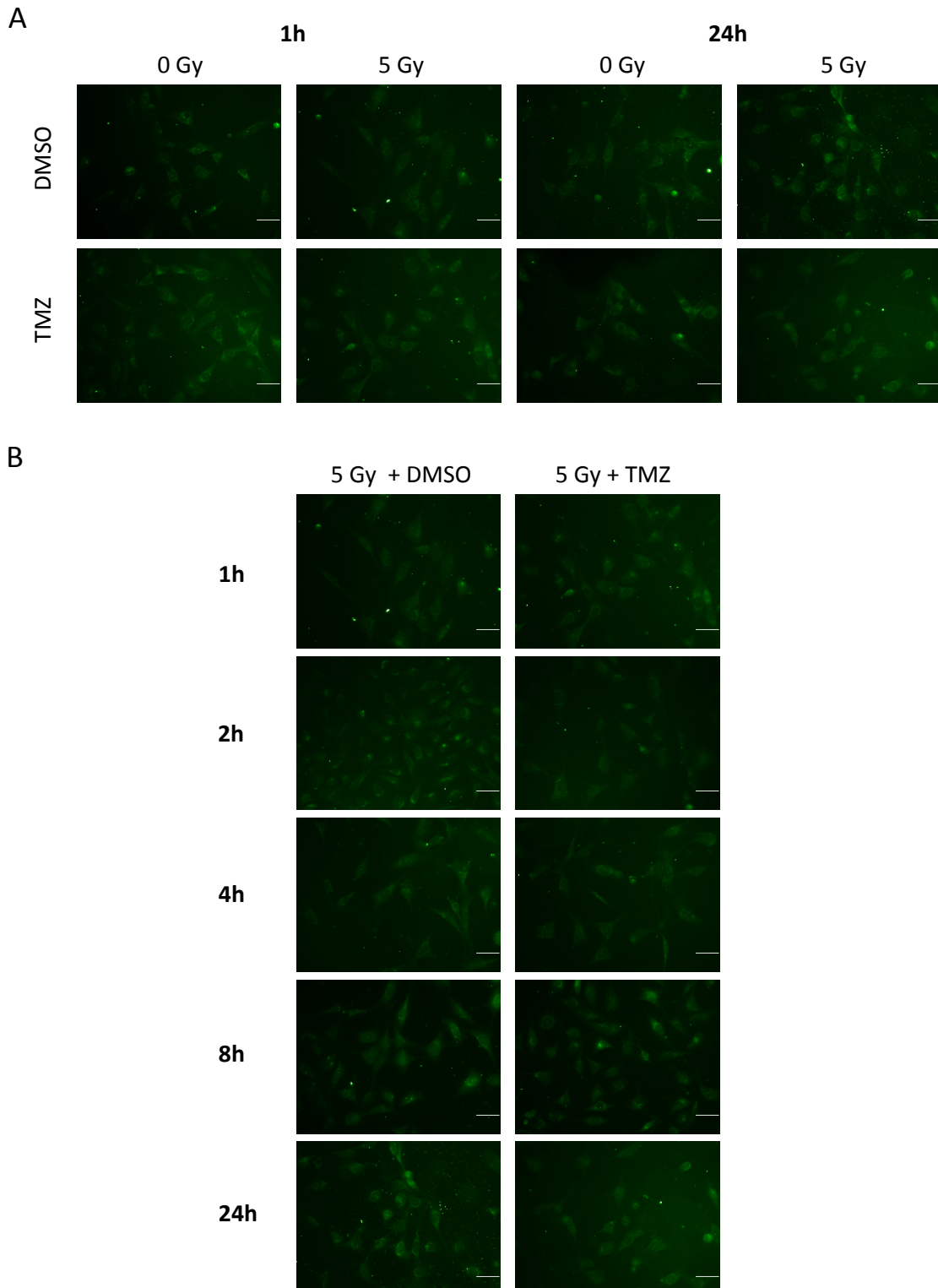


Abbildung 25: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der TP53_{GOF}-Linie T1495 nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 µM TMZ. Die Mikrofotografien zeigen die immuncytochemische Färbung mit der Antikörperkombination αRad51/DyLight®. (A) Direkter Vergleich von Proben 1 h und 24 h nach Beginn der Analyse. (B) Bestrahlte und doppelbehandelte Kulturen im zeitlichen Verlauf. DMSO: Behandlung mit DMSO; TMZ: Behandlung mit 100 µM Temozolomid; 5 Gy: Bestrahlung mit 5 Gy. Messbalken 50 µm. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für zwei identisch durchgeführte immuncytochemische Analysen (n = 2).

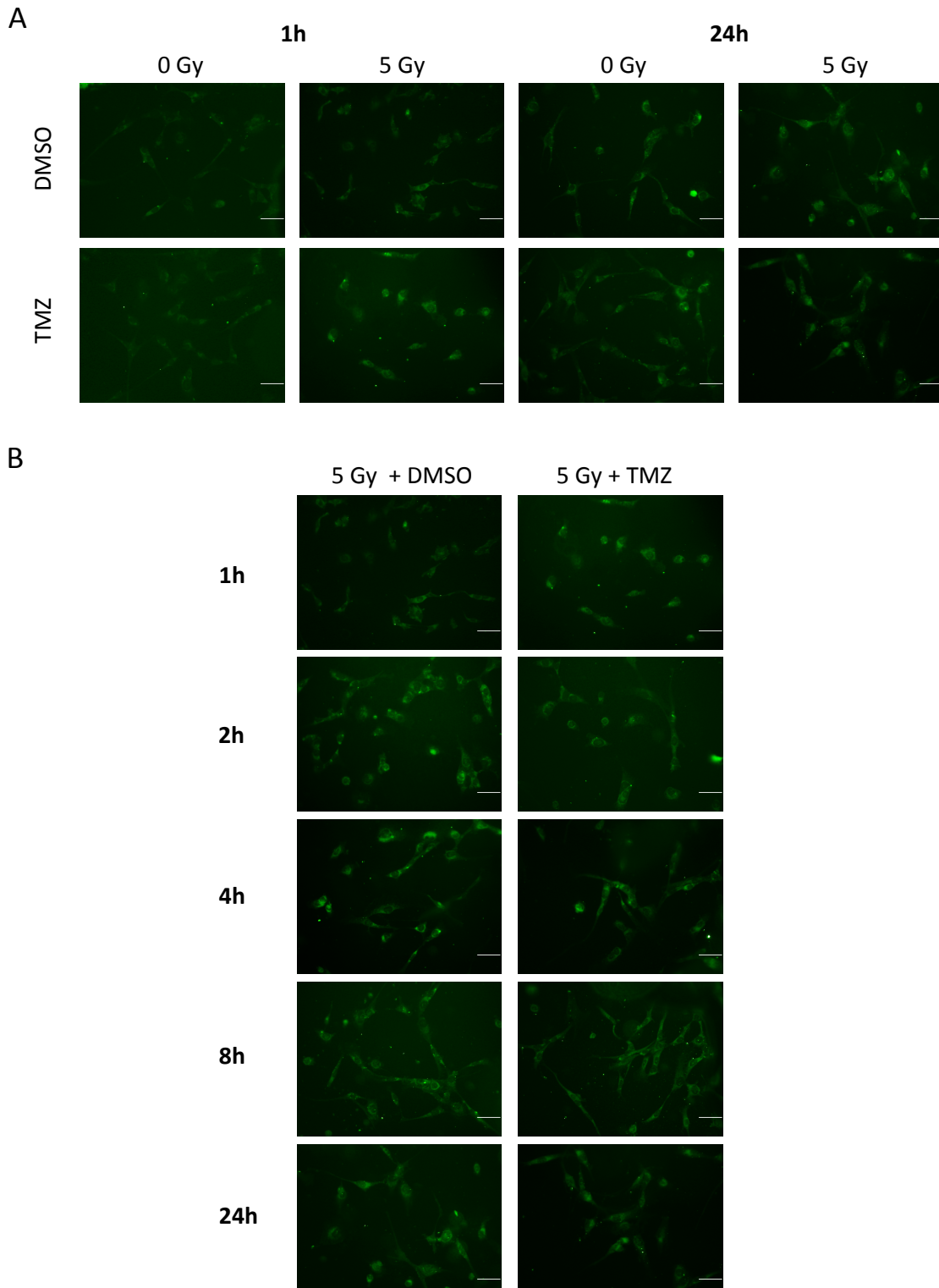


Abbildung 26: Subzelluläre Lokalisation von Rad51 in der TP53_{missense}-Linie T1442 nach Bestrahlung mit 5 Gy und nach Doppelbehandlung mit 5 Gy und 100 µM TMZ. Die Mikrofotografien zeigen die immuncytochemische Färbung mit der Antikörperkombination αRad51/DyLight®. (A) Direkter Vergleich von Proben 1 h und 24 h nach Beginn der Analyse. (B) Bestrahlte und doppelbehandelte Kulturen im zeitlichen Verlauf. DMSO: Behandlung mit DMSO; TMZ: Behandlung mit 100 µM Temozolomid; 5 Gy: Bestrahlung mit 5 Gy. Messbalken 50 µm. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für zwei identisch durchgeführte immuncytochemische Analysen (n = 2).

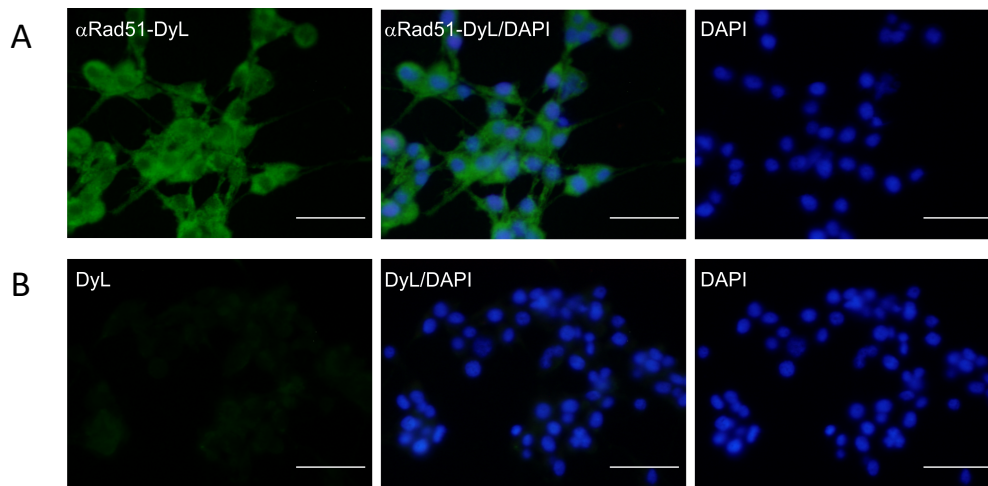


Abbildung 27: Positiv- und Negativkontrolle für die immuncytochemische Färbung unbehandelter U87MG-Zellen mit dem Rad51-Antikörper (α Rad51, mo, ab1837; Tab. 10). Die Detektion erfolgte mit dem Sekundärantikörper DyLight® 488 (DyL; Tab. 10). Diese Präparate entstanden als unbehandelte Kontrollen in einem Bestrahlungsexperiment. (A) Färbung mit der Antikörperkombination α Rad51/DyLight® 488 und Chromatinfärbung mit DAPI. Es sind die individuellen Kanäle und die Überlagerung (Mitte) dargestellt. (B) Färbung wie in (A), aber ohne Primärantikörper. Es sind die individuellen Kanäle und die Überlagerung (Mitte) dargestellt. Messbalken 50 μ m. mo: *mouse* Antikörper; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol.



Universität zu Lübeck

Eingang
9.9.08

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Frau
Dr. med. Zechel
Klinik für Neurochirurgie

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500-4639
Fax: (0451) 500-3026
email:
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

im Hause

Datum: 27.06.2008
Aktenzeichen: **08-070**
(immer angeben!)

nachrichtlich:
Herrn Prof. Tronnier
Direktor der Klinik für Neurochirurgie

Ihr Antrag an die Ethik-Kommission 20. Mai 2008 – Ihr Schreiben vom 20. Juni 2008
Antragsteller: Frau Dr. Zechel / Herr Prof. Tronnier
Titel: Zell- und molekularbiologische Untersuchungen an Hirntumoren und davon abgeleiteten Zellkulturen

Sehr geehrte Frau Dr. Zechel,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat keine Bedenken mehr.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr
Raspe
Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
☒ Prof. Dr. Dr. Schweiger
(Psychiatrie)
☒ Prof. Dr. Dendorfer
(Pharmakologie)
☒ Frau Prof. E. Stubbe
(Theologin)
☒ Prof. Dr. Borch
(Medizin- und Wissenschaftsgeschichte)

☒ Frau H. Müller
(Pflege)
☒ Prof. Wessel
(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)
☒ Herr Dr. Fieber
(Richter am Landgericht Ahrensburg)
☒ Prof. Schwinger
(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. Klein
(Medizinische Klinik I)
☒ Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie)
Herr Dr. Schultz
(Pädiatrie)
☒ Herr D. Stojan
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)



Im Dienste des Lebens
Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Stellv. Vorsitzende

Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Universität zu Lübeck

Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann

Tel.: +49 451 500 4639

Fax: +49 451 500 3026

janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Frau

PD Dr. C. Zechel

Klinik für Neurochirurgie

im Hause

Aktenzeichen: 08-070

Datum 18.03.2009

Zell- und molekularbiologische Untersuchungen an Hirntumoren und davon abgeleiteten Zellkulturen

Hier: Optimierte Aufklärung – Ihr Schreiben vom 12.03.2009

Sehr geehrte Frau Dr. Zechel,

die optimierte Aufklärung habe ich zustimmend zur Kenntnis genommen.

Es bedarf keiner weiteren Begutachtung durch die Kommission.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

10 Danksagungen

An erster Stelle danke ich meiner Doktormutter und Betreuerin PD Dr. Christina Zechel für die Bereitstellung des Themas, das Überlassen des Materials sowie für die intensive Betreuung und bestärkende Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. Volker Tronnier für die Möglichkeit, meine Dissertation im Neuroonkologischen Labor der Klinik für Neurochirurgie verfassen zu können.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. Dirk Rades sowie den Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie für die Möglichkeit, die Bestrahlung der Zellen durchführen zu können. Insbesondere danke ich Dr. Markus Dahlke für die Hilfe bei der Durchführung der Bestrahlung.

Bei allen Mitarbeitern des Neuroonkologischen Labors bedanke ich mich für die herzliche Aufnahme und Unterstützung. Besonders bedanke ich mich bei Dr. Eileen Hirsland für die Einweisung in die Methoden, die vielen praktischen Ratschläge sowie die Bereitstellung der immunocytochemischen Präparate. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Edith Pawlak für die Unterstützung bei der Arbeit in der Zellkultur und die vielen praktischen Ratschläge.

Ich danke Prof. Dr. Manfred Westphal und Prof. Dr. Katrin Lamszus vom Labor für Hirntumorbiologie des UKE Hamburg für die Bereitstellung der Zelllinie U87MG. Außerdem danke ich PD Dr. Reinhard Vonthein für die ausführliche statistische Beratung.

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Robert Hermann und PD Dr. Mirko Nitsche für ihre Ratschläge und ideelle Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, zuvörderst meinen Eltern Ute und Ulrich Carl, meinem Bruder Cedric Carl und meiner Freundin Julia Lenzen sowie meinen Freunden, die mich während der gesamten Zeit meiner Arbeit begleitet und bestärkt haben.

11 Lebenslauf

Cecil Alexander Carl

01.07.1991

Hamburg

cecilcarl@icloud.com



Ausbildung

- | | |
|-------------|--|
| 2015-2019 | Dissertation in der experimentellen Neuroonkologie
<i>Klinik für Neurochirurgie, Universität zu Lübeck</i> |
| 12/2016 | Approbation als Arzt |
| 2010 – 2016 | Studium der Humanmedizin, Gesamtnote 1,5
<i>Universität zu Lübeck</i>
<i>Medizinische Universität Innsbruck, Österreich</i>
<i>University of Sydney, Central Clinical School, Australien</i>
<i>University of Malta, Medical School, Malta</i> |
| 2008 – 2010 | Abitur, Abiturnote 1,0
<i>Eichenschule, Gymnasium, Scheeßel</i> |
| 2007 – 2008 | Auslandsaufenthalt in einem englischen Internat
<i>Giggleswick School, Settle, Großbritannien</i> |

Praktische Erfahrung

- | | |
|-------------|--|
| seit 2017 | Weiterbildungsassistent in der Strahlentherapie
<i>Zentrum für Strahlentherapie, Westerstede</i> |
| 2015 – 2016 | Praktisches Jahr
<i>Allgemeinchirurgie (Universitätsklinikum Innsbruck, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich)</i>
<i>Onkologie (Royal Prince Alfred Hospital, University of Sydney, Australien)</i>
<i>Kardiologie (Mater Dei Hospital, University of Malta, Malta)</i>
<i>Radiologie (Universitätsklinikum Lübeck, Universität zu Lübeck)</i> |
| 2013 – 2014 | Famulaturen
<i>Allgemeinchirurgie (DIAKO Bremen)</i>
<i>Strahlentherapie (Zentrum für Strahlentherapie, Westerstede)</i>
<i>Strahlentherapie (Universitätsklinikum Innsbruck, Österreich)</i>
<i>Allgemeinmedizin (Praxis Dr. Brinkmann, Moormerland)</i>
<i>Gynäkologie (Universitätsklinikum Lübeck, Universität zu Lübeck)</i> |
| seit 2012 | MCK neoPlan GmbH, Bremen
<i>Organisationsberatung im Gesundheitswesen</i>
<i>Mitgründer</i> |

Cecil Alexander Carl

Lübeck, 06. Februar 2020

Publikationen

Carl CA, Hirseland E, Rades D, Tronnier V, Zechel C (2017) Induktion der RAD51-Expression und subzelluläre Lokalisation in stammzellähnlichen Gliomzellen nach Radiotherapie und in Abhängigkeit vom p53-Status. Strahlenther Onkol 193, 167

Carl CO, Carl CA (2012). Krebspezifische Sterblichkeit bei Brustkrebs mit Lymphknotenbefall. Einfluss sehr kleiner Tumoren. Strahlenther Onkol 188, 529-30

Carl CO, Carl CA, Dunst J (2011) Ganzhirnbestrahlung nach lokaler Entfernung von bis zu drei Hirnmetastasen. Info Onkologie 14, 21-22

Posterpräsentationen

Carl C, Hirseland E, Rades D, Tronnier V, Zechel C (2017) RAD51-Expression in stammzellähnlichen Gliomzellen nach Radiotherapie und in Abhängigkeit vom p53-Status. Uni im Dialog. 28. Juni 2017. Lübeck, Deutschland

Carl C, Hirseland E, Rades D, Tronnier V, Zechel C (2017) RAD51-Expression in stammzellähnlichen Gliomzellen nach Radiotherapie und in Abhängigkeit vom p53-Status. 23. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie e.V. 15. – 18. Juni 2017. Berlin, Deutschland