

Aus der

Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen

# **Radioresistenz von Glioblastomresektaten und primären Stammzellkulturen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Riedel, Andreas**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Zips
2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Naumann
3. Berichterstatter: Professor Dr. D. Vordermark

Tag der Disputation: 11.07.2022

## **Vorwort**

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in [1] veröffentlicht. Auf Passagen und Abbildungen, die bereits in dieser, oder einer ähnlichen Form veröffentlicht wurden, wird noch einmal explizit hingewiesen.

# Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1 Das Glioblastom (GB).....	7
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren .....	7
1.1.2 Klinik und Symptome .....	7
1.1.3 Radiologische und histologische Charakterisierung des Glioblastoms .....	7
1.1.4 Molekularbiologische Charakterisierung des Glioblastoms.....	9
1.1.5 Therapie.....	10
1.2 Tumorstammzellen .....	11
1.2.1 Glioblastomstammzellen – Definition und Eigenschaften .....	12
1.2.2 Mikromilieu von Glioblastomstammzellen.....	13
1.2.3 GSZ und ihre Rolle für die Radioresistenz des Glioblastoms .....	14
1.3 Radiobiologische Grundlagen.....	14
1.3.1 DNA-Schäden und Reparaturmechanismen .....	14
1.3.2 Die $\gamma$ H2AX-Foci Analyse .....	16
1.4 Fragestellung.....	18
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1 Material .....	20
2.2 Berechnungen - Immunhistochemie .....	24
2.3 Berechnungen - Immunfluoreszenz .....	26
2.4 Studiendesign.....	27
2.5 Ex-Vivo Assay .....	28
2.6 Zellkultur.....	29
2.6.1 Zellisolation und Kultivierung der Gliosphäroide.....	29
2.6.2 Expansion und Passagieren der Zellkultur .....	30
2.6.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	30
2.6.4 Bestrahlung und Fixierung der Gliospheres .....	31
2.7 Histologische Färbungen.....	31

2.7.1	Vorbereitung der Schnitte für die Färbungen.....	31
2.7.2	Färbeprotokoll Immunhistochemie (Pimonidazol- und BrdU-Färbung) .....	32
2.7.3	Nestin-, ALDH1A3- CXCR4- und GFAP-Färbungen.....	33
2.7.4	Färbeprotokoll Immunfluoreszenz ( $\gamma$ -H2AX-Färbung).....	34
2.8	Mikroskopie .....	34
2.9	Statistische Analyse .....	36
2.9.1	Auswertung der Stammzellmarkerfärbungen .....	36
2.9.2	Analyse der $\gamma$ -H2AX-Färbung.....	37
2.10	Patientenkollektiv .....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
3.1	Phänotypisierung von Gliosphäroiden unter Kulturbedingungen.....	42
3.2	ALDH1A3-, CXCR4-, Nestin- und GFAP-Expression.....	43
3.2.1	ALDH1A3-Expression in GB-Resektaten und Gliosphäroiden.....	43
3.2.2	CXCR4-Expression in GB-Resektaten und Gliosphäroiden.....	44
3.2.3	Nestin-Expression in GB-Resektaten und Gliosphäroiden .....	45
3.2.4	GFAP-Expression in GB-Resektaten und Gliosphären.....	46
3.3	Induktion von $\gamma$ H2AX-Foci in Gliosphären.....	48
3.4	$\gamma$ H2AX-Foci Analyse in GB-Resektaten und Gliosphäroiden .....	49
3.4.1	Intertumorale Radioresistenz in GB-Resektaten.....	49
3.4.2	Intertumorale Radioresistenz in Gliosphäroiden .....	50
3.4.3	Korrelation der $\gamma$ H2AX-Anstiege von Sphäroiden und Resektaten ..	52
3.4.4	Korrelation der $\gamma$ H2AX-Analyse und der Markerproteine .....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>74</b>

## Abkürzungsverzeichnis

5-ALA.....	5-Aminolävulinsäure
ABC .....	Avidin-Biotin Complex
AEC .....	3-amino-9-ethylcarbazole
ALDH1A3.....	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A3
ATRAX.....	ATP-dependent helicase ATRX
bFGF.....	Basic fibroblast growth factor
BrdU .....	Bromdesoxyuridin
CXCR4.....	C-X-C chemokine receptor type 4
DAB .....	3,3'-Diaminobenzidin, 3,3'-Diaminobenzidine
DAPI .....	4',6'-Diamidin-2-phenylindol
dH2O .....	destilliertes Wasser
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
DSB .....	DNA double-strand-breaks
EGF .....	Epidermal growth factor
EGFP .....	Enhanced Green Fluorescent Protein
FBS.....	Fetal bovine serum
GB .....	Glioblastom
GFAP .....	Glial fibrillary acidic protein, Saures Gliafaserprotein
GSZ .....	Glioblastomstammzellen
H2AX .....	Histone family member X
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Wasserstoffperoxid
HE.....	Hämatoxylin Eosin
HEPES.....	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF .....	Hypoxic Induced Factor
IDH1 .....	Isocitrat Dehydrogenase 1
IHC .....	Immunhistochemie
IRIF .....	Irradiation induced focus
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl.....	Kaliumchlorid
MGMT .....	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O .....	Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaCl.....	Natriumchlorid
NHEJ .....	Nicht homologes End Joining
NSC .....	Neural stem cell
PBS .....	Phosphate buffered saline
PZ.....	Punktzahl
ROI .....	Region of Interest
TDS .....	Tissue Definiens Studio
TMZ .....	Temozolomid
TSZ.....	Tumorstammzellen
TTF .....	Tumour Treating Field
VEGF .....	Vascular Endothelial Growth Factor
WT .....	Wildtyp
ZNS .....	Zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: MRT Bildgebung eines Glioblastoms (Patient 5)</b> .....	8
<b>Abbildung 2: Mikroskopisches Bild eines GBs (Patient 4)</b> .....	9
<b>Abbildung 3: GB-Gewebe (Patient 5) mit <math>\gamma</math>H2AX-Immunfluoreszenzfärbung nach Bestrahlung</b> .....	17
<b>Abbildung 4: Studiendesign</b> .....	29
<b>Abbildung 5: Bestimmung der ROI und <math>\gamma</math>H2AX Analyse am Patient #1; adaptiert aus Riedel et al. (2021), gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture</b> .....	36
<b>Abbildung 6: Auswertung der Stammzellmarkerfärbungen (Nestin, ALDH1A3, CXCR4)</b> .....	37
<b>Abbildung 7: Automatische Zellerkennung und <math>\gamma</math>H2AX-Foci Auswertung</b> .....	38
<b>Abbildung 8: Phänotypen von Gliosphäroiden in der Zellkultur</b> .....	42
<b>Abbildung 9: ALDH1A3-Expression in Resektaten und Gliosphären</b> .....	43
<b>Abbildung 10: CXCR4-Expression in Resektaten und Gliosphären</b> .....	44
<b>Abbildung 11: Nestin-Expressionsanalyse, adaptiert aus Riedel et al. (2021), gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture</b> .....	46
<b>Abbildung 12: GFAP-Expression in Resektaten und Gliosphäroiden</b> .....	47
<b>Abbildung 13: Foci-Induktionsversuch in Gliosphäroiden #3, adaptiert aus Riedel et al. (2021), gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture</b> .....	49
<b>Abbildung 14: <math>\gamma</math>H2AX slope Analyse, adaptiert aus Riedel et al. (2021), gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture</b> .....	52
<b>Abbildung 15: <math>\gamma</math>H2AX-Anstiege in Abhängigkeit der Expression einzelner Markerproteine in Resektaten</b> .....	53
<b>Abbildung 16: <math>\gamma</math>H2AX-Anstiege in Abhängigkeit der Expression einzelner Markerproteine in Sphäroiden</b> .....	54

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Chemikalien</b> .....	20
<b>Tabelle 2: Geräte</b> .....	21
<b>Tabelle 3: Software</b> .....	22
<b>Tabelle 4: Lösungen</b> .....	23
<b>Tabelle 5: BrdU-Antikörper (Clone Bu20a) und Animal Research Kit</b> .....	24
<b>Tabelle 6: DAB-Chromogen</b> .....	24
<b>Tabelle 7: Peroxidase Löschpuffer (0,3%)</b> .....	25
<b>Tabelle 8: Blocking Serum (Vectastain ABC-kit)</b> .....	25
<b>Tabelle 9: Pimonidazol-Antikörper (ABC-kit)</b> .....	25
<b>Tabelle 10: Biotinylierter Antikörper (ABC kit)</b> .....	25
<b>Tabelle 11: Vectastain ABC-Elite Reagenz</b> .....	26
<b>Tabelle 12: AEC kit</b> .....	26
<b>Tabelle 13: <math>\gamma</math>H2AX-Antikörper</b> .....	26
<b>Tabelle 14: Tyramid Amplifikation</b> .....	27
<b>Tabelle 15: Stop Reagenzlösung</b> .....	27
<b>Tabelle 16: DAPI</b> .....	27
<b>Tabelle 17: <math>\gamma</math>H2AX-Foci Auswertung für das Resektat #8; ROI 3 nach Bestrahlung mit 8 Gy</b> .....	39
<b>Tabelle 18: Patientenkollektiv und Tumorcharakteristika, adaptiert aus Riedel et al. (2021), gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture</b> .....	41
<b>Tabelle 19: Nestin Expressionsanalyse, adaptiert aus Riedel et al. (2021), gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture</b> .....	45
<b>Tabelle 20: GFAP-Expression</b> .....	48
<b>Tabelle 21: <math>\gamma</math>H2AX slopes (ex vivo), adaptiert aus Riedel et al. (2021), gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture</b> .....	50

---

<b>Tabelle 22: <math>\gamma</math>H2AX-Anstiege (Gliosphäroide), adaptiert aus Riedel et al. (2021), gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture .....</b>	<b>51</b>
<b>Tabelle 23: <math>\gamma</math>H2AX Auswertung (Mann-Whitney-U-Test) adaptiert aus Riedel et al. (2021), gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture .....</b>	<b>51</b>
<b>Tabelle 24: Tissue Definiens Studio Einstellungen .....</b>	<b>65</b>
<b>Tabelle 25: ALDH1A3-Expressionsanalyse .....</b>	<b>66</b>
<b>Tabelle 26: CXCR4-Expressionsanalyse .....</b>	<b>67</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Glioblastom (GB)

### 1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das GB ist, gefolgt von den Astrozytomen (17,2%), der häufigste maligne hirneigene Tumor (46,1%) [2]. Dies entspricht einer Inzidenz von ca. 3,20/100.000 Einwohnern. Dabei weisen Erwachsene über 85 Jahre die höchste Inzidenz auf [2]. Glioblastome können in jedem Alter auftreten [3], dennoch ist es mit einem medianen Erkrankungsalter von 64 Jahren eine Erkrankung des älteren Menschen [2, 3]. Das progressionsfreie Überleben mit 7-8 Monaten, das mediane Überleben mit 14-16 Monaten, sowie das 5-Jahres-Überleben mit ca. 10% unterstreichen die schlechte Prognose des Glioblastoms [4, 5].

Für die Entstehung von Glioblastomen sind bislang einige Risikofaktoren bekannt. Beispielsweise erhöhen genetische Erkrankungen, wie die Neurofibromatose Typ 1, das Lynch und das Li-Fraumeni Syndrom das Risiko an einem Glioblastom zu erkranken [6]. Auch ionisierende Strahlung erhöht das Risiko für ein GB [6, 7]. Hierbei besteht eine besondere Gefährdung, falls die Bestrahlung im Kindesalter erfolgte [8].

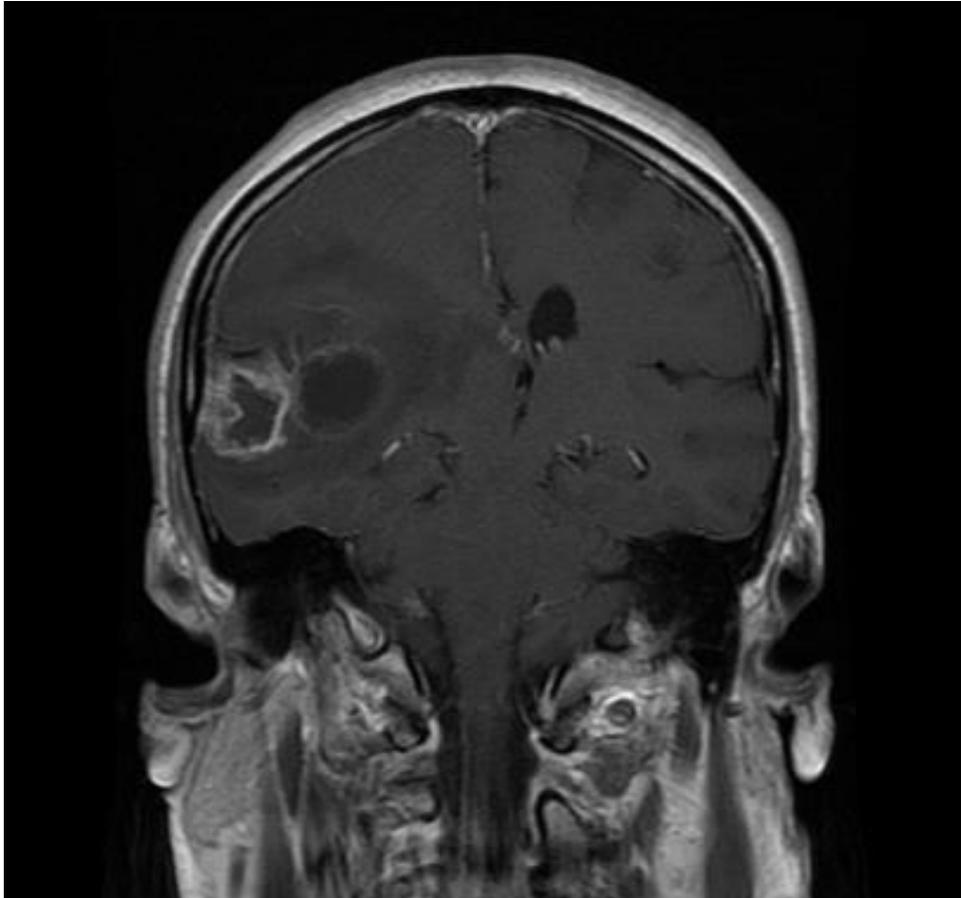
### 1.1.2 Klinik und Symptome

Die klinische Symptomatik der Patienten ist oft abhängig von der Lokalisation des Tumors und somit ausgesprochen vielfältig. Dies erschwert die Diagnosestellung im klinischen Alltag deutlich. Glioblastome können zwar im gesamten Zentralen Nervensystem (ZNS) auftreten, sind jedoch meistens supratentoriell in beiden Hemisphären lokalisiert [9, 10]. Initiale Symptome können Kopfschmerzen, Übelkeit, Paresen, Aphasien oder Wesensveränderungen sein [6]. Weitere mögliche Symptome sind Krampfanfälle, Inkontinenz, Hemineglect und kognitive Störungen [6]. In der Regel bilden sich die Symptome innerhalb weniger Wochen aus.

### 1.1.3 Radiologische und histologische Charakterisierung des Glioblastoms

Glioblastome stellen sich in der Schnittbildgebung sehr heterogen dar. Aufgrund von Nekrosen, Blutungen und Ödemen zeigen sich Inhomogenitäten [11]. In der Computertomografie und der Magnetresonanztomografie mit Kontrastmittel sind

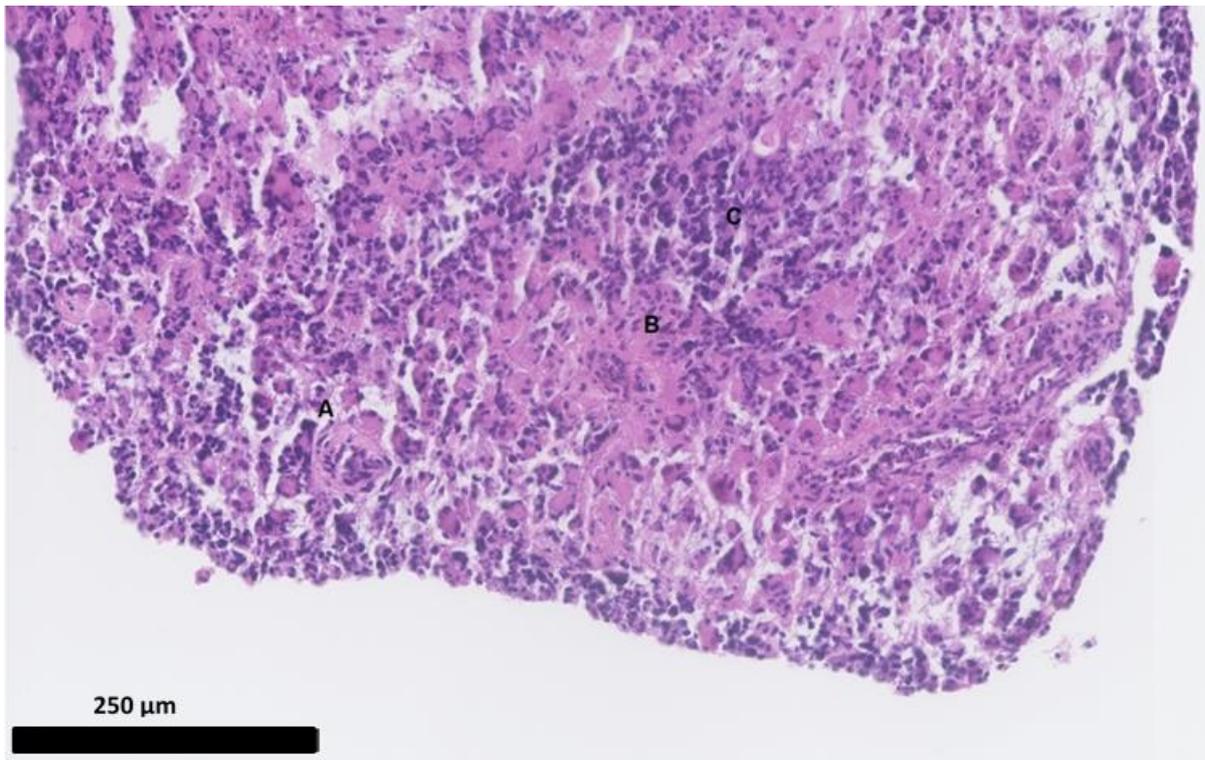
oftmals girlandenförmige Anreicherungen zu sehen. Diese lassen besonders auf vitale Tumoranteile schließen (siehe Abbildung 1) [11]. In angiografischen Aufnahmen stellen sich Hypervaskularisationen, Ektasien und diffuse Gefäßkurzschlüsse dar [11].



**Abbildung 1: MRT Bildgebung eines Glioblastoms (Patient 5)**

Girlandenförmige Kontrastmittelanreicherung mit perifokalem Ödem im Bereich des rechten Temporallappens. Im zentralen Bereich stellen sich nekrotische Areale dar.

Gliome besitzen ihren histologisch Ursprung in astrozytären Tumorzellen. Diese sind durch eine gliafaserreiche Matrix umgeben [12]. Im mikroskopischen Bild fallen vor allem viele Mitosefiguren, Kernpleomorphien und eine erhöhte Zelldichte (siehe Abbildung 2) im Vergleich zum Normalgewebe auf [12]. Diese Eigenschaften verliehen dem GB seinen mittlerweile veralteten Namen Glioblastoma multiforme. Glioblastome lassen sich von Astrozytomen Grad II und III durch das Vorhandensein von glomerulumartigen Gefäßproliferaten, strichförmigen großflächigen Nekrosen und perinekrotischen Pseudopallisaden unterscheiden [12].



**Abbildung 2: Mikroskopisches Bild eines GBs (Patient 4)**

**A)** Glomerulumentartiges Gefäßproliferat **B)** Nekrose **C)** Zellkernatypien und erhöhte Zelldichte

#### 1.1.4 Molekularbiologische Charakterisierung des Glioblastoms

Glioblastome sind hinsichtlich ihrer molekularpathologischen Eigenschaften eine äußerst heterogene Tumorentität [13]. Aus diesem Grund und aufgrund der Suche nach gezielten molekularen Therapiemöglichkeiten ergibt sich die Notwendigkeit der Entschlüsselung wichtiger molekularer Alterationen im GB.

Schon heute werden in der klinischen Routine Mutationen in der IDH 1 standardmäßig bestimmt, um primäre von sekundären GB zu differenzieren [14, 15]. Dabei sind IDH 1 Mutationen häufiger bei jungen Patienten zu finden [14]. Darüber hinaus hat die Gruppe der Patienten mit einer mutierten IDH1 ein deutlich höheres medianes Überleben mit 3,8 Jahren im Vergleich zu 1,1 Jahren beim IDH1 Wildtyp GB [14].

Auch epigenetische Veränderungen im Genom wie beispielsweise der Status der O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylierung beeinflussen das Therapieansprechen und somit auch die Prognose der Patienten [5, 16]. MGMT ist ein DNA-Reparatur-Protein, das die Wirkung des alkylierenden Chemotherapeutikums Temozolimid (TMZ) beeinträchtigen kann, indem es Alkylgruppen vom Guanin wieder entfernt [16]. Durch Methylierung der Promotorregion

kann das Gen epigenetisch in seiner Expression vermindert werden [16]. Das mediane Überleben der MGMT methylierten Kohorte ist signifikant höher (21,2 vs. 14 Monate), als das jener Kohorte ohne methylierte Promotorregion [17].

Neuere Arbeiten stratifizieren Glioblastome in weitere molekulare Subtypen [4, 18-20]. Die Subklassifikation in die klassischen, mesenchymalen, proneuralen und neuronalen Subtypen kann von klinischer Bedeutung sein [19]. So profitiert beispielsweise der proneurale Subtyp, der vor allem durch Alterationen im PDGFRA Gen und Punktmutationen im IDH1 geprägt ist, nicht von einer aggressiven Therapie [19]. Hingegen führt eine aggressive Therapie bei den klassischen (hohe EGFR Amplifikationen), mesenchymalen (niedrige NF1 Expression und mesenchymale Marker wie MET), sowie den neuronalen (Expression neuronaler Marker wie NEFL, GABRA1) Subtypen zu einem besseren Therapieansprechen [19]. Eine aggressive Therapie ist in diesem Zusammenhang als eine gleichzeitige Radiochemotherapie oder eine Therapie mit mehr als 3 Zyklen einer Chemotherapie definiert [19].

### 1.1.5 Therapie

Die Standardtherapie für Patienten, die jünger als 70 Jahre sind und einen Karnofsky-Index über 60% haben, basiert auf einem trimodalen Ansatz. Dieser besteht aus der chirurgischen Resektion, Bestrahlung und einer Chemotherapie mit TMZ.

Die chirurgische Resektion trägt zur Diagnosestellung bei und kann symptomlindernd wirken bzw. sogar neurologische Fähigkeiten wiederherstellen. Aufgrund des infiltrativen Charakters des Glioblastoms ist eine vollständige Entfernung des Tumors jedoch nicht möglich [21]. Es wird eine totale Resektion, auch *maximum safe resection* genannt, angestrebt. Hierbei werden alle im MRT kontrastmittelaufnehmenden Regionen resiziert, jedoch ohne hierbei ein neurologisches Defizit zu verursachen. Das Ausmaß der Resektion hat einen deutlichen Einfluss auf das mediane Überleben (18,4 vs. 14,5 Monate) [22]. Technische Neuerungen, wie intraoperative MR-Bildgebung, *cortical mapping* und die Resektion unter Gabe von fluoreszierender 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) tragen zu einem besseren chirurgischen Ergebnis bei [23-25].

Die zweite Säule der GB Therapie ist die Bestrahlung. Sie bildet mit der Gabe von TMZ die adjuvante Therapie des Glioblastoms und erfolgt nach dem sogenannten Stupp-Schema [5, 26]. Ungefähr 6 Wochen nach der chirurgischen Resektion wird die weitere

Therapie fortgesetzt. Hierbei wird mit einer Gesamtdosis von 60 Gy in insgesamt 30 Einzeldosen á 2 Gy im makroskopischen Tumolvolumen (auch *gross tumour volume* genannt) mit einem 2 cm großen Randsaum bestrahlt [26]. Die Planung hierfür erfolgt per Planungs-CT und einem drei-dimensionalem Planungssystem [26]. Neben der Bestrahlung bildet die TMZ-Gabe die dritte Säule der GBM Therapie. Temozolomid wird in einer Dosierung von 75 mg/m<sup>2</sup> bis zu 49 Tage parallel zur Bestrahlung verabreicht [26]. Nach der Bestrahlung erfolgt eine 4-wöchige Pause. Anschließend können bis zu 6 weitere Zyklen TMZ in einer Dosierung von bis zu 200 mg/m<sup>2</sup> verabreicht werden [26]. Die kombinierte Therapie aus fraktionierter Bestrahlung und Chemotherapie mit TMZ resultiert in einem deutlich besseren Gesamtüberleben (12,1 vs. 14,6 Monate) [5].

Darüber hinaus existieren heute weitere Therapieansätze, die in Erwägung gezogen werden können. Beispielsweise konnte in einer 695 Probanden umfassenden *Tumour Treating Field* (TTF) Studie in Kombination mit TMZ ein verbessertes progressionsfreies Überleben (6,7 vs. 4,0 Monate), sowie ein verbessertes Gesamtüberleben (20,9 vs. 16,0 Monate) im Vergleich zur Standardtherapie nur mit TMZ gezeigt werden [27]. Hingegen führt die Gabe von Bevacizumab in Kombination mit einer Radiochemotherapie nicht zu einem verlängerten Gesamtüberleben, sondern nur zu einem verbesserten progressfreien Überleben (10,6 vs. 6,2 Monate). Es ist jedoch zu beachten, dass dies mit einer deutlich erhöhten Rate an unerwünschten Arzneimittelwirkungen verbunden ist [28]. In einer Phase 3 Studie konnte bei Patienten mit methyliertem MGMT Promoter Status die Kombination von Lomustine (Alkylanz) und TMZ gegenüber einer alleinigen Therapie mit TMZ einen signifikanten Vorteil im Gesamtüberleben (48,1 Monate vs. 31,4) zeigen [29].

## 1.2 Tumorstammzellen

Tumorstammzellen (TSZ) sind ursprünglich ein Modell aus der hämatologischen Onkologie [30, 31]. Demnach ist der Ursprung einer malignen hämatologischen Erkrankung in einem kleinen Anteil der Zellen zu finden, der in der Lage ist sich dauerhaft und klonogen zu vermehren [30]. Die ausgeprägte histopathologische und molekulare Heterogenität solider Tumoren lässt auf verschiedene Subpopulationen an Tumorzellen schließen [32].

### 1.2.1 Glioblastomstammzellen – Definition und Eigenschaften

Es existiert keine allgemeingültige Definition für Glioblastomstammzellen (GSZ). Jedoch gibt es Eigenschaften, die Tumorzellen erfüllen müssen bzw. erfüllen können um als GSZ bezeichnet zu werden. Als obligate Eigenschaften werden dauerhafte Selbsterneuerung, dauerhafte Proliferation und die Eigenschaft tumorinitiierend zu wirken, gesehen [33]. Hierbei ist die Tumorinitiierung besonders relevant. Es wird davon ausgegangen, dass schon eine geringe Anzahl an TSZ ausreicht, um einen Tumor in einer immunkompromitierten Maus zu initiieren [34-36]. Eigenschaften wie die dauerhafte Selbsterneuerung und die dauerhafte Proliferation können auch in-vitro beobachtet und nachgestellt werden. In serumfreiem Medium, das mit Wachstumsfaktoren angereichert wird, können GSZ sogenannte Gliosphäroide formen [33-39]. Die Zellen dieser Gliosphäroide können nach dem Passagieren in eine Einzelzellsuspension immer wieder neue Sphäroide bilden und vermehren sich so dauerhaft klonogen [33, 37]. Dennoch kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle Zellen in diesen dreidimensionalen Strukturen TSZ sind. Lediglich ein Anteil der Zellen, der sich vor allem auf der Oberfläche der Gliosphäroide befindet, erfüllt die Voraussetzungen für Stammzellen [34, 40]. Bei den restlichen Tumorzellen handelt es sich um Progenitorzellen oder ausdifferenzierte Zellen [33]. Darüber hinaus existieren fakultative Eigenschaften, die GSZ beschreiben können. Dazu zählen zum Beispiel der geringe Anteil an TSZ im Tumor, die Expression verschiedener Stammzellmarker (CD 133, Nestin, Musashi1) und die Möglichkeit sich entlang verschiedener Linien zu differenzieren und somit eine heterogene Zellzusammensetzung im Tumor zu schaffen [33].

Es gibt momentan keinen sicheren Stammzellmarker, der ubiquitär und nur auf GSZ vorkommt. Die Proteine CD 133 und Nestin werden in diesem Zusammenhang oft als geeignete Marker angesehen. Sie korrelieren mit dem WHO Grad eines Glioms und haben einen Stellenwert als negativer prognostischer Marker [41]. Dennoch wird vor allem CD 133 als Stammzellmarker kontrovers diskutiert. Bei CD 133 handelt es sich um ein Glykoprotein, das glykosiliert werden kann und auch alternativem *Splicing* unterliegt. Dies verringert die Spezifität und Sensitivität der verwendeten Antikörper [42-44].

Besonders mesenchymale GSZ stehen im Verdacht zu einer ausgeprägten Radioresistenz bei Glioblastomen zu führen [45]. Ein potentiell geeigneter Stammzellmarker für diese Subpopulation von GSZ ist ALDH1A3 [46]. ALDH1A3 verwendet als Substrat Retinal und oxidiert dieses zu Retinsäure. Diese setzt eine Signalkaskade in Gang, die letztlich zur verminderten Expression neuraler Stammzellmarker führt [47]. Darüber hinaus führt Retinsäure zu einem Zellzyklusarrest zwischen den G1/G0- und S-Phasen [47]. Auch eine Ausdifferenzierung in verschiedene Zelllinien konnte anhand steigender Marker wie Tuj1 und GFAP beobachtet werden [47]. ALDH1A3 ist nicht nur mit einer mesenchymalen Differenzierung des GBs assoziiert, sondern auch mit der Aktivierung einer mesenchymalen Transformation im Glioblastom [48].

Der Chemokinrezeptor CXCR4 zählt ebenfalls zu den Stammzellmarkern des Glioblastoms [49, 50]. Die SDF-1/CXCR4 Achse stellt in der Radioonkologie ein potentiell Therapieziel dar, denn dieser Signalweg scheint in einen Großteil wichtiger tumorbiologischer Prozesse involviert zu sein. Hierbei spielt CXCR4 eine besondere Rolle für die Angiogenese, Metastasierung und den Austausch zwischen Stroma- und Stammzellen im Tumor [51]. Darüber hinaus konnte in in vitro- und in vivo- Studien gezeigt werden, dass ionisierende Strahlung die SDF-1/CXCR4-Achse induziert [52, 53]. Des Weiteren ist CXCR4 klinisch mit einem schlechten Behandlungsergebnis bei Gliomen assoziiert [54].

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) gehört zu der Gruppe der Intermediärfilamente und kommt im Zytoplasma zahlreicher Zellarten vor, besonders jedoch in reifen Astrozyten und Ependymzellen [55]. Auch in der Tumorbologie spielt es eine herausragende Rolle und wird beispielsweise als Markerprotein für Astrozytome genutzt [56]. GFAP kann darüber hinaus auch als Differenzierungsmarker von Astrozyten genutzt werden, da in der Entwicklungsphase der Zellen ein Wechsel des Hauptfilaments von Vimentin hin zu GFAP stattfindet [57]. Aus diesem Grund erscheint GFAP ein besonders geeigneter Marker zur Unterscheidung von ausdifferenzierten Zellen und Progenitorzellen zu sein.

### **1.2.2 Mikromilieu von Glioblastomstammzellen**

GSZ reichern sich unter besonderen Bedingungen an. Aus diesem Grund vermutet man sogenannte Stammzellnischen. Es wird vermutet, dass diese sich vor allem in

perivaskulären und perinekrotisch-hypoxischen Bereichen befinden [58]. Das dort vorherrschende Mikromilieu führt zur Hochregulierung von Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren, wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF), der SDF1/CXCR4–Achse, dem Hypoxie induzierten Faktor (HIF) und beispielsweise dem Stammzellmarker Notch [58-60]. Somit werden die GSZ nicht nur durch ihre Nische beeinflusst, sondern sie verändern ihr Mikromilieu aktiv, indem sie äußere Faktoren wie Angiogenese und Zellproliferation, sowie –differenzierung beeinflussen [58, 60].

Hypoxie innerhalb des Glioblastoms ist ein negativer prognostischer Faktor [61] und u.a. aufgrund einer höheren MGMT-Expression auch mit einer therapeutischen Resistenz assoziiert [58, 62]. Hypoxie induziert bei GSZ auch die Sekretion der immunsuppressiven Zytokine CSF1 und CCL2 [63]. Dies trägt zur Immunevasion des Tumors bei [32].

### **1.2.3 GSZ und ihre Rolle für die Radioresistenz des Glioblastoms**

Es ist davon auszugehen, dass die Radioresistenz von Glioblastomzellen eine entscheidende Rolle für die schlechte Prognose des Glioblastoms spielt [5, 64-68]. Besonders relevant scheinen hierbei GSZ zu sein, da diese aufgrund ihrer Therapieresistenz schwer zu eradizieren sind [34, 36, 69]. Auch deshalb gehen einige Autoren davon aus, dass eine lokale Tumorkontrolle bzw. die Heilung des Tumorleidens an die Eradikation aller TSZ gebunden sein könnte [70, 71].

Durch Bestrahlung induzierte DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) führen bei GSZ zu einer verstärkten Phosphorylierung der DNA-Reparaturproteine ATM, Rad17 und Chk1/2 [34]. Diese führen zu einer verbesserten Reparatur von DNA-Schäden in Glioblastomstammzellen. Als weitere mögliche Gründe für die ausgeprägte Strahlenresistenz im GSZ werden eine effizientere homologe Rekombination von DSB gesehen, sowie Veränderungen im Zellzyklus [72].

## **1.3 Radiobiologische Grundlagen**

### **1.3.1 DNA-Schäden und Reparaturmechanismen**

Die radiobiologische Wirkung ionisierender Strahlung auf Zellen kann in indirekte und direkte Schäden unterteilt werden. Während bei direkten Schäden die geladenen Teilchen ihre Energie unmittelbar auf die Zielmoleküle übertragen, geschieht dies bei

indirekten Schäden über den Zwischenschritt der Wasserradiolyse. Hierbei entstehen durch heterolytische Spaltung positiv geladene Wassermoleküle oder durch homolytische Spaltung ein Hydroxylradikal und ein Wasserstoffatom [73]. Zielmoleküle dieser radiochemischen Reaktionen können Proteine, Lipide und vor allem die DNA sein. Bei DNA-Schäden kann zwischen Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, Doppelstrangbrüchen und Vernetzungen unterschieden werden [73, 74].

Die Reaktion der Zelle auf DNA-Schäden kann in verschiedene Schritte eingeteilt werden. Zunächst wird der Schaden detektiert. Danach beginnt die Amplifikation und Transduktion des Signals. Am Ende der Kette steht die zelluläre Reaktion auf das Ereignis. Diese kann in Form von mitotischem Zelltod, Apoptose, Seneszenz, Autophagie, aber auch erfolgreicher Reparatur erfolgen [74, 75].

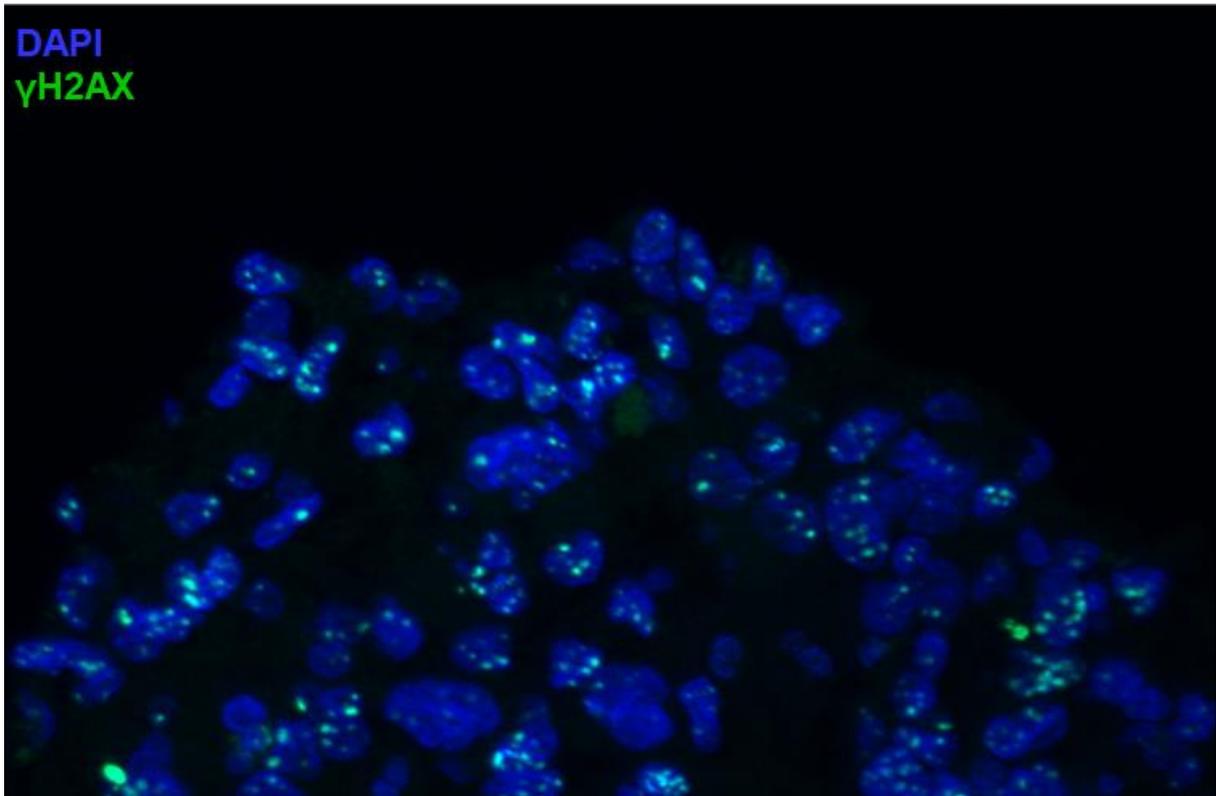
Einzelstrangbrüche können über die sogenannte Basenexzisionsreparatur effizient repariert werden. Hierfür entfernen Exonukleasen beschädigte Bereiche der DNA, sodass anschließend die DNA-Polymerase den Strang anhand des komplementären Bereichs repliziert [73, 74]. Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen hingegen gestaltet sich aufgrund der Beschädigung beider DNA-Stränge deutlich komplizierter. Dennoch stehen hierfür zwei Varianten der Reparatur zur Verfügung; das *Nicht-homologe End Joining* (NHEJ) und die Reparatur mittels homologer Rekombination.

Der Großteil strahleninduzierter DSB wird mittels NHEJ repariert, da es keines homologen Chromosoms bedarf und somit während des gesamten Zellzyklus angewendet werden kann [73, 76]. Hieraus resultiert jedoch auch eine Anfälligkeit für Fehler bei der Reparatur [76]. Bevor das eigentliche NHEJ abläuft bindet das DNA-Bindungsprotein Ku [76]. Dabei handelt es sich um ein Heterodimer aus Ku70 und Ku80 [77]. Es stabilisiert die Bruchenden und erleichtert die Bindung der anschließend benötigten Enzyme [73]. In einem ersten Schritt werden nun beschädigte DNA-Abschnitte mit Hilfe eines Nucleasenkomplexes (Artemis DNA-PKc) entfernt [76, 78]. Durch die katalytische Funktion der Proteinkinase werden weitere Proteine phosphoryliert und Signalkaskaden induziert, die unter anderem weitere Reparaturproteine rekrutieren [76, 78]. Im zweiten Schritt binden die pol X Polymerasen  $\mu$  und  $\lambda$  und katalysieren die Synthese des fehlenden DNA-Strangs [76]. Die abschließende Verknüpfung der DNA erfolgt durch einen Ligasenkomplex aus XLF, XRCC4 und der DNA Ligase IV [73, 76, 79].

In der S-Phase und in der G2-Phase kann die Reparatur von DSB mittels homologer Rekombination erfolgen. Aufgrund des vorliegenden Schwesternchromatids ist die homologe Rekombination weniger fehlerbehaftet als das NHEJ. Dies ist auch einer der Gründe für die ausgeprägte Radioresistenz eukaryontischer Zellen in der S- und G2-Phase [73, 80]. In einem ersten Schritt werden in 5'-3' Richtung die Bruchenden reseziert, sodass einzelsträngige Überhänge verbleiben. Diese sind in der Lage in die DNA-Helix des homologen Schwesternchromatids einzuwandern und diesen zu invadieren. Das Chromatid dient nun als Matrize für die Synthese der entstandenen Lücke im Bereich des DSB. Nach Beendigung der Replikation der DNA kommt es zur Ligation der Doppelstränge [73, 80].

### 1.3.2 Die $\gamma$ H2AX-Foci Analyse

Eine Möglichkeit um DNA-Doppelstrangbrüche zu detektieren und die Radiosensitivität von Geweben zu quantifizieren ist die sogenannte  $\gamma$ H2AX-Färbung. Werden Zellen ionisierender Strahlung ausgesetzt und bilden sich in Folge dessen DNA-Doppelstrangbrüche, so wird Serin an der Stelle 139 des Histons H2AX phosphoryliert [81]. Der Anteil an dem Histon H2AX variiert je nach Zellart, beispielsweise weisen Astrozytom Zelllinien einen Anteil von ungefähr 25% auf [81]. Die Phosphorylierung kann durch mindestens 4 unterschiedliche Kinasen erfolgen, die zum Teil redundant arbeiten [82]. Zu den Kinasen zählen ATM, die vor allem bei ionisierender Strahlung und Meiose wirkt, ATR, ATX und die DNA-PK [82, 83]. Die  $\gamma$ H2AX-Foci bilden mit weiteren Kofaktoren wie ATM, BRCA1 und 53BP1 einen durch ionisierende Strahlung induzierten Fokus (IRIF), der für die Reparatur des DNA-Doppelstrangbruches benötigt wird [82]. Es ist davon auszugehen, dass nach der erfolgreichen Reparatur eines DSB die Phosphorylierung mittels Phosphatasen (insbesondere Pph3) wieder entfernt wird [84].



**Abbildung 3: GB-Gewebe (Patient 5) mit  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung nach Bestrahlung**  
Dargestellt sind die residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci (grün) nach 24 Stunden auf DAPI gefärbten Zellkernen (blau). Die Bestrahlung erfolgte mit 1x8 Gy.

Die Anzahl an residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci bietet einen Ansatz um die Radioresistenz von einzelnen Zellen, Zelllinien oder gar Tumoren zu quantifizieren. Es wird vermutet, dass Zellen, die residuelle  $\gamma$ H2AX-Foci besitzen, sich nicht mehr reproduzieren können und sehr wahrscheinlich in den Zelltod gehen [85]. Beispielsweise verbleiben  $\gamma$ H2AX-Foci von Zellen mit fehlerhaften Reparaturproteinen (ATM, Ligase IV und DNA-PKc) deutlich länger bestehen als in Zellen ohne diese Alterationen [85-87]. Auch ist davon auszugehen, dass eine Beziehung zwischen residuellen Doppelstrangbrüchen und dem klonogenen Überleben von Zellen nach Bestrahlung besteht. In [88] zeigten die Autoren, dass der Anteil an Zellen mit weniger als 3 Foci pro Zellkern deutlich mit dem Zellüberleben (*Survival fraction (SF)*) korreliert. Darüber hinaus besteht eine lineare Korrelation zwischen residuellen Foci und  $-\ln SF$  [88]. Des Weiteren ist die Methode geeignet um sie an Zellreihen, frischem ex-vivo Gewebe als auch an Xenograft-Modellen anzuwenden [64, 65, 89, 90]. In [64] wurde gezeigt, dass die  $\gamma$ H2AX-Foci Analyse geeignet ist, um Unterschiede der Radioresistenz zwischen verschiedenen Tumorentitäten wiederzugeben. Darüber hinaus lassen sich auch inter- und

intratumorale Unterschiede der Radioresistenz innerhalb einer Entität mittels  $\gamma$ H2AX-Analyse darstellen [91]. Die Zusammenschau dieser Eigenschaften zeigt die Eignung und Anwendbarkeit der  $\gamma$ H2AX-Analyse als Mittel zur Bestimmung der Radioresistenz verschiedener Zellen oder Gewebe.

Neben den oben genannten Vorteilen des Verfahrens gibt es einige Nachteile, die ebenfalls Erwähnung finden müssen. Zunächst ist anzumerken, dass nicht jeder  $\gamma$ H2AX-Focus auch ein DSB darstellt. Beispielsweise exprimieren Zellen, die in die Seneszenz oder Apoptose eintreten massiv  $\gamma$ H2AX-Foci [92, 93]. Auch zeigt sich ein Zusammenhang zum Zellzyklus, wobei in der S-Phase und der G2-Phase besonders viele Foci ausgebildet werden [94]. Darüber hinaus ist bislang auch nicht klar, ob nach dem Verblässen eines Focus die Integrität der DNA komplett wieder hergestellt ist, oder ob mit einer gewissen Zeitverzögerung gerechnet werden muss [94]. Eine Weitere Limitation ist die Abhängigkeit von Hypoxie und Perfusion. In [89] zeigen die Autoren, dass Unterschiede hinsichtlich der  $\gamma$ H2AX-Foci Analyse vor allem in gut perfundierten und nicht hypoxischen Bereichen bestehen. Dennoch stellt das  $\gamma$ H2AX-Verfahren eine umsetzbare und schnell verfügbare Möglichkeit dar, um die intrinsische Radioresistenz ex vivo, in vivo und in vitro zu untersuchen.

#### **1.4 Fragestellung**

Die Therapie des Glioblastoms stellt die behandelnden Mediziner noch immer vor eine herausfordernde Aufgabe. In diesem Zusammenhang sind besonders die ausgeprägte Therapieresistenz und das infiltrative Wachstum von großer Bedeutung. Einer der Gründe für diese Eigenschaften des Glioblastoms könnten Stammzellen sein. Deren Merkmale, wie kontinuierliche Selbsterneuerung, die Möglichkeit sich in verschiedene Zellarten zu differenzieren und tumorinitiierend zu wirken, sind für das Fortbestehen des Tumors von essenzieller Bedeutung [33]. Einige Autoren gehen sogar davon aus, dass eine erfolgreiche Therapie auf der Eradikation aller Stammzellen eines Tumors beruht [70, 71].

Um die Rolle der GSZ für die Radioresistenz des GB weiter zu erforschen, wurden in dieser Arbeit 10 Paare aus GSZ-Kulturen und deren ursprünglichen Tumorgewebe mit Hilfe der  $\gamma$ H2AX-Foci Analyse untersucht. Voraussetzungen für den Einschluss in diese Untersuchung war die Erstdiagnose eines IDH1-Wildtyp Glioblastoms. Ziel der Arbeit war es intertumorale Unterschiede in der Radioresistenz des GB zu zeigen, als

auch die unterschiedliche Radioresistenz zwischen Tumorgewebe und den daraus gewonnenen Stammzellen darzustellen. Wir gehen davon aus, dass GSZ-Kulturen resistenter sind als ihre ursprünglichen Tumorgewebe und dass die interindividuelle Heterogenität in den GSZ-Kulturen mit den entsprechenden ausdifferenzierten Zellen korreliert.

Die Ergebnisse dieser Fragestellung könnten besonders in der translationalen Radioonkologie von großem Interesse sein. Bislang ist die Rolle der GSZ für die Radioresistenz des GB nach unserem Wissen nicht eindeutig geklärt [70, 95]. Auch die Frage, ob von der Radioresistenz des ursprünglichen Gewebes auf die der Stammzellfraktion geschlossen werden kann, ist bislang nicht endgültig beantwortet.

Darüber hinaus wurden die Gewebe und die Gliosphäroide hinsichtlich ihrer Expression der Stammzellmarker Nestin (allgemeiner Marker), ALDH1A3 (mesenchymaler Marker) und CXCR4 (Zielmolekül) untersucht. Es sollte die Expression dieser molekularen Marker zwischen den Glioblastompaaren verglichen werden. Darüber hinaus sollten mesenchymale Stammzellen, die im Verdacht stehen besonders radioresistent zu sein [46, 96], und ein Zielmolekül (CXCR4) für eine eventuelle medikamentöse Therapie, identifiziert werden [51, 97].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

**Tabelle 1: Chemikalien**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
ABC-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
AEC-Kit	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Agarose	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
ALDH1A3-Antikörper polyklonal PA5-29188	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Animal Research Kit	Dako Deutschland, Hamburg, Deutschland
bFGF	Stemcell, Vancouver, Kanada
BrdU	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
BrdU-Antikörper Clone Bu20a	Dako Deutschland, Hamburg, Deutschland
Cell Conditioning 1	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
CXCR4-Antikörper polyklonal PA3-305	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DAB Chromogen	Dako Deutschland, Hamburg, Deutschland
Dako Faramount Medium	Dako Deutschland, Hamburg, Deutschland
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako Deutschland, Hamburg, Deutschland
DAPI	Sigma Aldrich, St Louis, USA
dH <sub>2</sub> O	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma Aldrich, St Louis, USA
DMEM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
EGF	Stemcell, Vancouver, Kanada
Ethanol	Sigma Aldrich, St Louis, USA
FBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Formaldehyd	SAV LP GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland
GFAP-Antikörper	
Hämatoxylin	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Heparin	Stemcell, Vancouver, Kanada
HEPES	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Isopropanol	VWR International, Radnor, USA
KCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich, St Louis, USA
NaCl	VWR International, Radnor, USA
Na-Pyruvat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Nestin-Antikörper N5413 rabbit	Sigma Aldrich, St Louis, USA

Nickelchlorid	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Neural Stem Cell Proliferation Supplement	Stemcell, Vancouver, Kanada
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
NS-A Basal Medium	Stemcell, Vancouver, Kanada
Penicillin und Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pimonidazol	Natural Pharmacia International, Belmont, USA
Pimonidazol-Antikörper (Mab-1 IgG1)	Hypoxypore, Burlington, USA
Superboostkit	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Soyabohnen-Trypsin-Inhibitor	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Trypsin	Gibco, Carlsbad, USA
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat	Sigma Aldrich, St Louis, USA
$\gamma$ H2AX-Antikörper	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 2: Geräte**

Name	Bezeichnung	Hersteller
Axio Imager Z1 Apotome Fluoreszenz Mikroskop		Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Brutschrank	HERA Cell 240	Thermo Fisher Scientific , Dreieich , Deutschland
Cryofreezer	Cryo 1 Freezing Container	Nalgene - Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Deckgläser	24x60 mm	Langenbrick, Emmendingen, Deutschland
Einbettkassetten		Edelbrecht, Edermünde, Deutschland
Eppendorfpipette		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorfreaktionsgefäß		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr-Comfort	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Herafreezer	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kryoröhrchen	1,8ml Cryofreeze	Scientific Specielities Ing., Lodi, USA
Linearbeschleuniger	6 MV Photonen	Elekta, Stockholm, Schweden
Mikroskop	Carl-Zeiss Imager Z1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop	Weilovert S	Hund, Wetzlar, Deutschland

Mikrotom		Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Nanozoomer		Hamamatsu, Photonics, Hamamatsu, Japan
Objektträger	TOMO IHC Adhesive Glass Slide	Matsunami Glass Ind., Osaka, Japan
Petrischalen	60x15 mm, 100x20 mm	Corning, Corning, USA
Petrischalen	35X10 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
Reaktionsgefäß	15; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette	Costar 2;5;10;25 ml	Corning, Corning, USA
Skalpell		B. Braun, Melsungen, Deutschland
Sterilbank		BDK Luft und Reinraumtechnik, Sonnenbühl, Deutschland
Vollautomatisches Färbesystem für IHC	Ventana Benchmark Immunohistochemistry System	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Wasserbad	C10	Haake - Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Zellkulturflasche	T25	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche	T75	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellsieb	40 µm	Falcon - VWR International, Radnor, USA
Zentrifuge	5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 3: Software**

Name	Version	Hersteller
Tissue Definiens Studio		Definiens Inc., Carlsbad, USA
Zen lite	blue edition	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
NDP.view2		Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan
ImageJ		NIH, Bethesda, USA
GraphPad	Prism 8	GraphPad Software, San Diego, USA

**Tabelle 4: Lösungen**

<b>Name</b>	<b>Bestandteile</b>	<b>Menge</b>
Hämatoxylin (1l)	Natriumiodat	0,2g
	Hämatoxylin (kristallin)	1g
	Zitronensäuremonohydrat	1g
	Chloralhydrat	50g
	Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	50g
Epitope Retrieval A (0,1M)	Zitronensäuremonohydrat	21,01g in 1l
		destilliertem Wasser
Epitope Retrieval B (0,1M)	Tri-Natrium-Zitrat-Dihydrat	29,44g in 1l
		destilliertem Wasser
Zitrat-Puffer	Epitope Retrieval A (0,1M)	82ml
	Epitope Retrieval B (0,1M)	18ml
	destilliertes Wasser	900ml
Nickelchlorid (30%)	Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat	30g in 100ml
		destilliertem Wasser
PBS	Natriumchlorid	80g
	Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat	14,4g
	Kaliumchlorid	2g
	Dikaliumhydrogenphosphat	2g
	destilliertes Wasser	10l
Agarosegel	Agarose	1,5%
	DMEM	98,5%
DMEM Ex-Vivo Medium	HEPES	2%
	Natrium-Pyruvat	1%
	Nicht-Essentielle Aminosäuren	1%
	Penicillin/Streptomycin	1%
	FBS	10%
	DMEM	85%
NSC-Medium (500ml)	NS-A Basal Medium	450ml
	Neural Stem Cell Proliferation Supplement	50ml
	EGF	10mg
	bFGF	5mg
	Heparin (0,2%)	500µl

## 2.2 Berechnungen - Immunhistochemie

Die Berechnungen der Lösungen waren abhängig von der Gesamtanzahl (n) der zu färbenden Schnitte pro Durchgang. Des Weiteren wurde mit einem Volumen von 100 µl pro Lösung und Schnitt gerechnet.

**Tabelle 5: BrdU-Antikörper (Clone Bu20a) und Animal Research Kit**

Reagenz	Berechnung
Anti-BrdU-Konzentration	262 µg/ml
Antikörper-Verdünnung	1/50
Gesamtvolumen	$V_{\text{ges}} = n \cdot V_{\text{Schnitt}} = n \cdot 100 \mu\text{l}$
Volumen BrdU-Antikörper	$V_{\text{Ak}} = V_{\text{ges}} \div 50$
Volumen Biotinylierung	$V_{\text{Bio}} = \left( 262 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \div 100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) \cdot V_{\text{Ak}}$
Volumen Blocking Reagenz	$V_{\text{Block}} = V_{\text{ges}} \div 25$
Volumen PBS	$V_{\text{PBS}} = V_{\text{ges}} - (V_{\text{Ak}} + V_{\text{Bio}} + V_{\text{Block}})$

**Tabelle 6: DAB-Chromogen**

Reagenz	Berechnung
DAB-Liquid-Substrate	$V_{\text{Sub}} = n \div 10$ (immer aufrunden)
DAB-Chromogen	ein Tropfen für jeden ml DAB-Liquid-Substrate
Nickelchlorid	2,5 µl für jeden ml DAB-Liquid-Substrate

**Tabelle 7: Peroxidase Löschpuffer (0,3%)**

Reagenz	Berechnung
Gesamtvolumen	$V_{\text{ges}} = n \cdot V_{\text{Schnitt}} = n \cdot 100 \mu\text{l}$
Volumen Wasserstoffperoxid (stock = 30%)	$V_{\text{H}_2\text{O}_2} = V_{\text{ges}} \div 100$
Volumen PBS	$V_{\text{PBS}} = V_{\text{ges}} - V_{\text{H}_2\text{O}_2}$

**Tabelle 8: Blocking Serum (Vectastain ABC-kit)**

Reagenz	Berechnungen
Volumen PBS	10 ml
Volumen Serum	3 Tropfen (150 $\mu\text{l}$ )

**Tabelle 9: Pimonidazol-Antikörper (ABC-kit)**

Reagenz	Berechnungen
Anti-Pimonidazol-Konzentration	500 $\mu\text{g/ml}$
Verdünnung Anti-Pimonidazol	1/100
Gesamtvolumen	$V_{\text{ges}} = n \cdot V_{\text{Schnitt}} = n \cdot 100 \mu\text{l}$
Volumen Antikörper	$V_{\text{Ak}} = V_{\text{ges}} \div 100$
Volumen Blocking Serum	$V_{\text{S}} = V_{\text{ges}} - V_{\text{Ak}}$

**Tabelle 10: Biotinylierter Antikörper (ABC kit)**

Reagenz	Berechnung
Volumen PBS	10 ml
Volumen Serum	3 Tropfen (150 $\mu\text{l}$ )
Biotinylierungsantikörper	1 Tropfen (50 $\mu\text{l}$ )

**Tabelle 11: Vectastain ABC-Elite Reagenz**

Reagenz	Berechnung
Volumen PBS	5 ml
Volumen Reagenz A	2 Tropfen (100 µl)
Volumen Reagenz B	2 Tropfen (100 µl)

**Tabelle 12: AEC kit**

Reagenz	Berechnung
destilliertes Wasser	4 ml
Acetat Puffer	2 Tropfen
AEC Chromogen	1 Tropfen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3 %)	3 Tropfen

### 2.3 Berechnungen - Immunfluoreszenz

Die Berechnungen der Volumina sind abhängig von der Anzahl (n) an gefärbten Schnitten. Pro Schnitt wurde mit einem Arbeitsvolumen von 100 µl gerechnet.

**Tabelle 13: γH2AX-Antikörper**

Reagenz	Berechnung
Verdünnung Anti- γH2AX	1/1000
Gesamtvolumen	$V_{\text{ges}} = n \cdot V_{\text{Schnitt}} = n \cdot 100 \mu\text{l}$
Volumen Antikörper	$V_{\text{Ak}} = V_{\text{ges}} \div 1000$
Volumen Blocking-Reagenz	$V_{\text{Block}} = V_{\text{ges}} - V_{\text{Ak}}$

**Tabelle 14: Tyramid Amplifikation**

Komponente	Anzahl der Slides				
	5	10	20	50	100
100X Tyramid Stammlösung	5µl	10 µl	20 µl	50 µl	100 µl
100X H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Lösung	5 µl	10 µl	20 µl	50 µl	100 µl
X Reaktionspuffer	500 µl	1 ml	2 ml	5 ml	10 ml

**Tabelle 15: Stop Reagenzlösung**

Reagenz	Berechnung
Gesamtvolumen	$V_{\text{ges}} = n \cdot V_{\text{Schnitt}} = n \cdot 100 \mu\text{l}$
Verdünnung Stop Reagenz	1/11
Volumen Stop Stammlösung	$V_{\text{Stop}} = V_{\text{ges}} \cdot \frac{1}{11}$
Volumen PBS	$V_{\text{PBS}} = V_{\text{ges}} - V_{\text{Stop}}$

**Tabelle 16: DAPI**

Reagenz	Berechnung
Gesamtvolumen	$V_{\text{ges}} = n \cdot V_{\text{Schnitt}} = n \cdot 100 \mu\text{l}$
Verdünnung DAPI	1/1000
Volumen DAPI	$V_{\text{DAPI}} = V_{\text{ges}} \div 1000$
Volumen PBS	$V_{\text{PBS}} = V_{\text{ges}} - V_{\text{DAPI}}$

## 2.4 Studiendesign

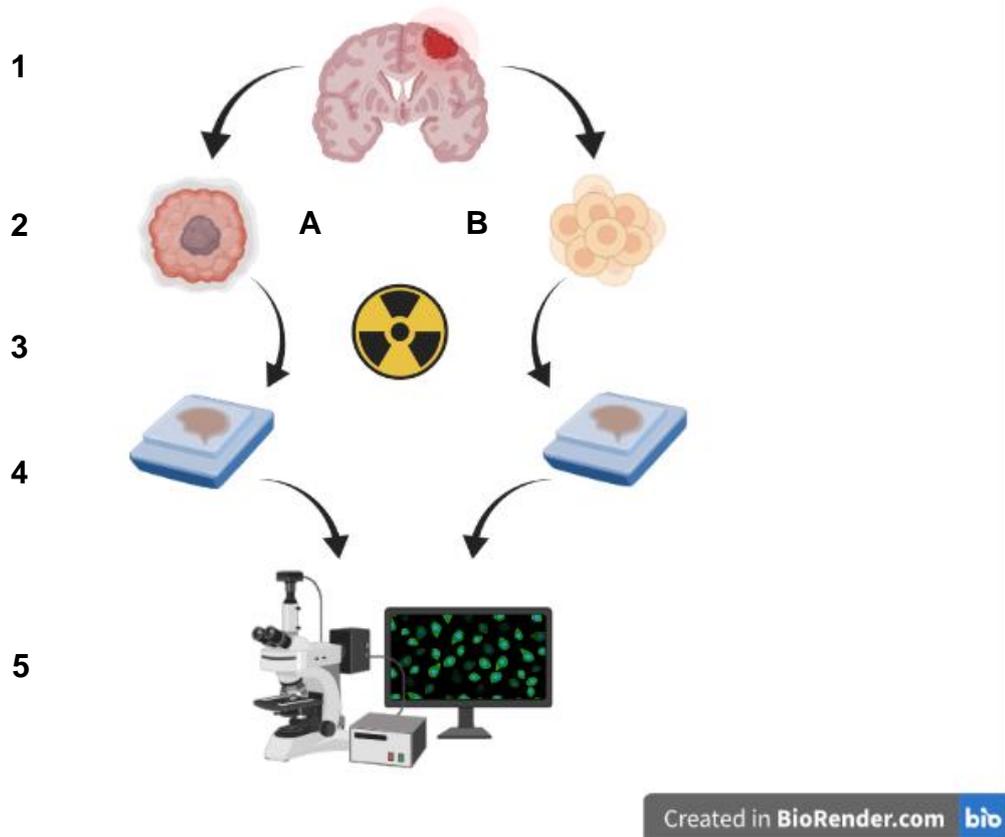
Für die Durchführung der Untersuchung lag ein Votum der Ethikkommission (EK 184/2015BO2) vor. Die Glioblastomresektate (n=10) wurden in zwei Anteile geteilt. Ein Teil diente der ex-vivo-Analyse [65]. Hierbei wurde die Strahlenresistenz der

Tumorproben, die zum Großteil aus Zellen ohne Stammzellcharakter bestehen, mittels  $\gamma$ H2AX-Foci-Analyse bestimmt. Aus dem zweiten Anteil wurden GSZ mit Hilfe eines experimentellen Neurosphäroidprotokolls gewonnen [37]. Die daraus gewonnenen Zellen wurden ebenfalls auf ihre Strahlenresistenz mit einer  $\gamma$ H2AX-Foci-Analyse untersucht. Sowohl das Resektat als auch die gewonnenen Stammzellen wurden mit 0 Gy, 4Gy und 8 Gy bestrahlt. Anschließend wurden an den in Paraffin eingebetteten Proben die Stammzellmarker ALDH1A3, Nestin und CXCR4, sowie der Differenzierungsmarker GFAP am Institut für Neuropathologie Tübingen angefärbt. Das Design des Projekts ist in Abbildung 4 dargestellt. Das experimentelle Vorgehen wurde bereits in der eigenen Publikation [1] veröffentlicht und detailliert beschrieben.

## 2.5 Ex-Vivo Assay

Für die Versuche wurden OP-Resektate von Patienten mit der Erstdiagnose eines primären Glioblastoms genutzt. Das Patientenmaterial stammte aus dem Universitätsklinikum für Neurochirurgie Tübingen. Die Diagnose wurde durch Neuropathologen im Schnellschnittlabor, sowie in der Nachuntersuchung validiert. Das Resektat wurde im OP in DMEM-Medium (1%-Penicillin/ Streptomycin) überführt und noch am selben Tag verarbeitet.

Ein Teil des Resektats wurde für die Bestimmung der ex-vivo Radioresistenz genutzt [64, 65]. Das Resektat wurde in 2-3 mm große Stücke zerkleinert und in agarosebeschichteten Petrischalen mit 3 ml ex-vivo Medium platziert. Der Ansatz inkubierte für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank. Vier Stunden vor Bestrahlung wurde das Medium komplett abgenommen und durch frisches Medium ersetzt, das mit 20  $\mu$ M Pimonidazol und 10  $\mu$ M BrdU versetzt worden war. Die Bestrahlung erfolgte mit einem 6 MV Linearbeschleuniger (Elekta) mit 0 Gy, 4 Gy und 8 Gy. Im Anschluss an die Bestrahlung wurde erneut auf Medium ohne Pimonidazol und BrdU zurückgewechselt. Die Resektate inkubierten danach für 24 Stunden bei oben genannten Bedingungen. Nach Inkubation wurden die Tumorproben in 4%-igem Formaldehyd für mindestens 72 Stunden fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.



**Abbildung 4: Studiendesign**

**1)** Resektion des GB und Transport in das Labor **2A)** Tumorgewebe für die ex-vivo Analyse wird in Petrischalen vorbereitet und inkubiert. **2B)** Aus einem Teil des Resektats werden mit Hilfe des Neurosphäroidprotokolls sogenannte Gliosphäre kultiviert. **3)** Bestrahlung des Gewebes und der Gliosphäre mit 0 Gy, 4 Gy und 8 Gy. Vier Stunden vor Bestrahlung wurden die Proben mit Pimonidazol und BrdU behandelt. **4)** Einbetten der Proben in Paraffin und Färbung der Schnitte (HE, Pimonidazol/BrdU, Nestin, ALDH1A3, GFAP, CXCR4 und  $\gamma$ H2AX). **5)** Mikroskopische Auswertung der histologischen Schnitte. Die  $\gamma$ H2AX-Schnitte wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Die Färbungen der Stammzellmarker wurden mit dem Programm Tissue Definiens Studio analysiert.

## 2.6 Zellkultur

### 2.6.1 Zellisolation und Kultivierung der Gliosphäre

Für die Isolation von Zellen aus den OP-Resektaten wurde ein Protokoll für die Kultivierung von Neurosphären verwendet [37]. Hierfür wurde die Tumorprobe mit Hilfe eines 10er Skalpell zerkleinert, um die Oberfläche für die anschließende 15-minütige Trypsinierung bei 37°C zu vergrößern. Ein Teil des nicht trypsinierten Materials wurde mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach wurde die Reaktion mit der gleichen Menge an Soyabohnen-Trypsin-Inhibitor gestoppt. Es folgte ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt bei 800 rpm. Der verbleibende Überstand wurde verworfen. Darauf folgte eine Resuspension mit 1 ml Neurocult NS-A Basal Medium. Die Zellsuspension wurde dann auf 15 ml mit NS-A Basal Medium aufgefüllt und durch

ein 40 µm Zellsieb filtriert. Die filtrierte Lösung wurde erneut bei 800 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Darauf folgte eine erneute Resuspension des Zellpellets in 5 ml NSC-Medium. Pro T25-Zellkulturflasche mit 6 ml komplettem NSC-Medium wurden 500 µl Zellsuspension und 60 µl Penicillin/Streptomycin-Lösung hinzugegeben. Die restlichen 4,5 ml Zellsuspension wurden mit 0,5 ml DMSO aufgefüllt und in 5 Kryoröhrchen verteilt und anschließend im Gefrierbehälter mit Isopropanol stufenweise auf -80 °C im Gefrierschrank eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden danach in einem Stickstofftank bei -196 °C gelagert.

### **2.6.2 Expansion und Passagieren der Zellkultur**

Das Passagieren und die Expansion der Zellen wurden nach dem Protokoll für die Kultivierung von Neurosphäroiden durchgeführt [37]. Die GSZ wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Jeden zweiten Tag wird pro Flasche 10% des Ausgangsvolumens an komplettem NSC-Medium hinzugefügt, um ein konstantes Niveau der Wachstumsfaktoren zu gewährleisten. Nach ca. 7 Tagen waren erste Spheres sichtbar. Sobald die Spheres eine Größe von 150-200 µm erreicht hatten, wurden sie passagiert. Hierfür war ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt bei 800 rpm nötig. Der Überstand wurde bis auf 200 µl verworfen. Anschließend konnten die Spheres durch kontinuierliches auf- und abpipettieren mit einer 200 µl Eppendorfpipette mechanisch vereinzelt werden. Ungefähr ein Tropfen der Zellsuspension wurde in 10 ml komplettem NSC-Medium in einer T75-Zellkulturflasche ausgesät. Die restliche Zellsuspension wurde in ein Eppendorf Tube überführt und bei 800 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde anschließend abgenommen und das Zellpellet auf Trockeneis eingefroren und danach bei -80°C gelagert.

### **2.6.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Die Zellen wurden zunächst genau wie beim Passagieren behandelt und mechanisch vereinzelt. Die 200 µl Zellsuspension wurden mit 4,3 ml NSC-Medium verdünnt und anschließend wurden 0,5 ml DMSO zugegeben. Die Suspension konnte danach auf 5 Kryoröhrchen aufgeteilt werden und im Gefrierbehälter mit Isopropanol stufenweise

auf -80 °C innerhalb von 24 Stunden runtergekühlt werden. Die Röhren wurden danach im Stickstofftank bei -196 °C aufbewahrt.

Das Kryoröhrchen wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension konnte anschließend mit dem vierfachen an NSC-Medium verdünnt werden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 800 rpm mit nachfolgender Abnahme des Überstandes. Das so gewonnene Zellpellet wurde in 2 ml NSC-Medium resuspendiert und in eine T25-Zellkulturflasche mit 4 ml NSC-Medium zugegeben.

#### **2.6.4 Bestrahlung und Fixierung der Gliospheres**

Ab einer Größe von ca. 200-300 µm wurden die Spheres für die Bestrahlung verwendet. Hierfür war ein Wechsel des Mediums (NSC-Medium; 20 µM Pimonidazol und 10 µM BrdU) vier Stunden vor Bestrahlung nötig. Nach der Bestrahlung fand erneut ein Wechsel des Mediums auf das NSC-Medium statt. Danach inkubierten die Zellkulturen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> für weitere 24 Stunden im Brutschrank. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 800 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Fixierung des Zellpellets erfolgte danach in 4 %-igem Formaldehyd für mindestens 72 Stunden. Das fixierte Zellpellet konnte anschließend in Paraffin eingebettet werden.

## **2.7 Histologische Färbungen**

### **2.7.1 Vorbereitung der Schnitte für die Färbungen**

Die paraffinierten Gewebe- bzw. Zellblöcke wurden mit Hilfe eines Mikrotoms in 3 µm dicke Proben geschnitten. Dabei wurden drei konsekutive Schnitte angefertigt, jeweils für die HE-Färbung, die immunhistochemische Pimonidazol- BrdU- Färbung und die γH2AX- Immunfluoreszenzfärbung. Die Schnitte wurden nachfolgend auf Objektträger aufgezogen, welche für 12 Stunden vor der Färbung bei 37 °C getrocknet wurden.

Die Deparaffinierung und die Epitop Demaskierung erfolgten, wie bereits in [1, 64, 65] publiziert. Für die Deparaffinierung dienten 100%-ige Xylolbäder für 3 x 10 min. Im nächsten Schritt erfolgte eine Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 100%, 96%, 80%, 70%, 40%) für jeweils 3 min pro Konzentration. Abschließend wurden die Schnitte für mindestens eine Minute in PBS gewaschen. Die

Demaskierung der Epitope erfolgte in einer Citrat-Puffer-Lösung (1,8 mM Zitronensäure-Monohydrat und 8,2 mM Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat). Hierfür wurden die Objektträger für 30 min bei 595 W in der Mikrowelle gekocht. Anschließend folgte eine Kühlung der Objektträger auf Eis für mindestens 15 min. Zum Schluss wurden die Schnitte für 5 min in PBS gewaschen.

### 2.7.2 Färbeprotokoll Immunhistochemie (Pimonidazol- und BrdU-Färbung)

Die immunhistochemische Pimonidazol- und BrdU-Färbung wurde wie bereits publiziert durchgeführt [1, 64, 65]. Sie diente der Darstellung von hypoxischen (Pimonidazol-positiven) Tumorbereichen, sowie der Abbildung von stark proliferierenden Zellen (BrdU-positiv). Die Inkubation der Lösungen erfolgte stets in Dunkelheit und bei hoher Luftfeuchtigkeit. Nach jedem Schritt folgte ein Waschschriff mit PBS für 3 x 3 min. Die einzigen Ausnahmen bilden die Hemmung unspezifischer Antikörperbindungen mit Hilfe des *Blocking Serums* und die Zellkernfärbung mit Hämatoxylin.

Zunächst wurde die BrdU-Färbung (Berechnung siehe 2.2 Berechnungen Immunhistochemie) durchgeführt. Die Lösung aus PBS, dem Biotinylierungsreagenz und Anti-BrdU inkubierte für 15 min bevor das *Blocking-Reagenz* hinzugefügt wurde. Die gesamte Lösung inkubierte anschließend noch einmal 5 min. Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte mit Hilfe eines *Peroxidase-Blocking-Reagenz* (Animal Research Kit, Dako). Dieses inkubierte für 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Applikation des primären BrdU-Antikörpers und der Biotinylierung für 15 min bei 37°C. Der anschließend applizierte Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Animal Research Kit, Dako) bindet mit hoher Affinität an Biotin, wobei das Enzym anschließend einen stabilen Farbstoff bildet [98]. Die Inkubation dauerte ebenfalls 15 min und fand bei Raumtemperatur statt. Nach Zugabe des DAB-Chromogens (Berechnung siehe 2.2 Berechnungen Immunhistochemie) verblieben die Lösungen 5 min auf den Schnitten. Durch die Peroxidase wurde das DAB oxidiert [98]. Dies sorgte für die bräunliche Färbung proliferierender Glioblastomzellen. Es folgte die Pimonidazolfärbung, die als indirekte Färbung nach der ABC-Methode durchgeführt wurde. Hierfür wurde die endogene Peroxidaseaktivität mittels eines 0,3%-igen Peroxidase Löschpuffers (Berechnung siehe 2.2 Berechnungen Immunhistochemie) für 10 min reduziert. Anschließend wurde das *Blocking Serum* (Berechnung siehe 2.2

Berechnungen Immunhistochemie) auf die Schnitte gegeben. Dieses diente der Hemmung unspezifischer Antikörperbindungen bevor der eigentliche Antikörper appliziert wurde. Damit wurde sichergestellt, dass der Antikörper nur spezifische Bindungen eingeht. Es folgte die Zugabe des Antikörpers gegen Pimonidazol (Berechnung siehe 2.2 Berechnungen Immunhistochemie). Dieser inkubierte für 60 min bei 37°C auf den Schnitten. Bei dem primären Antikörper handelte es sich um einen monoklonalen Mausantikörper gegen Pimonidazol. Danach folgte die Applikation des sekundären biotinylierten Antikörpers (Berechnung siehe 2.2 Berechnungen Immunhistochemie). Dieser verblieb für 30 min auf den Schnitten. Der biotinylierte Antikörper richtet sich gegen die konstante Region des primären Antikörpers und amplifiziert das Signal, indem eine Vielzahl der ABC-Komplexe (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe) an den biotinylierten Antikörper binden [98]. Für die Bindung der ABC-Komplexe (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe) wurde anschließend das Vectastain ABC Elite Reagenz (Berechnung siehe 2.2 Berechnungen Immunhistochemie) appliziert und für 30 min auf den Schnitten inkubiert. Für die rötliche Färbung sorgte das AEC-Chromogen (Berechnung siehe 2.2 Berechnungen Immunhistochemie), das danach zugegeben wurde und für weitere 20 min auf den Schnitten verblieb [98]. Im Anschluss wurde Hämatoxylin (siehe Tabelle 4: Lösungen) für die Kernfärbung für eine Minute auf die Schnitte gegeben und anschließend unter Leitungswasser gebläut. Bevor die Schnitte mit Dako Faramount Medium unter Deckgläschen eingebettet wurden.

### **2.7.3 Nestin-, ALDH1A3- CXCR4- und GFAP-Färbungen**

Die Färbungen der Stammzellmarker wurden im Neuropathologischen Institut des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Die Färbungen erfolgten maschinell mit dem Ventana Benchmark Immunohistochemistry System. Für die Nestin Färbungen wurden die Schnitte mit Cell Conditioning 1 für 32 min vorbehandelt. Der Antikörper wurde 1:200 verdünnt und inkubierte 32 min bei 37°C. Die ALDH1A3 Färbungen wurden 16 min mit Cell Conditioning 1 vorbehandelt, während der Antikörper, mit einer Verdünnung von 1:500, 32 min bei Raumtemperatur inkubierte. Für die CXCR4 Färbungen wurden die Schnitte 32 min mit Cell Conditioning 1 vorbehandelt. Die Verdünnung des Antikörpers betrug 1:4000 bei einer Inkubationszeit von 32 min bei Raumtemperatur. Die Färbungen des Differenzierungsmarkers GFAP wurden nach dem klinischen Routineprotokoll des Instituts für Neuropathologie Tübingen durchgeführt.

#### 2.7.4 Färbeprotokoll Immunfluoreszenz ( $\gamma$ -H2AX-Färbung)

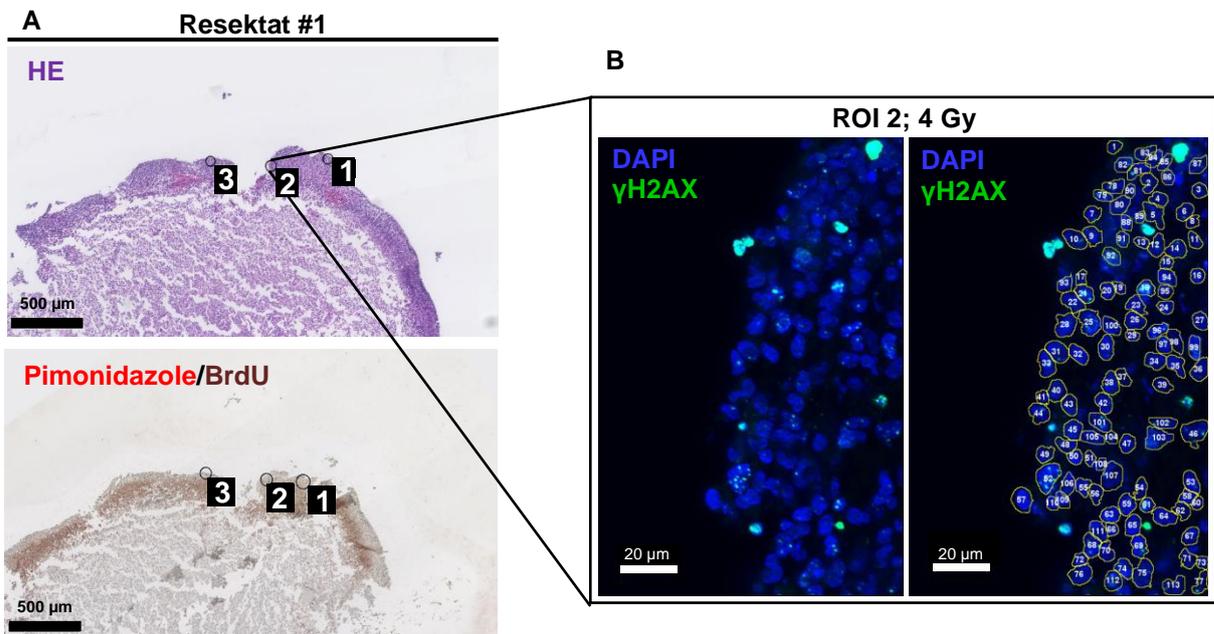
Die Immunfluoreszenzfärbung residueller Doppelstrangbrüche in der DNA wurde mit dem *Superboostkit* (Invitrogen) durchgeführt. Die Inkubation der Lösungen wurde in einer dunklen Umgebung mit hoher Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Zunächst wurde die endogene Peroxidase mit Hilfe eines 3%-igen Löschpuffers (*Superboostkit*, Invitrogen) gehemmt. Dieser Vorgang dauerte 60 min. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 Minuten wurde das *Blocking-Reagenz* (*Superboostkit*, Invitrogen) zugegeben. Die Schnitte inkubierten nachfolgend für 60 min bei 37°C. Anschließend wurde der primäre Antikörper gegen  $\gamma$ H2AX (Berechnung siehe 2.3 Berechnungen Immunfluoreszenz) appliziert und für 60 Minuten inkubiert. Bei dem  $\gamma$ H2AX-Antikörper handelte es sich um einen monoklonalen Mausantikörper. Es folgte ein Waschschritt in PBS für 4 x 5 min. Die Waschschritte wurden nun nach jedem weiteren Schritt durchgeführt. Danach folgte die Applikation des HRP (*horseradish peroxidase*) konjugierten sekundären Antikörpers (*Superboostkit*, Invitrogen), der an den primären Antikörper bindet. Die Schnitte wurden erneut gemeinsam mit den Lösungen für 60 min inkubiert. Für die Signalverstärkung wurde anschließend Tyramid (Berechnung siehe 2.3 Berechnungen Immunfluoreszenz) zugegeben, welches mit 488 Alexa konjugiert wurde. Dieses inkubierte für 10 min auf den Schnitten. Das Tyramid wird durch die an den sekundären Antikörper gebundene Peroxidase oxidiert und so aktiviert, wodurch es in großer Menge an Proteine binden kann [99]. Durch UV-Licht kann dann der Fluoreszenzfarbstoff angeregt werden. Um die Tyramidamplifikation zu beenden wurde eine Stop Reagenzlösung (Berechnung siehe 2.3 Berechnungen Immunfluoreszenz) verwendet. Für die Kernfärbung wurde DAPI verwendet, das für weitere 10 min inkubiert. Dadurch konnten  $\gamma$ H2AX-Foci eindeutig einzelnen Zellkernen zugeordnet werden und somit von unspezifischen Hintergrundfärbungen differenziert werden. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Dako Fluorescent Mounting Medium eingebettet.

### 2.8 Mikroskopie

Die Pimonidazol- und BrdU-Färbungen, sowie die HE-Färbungen (Hämatoxylin-Eosin), die durch das Pathologische Institut der Universität Tübingen durchgeführt wurden, sind mit dem Hamamatsu Nanozoomer eingescannt und digitalisiert worden (siehe Abbildung 5 A ). Auf den Schnitten wurden anschließend Pimonidazol-negative Bereiche mit BrdU-positiven Zellen ausgewählt (siehe Abbildung: 5A). Pro Schnitt

wurden 3-5 Bereiche markiert. Ein Neuropathologe (Prof. Schittenhelm) des Pathologischen Instituts der Universität Tübingen validierte nachfolgend in den analogen Bereichen im HE-Schnitt die Diagnose GB. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, dass Bereiche ausgewählt wurden, die kaum Blutgefäße aufweisen, wenige Lymphozyten zeigen und einen hohen Tumorzellgehalt haben (siehe Abbildung: 5A). Es wurde darauf geachtet, dass je Probe aus mindestens zwei Bereichen Aufnahmen akquiriert wurden. Dies war aufgrund nur weniger geeigneter Areale bei der 8 Gy Probe des Patienten Nummer 8 nicht möglich. Anhand der HE-Färbung und der immunhistochemischen wurden nun die entsprechenden Areal in der Immunfluoreszenzmikroskopie aufgesucht.

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Carl-Zeiss Imager Z1 und dem Carl Zeiss Apotome (beides Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Hierfür wurden die Bereiche aus den HE- und Pimonidazol-BrdU-Färbungen aufgesucht (siehe Abbildung 5 B). Für die Aufnahmen wurde die EGFP-Belichtungsdauer konstant bei 50 ms über alle Schnitte eingestellt. Die DAPI-Belichtungsdauer wurde bei den einzelnen Proben variiert. Es wurden pro Bereich 17 Aufnahmen akquiriert mit einem Abstand auf der z-Achse von je 0,25 µm. Die Aufnahmen wurden anschließend mit der Funktion *Maximum Intensity Projection* (Zen lite blue, Zeiss) nachbearbeitet. Darüber hinaus wurden die Kontrastwerte für EGFP konstant im Bereich von 20 bis 180 nachkorrigiert (Ausnahme GSCs Patient 5 mit maximal 280).



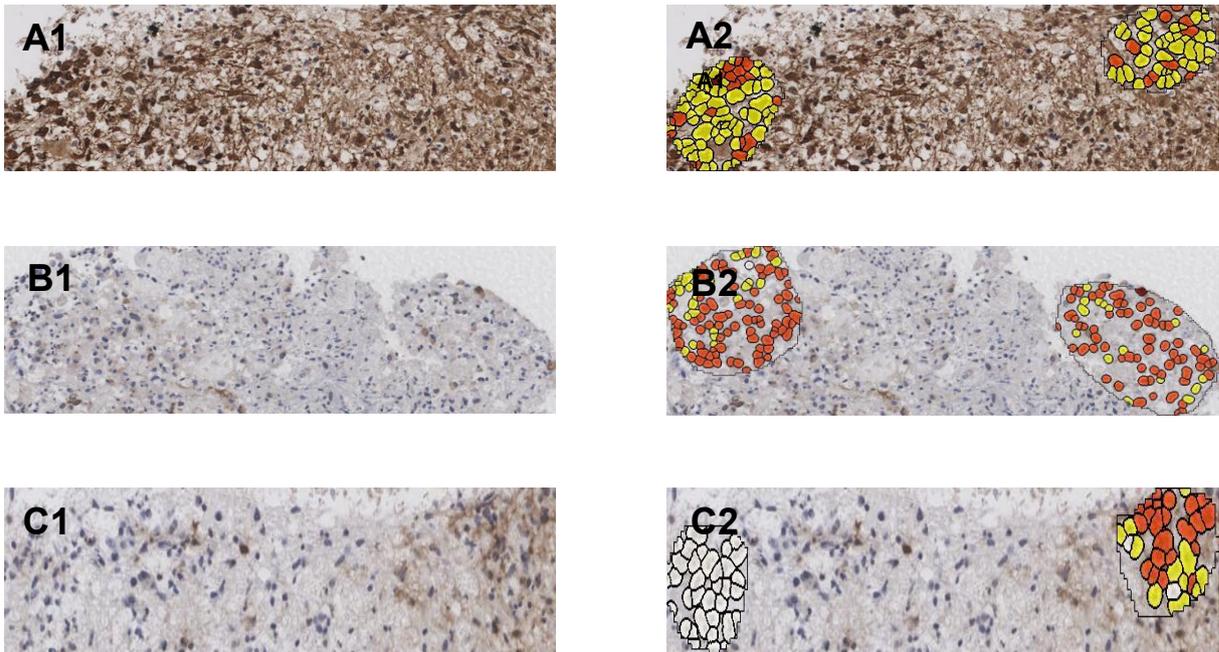
**Abbildung 5: Bestimmung der ROI und  $\gamma$ H2AX Analyse am Patient #1; adaptiert aus Riedel et al. (2021), *gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture***

**A)** HE und Pimonidazol/ BrdU-Färbung eines chirurgischen Resektats des Patienten #1. Hypoxische, pimonidazol-positive Bereiche sind rötlich gefärbt, während proliferierende, BrdU-positive Zellen dunkelbraun gefärbt sind **B)** Konsekutiver Immunfluoreszenz-Schnitt des ROI 2 des chirurgischen Resektats #1. DAPI positive blau gefärbte Areale zeigen Nuclei.  $\gamma$ H2AX - Foci sind grün gefärbt. Auf der zweiten Abbildung sind die markierten und nummerierten Nuclei für die Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Analyse vorbereitet.

## 2.9 Statistische Analyse

### 2.9.1 Auswertung der Stammzellmarkerfärbungen

Sowohl die Resektate, als auch die Gliosphäroide wurden hinsichtlich ihrer Nestin, CXCR4 und ALDH1A3 Expression bei 0 Gy untersucht. Hierfür wurden am pathologischen Institut der Universität Tübingen immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die Schnitte wurden anschließend mit dem *Hamamatsu Nanozoomer* eingescannt und in das Programm *Tissue Definiens Studio* (TDS) eingelesen. Es wurden die zwei Bereiche von Interesse (*ROI*) aus der  $\gamma$ H2AX-Analyse verwendet. Die Schnitte wurden mit Hilfe der Software automatisch hinsichtlich ihrer Farbintensität für DAB ausgewertet (siehe Abbildung 6). Dabei wurde zwischen den Punktzahlen: negativ (0), niedrig (1), intermediär (2) und hoch (3) unterschieden (siehe Abbildung 6). Die genauen Einstellungen der automatischen Auswertung durch das Programm sind in Tabelle 23 im Anhang dargestellt.



**Abbildung 6: Auswertung der Stammzellmarkerfärbungen (Nestin, ALDH1A3, CXCR4)**

**A1)** Ex vivo Nestin Färbung Patient #10 **A2)** Nestin Punktzahl mit TDS-Software; weiß-0, gelb-1, orange-2, rot-3; mediane Punktzahl: 1,23 **B1)** Ex vivo ALDH1A3 Färbung Patient #5 **B2)** ALDH1A3 Punktzahl mit der TDS-Software ; mediane Punktzahl: 1,04 **C1)** Ex vivo CXCR4 Färbung Patient #10 **C2)** CXCR4 Punktzahl mit der TDS-Software; weiß-0, gelb-1, orange-2, rot-3; mediane Punktzahl: 0,79

Es wurde der Anteil an Zellen pro Punktzahl und ROI berechnet. Anschließend wurde dieser Anteil mit der Punktzahl (0-3) multipliziert und die einzelnen Werte addiert.

$$Punktzahl_{ROI} = \frac{Zellen_{negativ}}{Zellen_{total}} \cdot 0 + \frac{Zellen_{niedrig}}{Zellen_{total}} \cdot 1 + \frac{Zellen_{inter.}}{Zellen_{total}} \cdot 2 + \frac{Zellen_{hoch}}{Zellen_{total}} \cdot 3$$

Der Durchschnitt aus den zwei ROIs ergibt den Endwert der Probe. Die Berechnung ist angelehnt an [100] und wurde für Nestin in der bereits veröffentlichten Arbeit [1] angewendet.

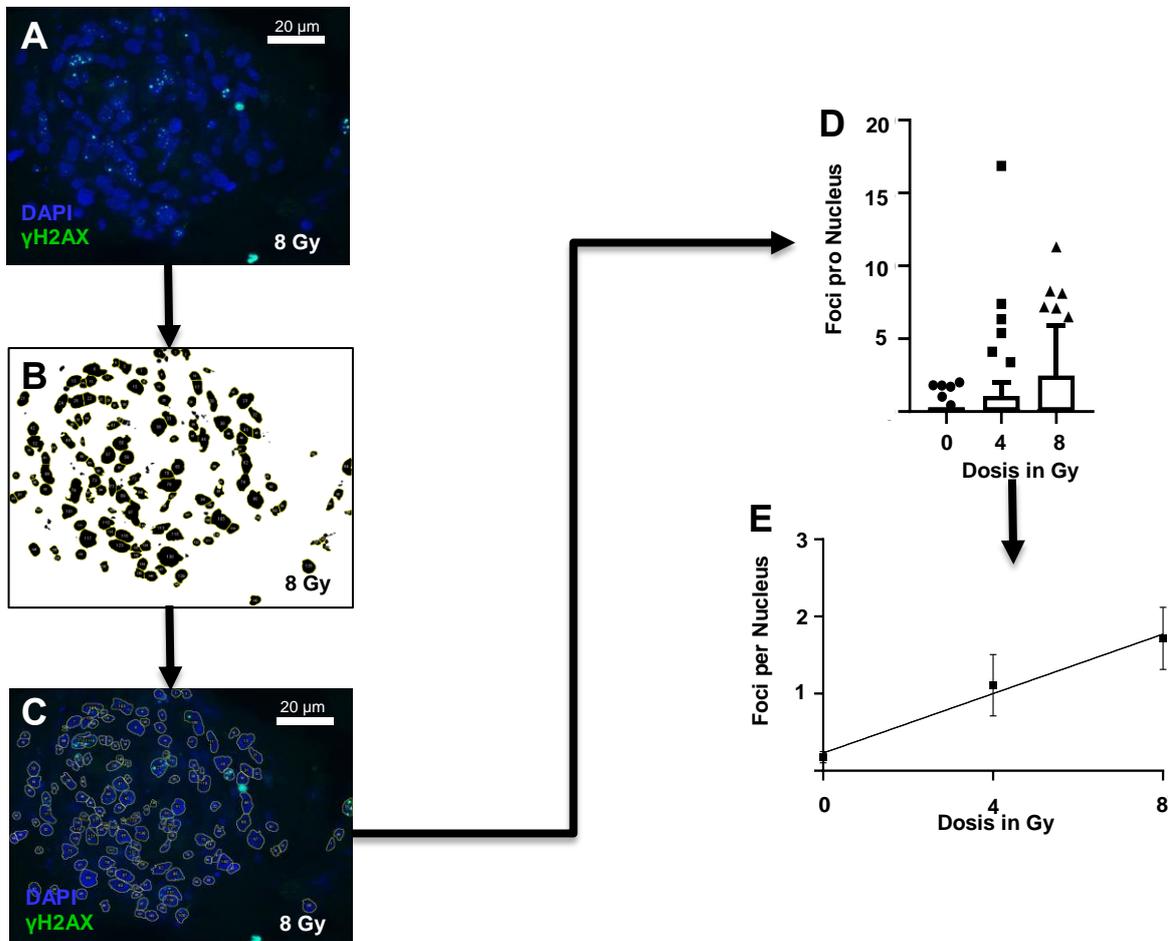
$$Punktzahl_{probe} = \frac{ROI_1 + ROI_2}{2}$$

### 2.9.2 Analyse der $\gamma$ -H2AX-Färbung

Die Bilder wurden anschließend als JPEG-Datei in ImageJ (NIH) mit Hilfe einer selbsterstellten *Macro* bearbeitet. Die *Macro* basiert auf den Funktionen Wasserscheidentransformation (*watershed*), Lückenfüllung (*fill holes*) und Partikelerkennung (*particle recognition*) (siehe Abbildung 7 A und B ). Sie wurde bereits in der Veröffentlichung [1] angewendet. Die Software markiert alle Zellkerne im

DAPI-Kanal, gibt deren Fläche an und nummeriert diese (siehe Abbildung 5 B, 7 B und C). Die Markierungen werden anschließend im zusammengeführten Bild aus DAPI- und EGFP-Kanal manuell kontrolliert und nachbearbeitet. Hierbei wurden fragmentierte und überlagert Zellkerne, sowie Zellkerne mit einer pannukleären  $\gamma$ H2AX-Färbung manuell entfernt.

#### Resektat #8; ROI 3; 8Gy



**Abbildung 7: Automatische Zellerkennung und  $\gamma$ H2AX-Foci Auswertung**

**A)** Immunfluoreszenz- $\gamma$ H2AX-Aufnahme des Resektats #8 24 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy **B)** Automatische Zellkernerkennung mittels *Macro* in ImageJ **C)** Überlagerungsbild der erkannten Nuclei mit Nummerierung mit manueller Nachbearbeitung der erkannten Zellkerne. Ergebnisse der Zählung siehe Tabelle 17 **D)** Boxplots (Tukey) der normalisierten Foci pro Zellkern am Beispiel des Resektats #8 **E)** Lineare Regression Resektat #8 und durchschnittliche Focianzahl pro Zellkern mit Standardfehler; Anstieg: 0,19 Foci/Gy; MW (0 Gy): 0,18 Foci/ Kern; MW (4 Gy): 1,11 Foci/ Kern; MW (8 Gy): 1,72 Foci/ Kern

Anschließend wurden mit einem Excel Zufallsgenerator 50 Zellen pro Probe ausgewählt. Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte, wie bereits beschrieben [1, 64, 65]. Die Foci (*Nfoci*) wurden je Kern ausgezählt und nach ihrer Größe und Intensität gewichtet. Die Ergebnisse wurden auf die durchschnittliche Kerngröße

( $Areal_m$ ) normiert und der durchschnittliche Hintergrundwert bei 0Gy ( $cfoci_{0Gy}$ ) wurde abgezogen (Berechnung siehe unten).

$$nfoci = \left( \frac{Areal_m}{Areal_i} \right) \cdot Nfoci - cfoci_{0Gy}$$

Die Foci je Kern ( $nfoci$ ) wurden anschließend gegenüber der Dosis in Gy aufgetragen und es wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego) eine Regressionsgerade erstellt (siehe Abbildung 7 D und E). Der Anstieg dieser Gerade gibt die Radiosensibilität des Gewebes wieder. Die Ergebnisse für die in der Abbildung 7 A gezeigte Probe sind in den Abbildungen 7 D und E, sowie in der Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17:  $\gamma$ H2AX-Foci Auswertung für das Resektat #8; ROI 3 nach Bestrahlung mit 8 Gy**

<b>Nucleus</b>	<b>Areal<sub>m</sub></b>	<b>N<sub>foci</sub></b>	<b>(Areal<sub>m</sub>/ Areal<sub>i</sub>)*N<sub>foci</sub></b>	<b>n<sub>foci</sub></b>
<b>9</b>	39,06	0	0	0
<b>29</b>	42,67	7	7,24	7,07
<b>65</b>	70,27	2	1,26	1,08
<b>103</b>	89,19	6	2,97	2,79
<b>146</b>	20,24	2	4,36	4,19
<b>1</b>	37,61	0	0	0
<b>20</b>	21,93	0	0	0
<b>12</b>	23,30	0	0	0
<b>83</b>	39,22	0	0	0
<b>98</b>	59,60	0	0	0
<b>132</b>	65,45	9	6,07	5,89
<b>3</b>	27,45	0	0	0
<b>145</b>	10,81	0	0	0
<b>10</b>	30,12	0	0	0
<b>109</b>	45,36	0	0	0
<b>142</b>	23,93	0	0	0

24	82,56	0	0	0
58	71,20	0	0	0
56	19,16	0	0	0
45	77,45	6	3,42	3,24
106	26,18	0	0	0
25	96,43	25	11,45	11,27
34	37,30	2	2,37	2,19
86	104,98	0	0	0
36	58,74	3	2,25	2,08
55	48,06	9	8,27	8,09
27	18,04	3	7,34	7,16
44	82,69	8	4,27	4,10
4	36,99	0	0	0
100	52,41	10	8,42	8,25
118	28,38	0	0	0
17	34,24	0	0	0
134	19,91	3	6,65	6,48
40	16,30	0	0	0
94	24,44	0	0	0

## 2.10 Patientenkollektiv

Aus der Verlaufsdokumentation und den pathologischen Berichten wurden gemäß dem Ethikantrag Patientendaten zur Auswertung herangezogen. Zu den Daten zählt: das Geschlecht, Alter, Histologie, MGMT-Status, IDH1-Status und der ATRX-Status. Das Patientenkollektiv wurde bereits in der veröffentlichten Publikation [1] beschrieben.

Die 10 GB wurden histopathologisch durch einen erfahrenen Neuropathologen (Prof. Schittenhelm) validiert. Das durchschnittliche Alter der Patienten beträgt 62,8 Jahre. Bei allen Proben handelt es sich um Glioblastome vom IDH1-Wildtyp. Die Hälfte der Proben ist MGMT methyliert und nur ein Resektat (Patient #6) weist einen ATRX-

Verlust auf. Die Resektate #2\* und #3\* stammen von einer Patientin mit einem multifokalen Befund. Bei diesen GBMs handelt es sich aber um biologisch unterschiedliche Tumoren, da nur ein Resektat MGMT methyliert ist. Aus diesem Grund wurden sie als zwei verschiedene Tumoren in die Studie aufgenommen. Das GB #4\*\* stammt von einem Patienten, der bereits präoperativ TMZ und Bestrahlung erhalten hat (siehe Tabelle 18).

Der IDH R132H Status wurde mittels Immunhistochemie ermittelt. Gewebe, das diese Mutation nicht aufwies und von Patienten stammt, die jünger als 55 Jahre alt waren, wurde mittels Sequenzierung auf Mutationen untersucht. Für die MGMT Promotor Methylierung wurden mittels Sequenzierung (PyroMark Q24, Qiagen, Hildesheim, Deutschland) die CpG Inseln 74-78 im Exon 1 des MGMT Locus untersucht. Diese Untersuchungen wurden am Neuropathologischen Institut der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt.

**Tabelle 18: Patientenkollektiv und Tumorcharakteristika, adaptiert aus Riedel et al. (2021), gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture**

Patient	Geschlecht	Alter	MGMT-Status	ATRX-Verlust
1	weiblich	63	Methyliert	-
2*	weiblich	74	Unmethyliert	-
3*	weiblich	75	Methyliert	-
4**	männlich	52	Unmethyliert	-
5	männlich	63	Methyliert	-
6	weiblich	67	Methyliert	+
7	männlich	56	Methyliert	-
8	männlich	71	Unmethyliert	-
9	männlich	45	Unmethyliert	-
10	männlich	62	Unmethyliert	-

\* Resektate stammen von einer Patientin mit einem multilokalen Befund

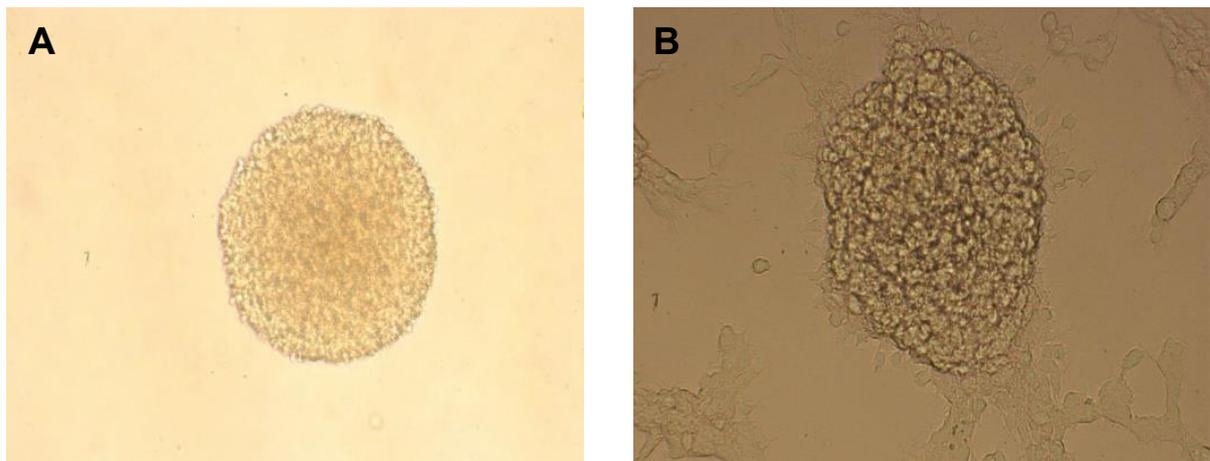
\*\* Patient erhielt bereits präoperativ TMZ und Bestrahlung

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Phänotypisierung von Gliosphäroiden unter Kulturbedingungen

Gliosphäroide sind stammzellangereicherte dreidimensionale Zellverbände. Mit Hilfe des Neurosphäroidprotokolls können sie unter Laborbedingungen *in vitro* kultiviert werden [1, 37].

Gliosphäroide weisen in der Zellkultur zwei verschiedene Phänotypen im Wachstum auf. In 7 der 10 Zellkulturen wurden freischwebende Gliosphäroide (*free floating spheres*) beobachtet. Dieser Phänotyp hat in der Zellkulturflasche untereinander und mit der Oberfläche der Flasche keine Zellkontakte (siehe Abbildung 8 A). Adhärenente Gliosphäroide (3 der 10 Zelllinien) hingegen bildeten mikroskopisch sichtbare Quervernetzungen untereinander und adhärerten teilweise mit der Oberfläche der Zellkulturflasche (siehe Abbildung 8 B). Der Phänotyp der Sphäroide blieb auch nach dem Passagieren, sowie nach dem Einfrieren und Auftauen der Zellen erhalten. Adhärenente Gliosphäroide lassen sich mechanisch vom Boden der Zellkulturflasche ablösen. Anschließend bilden sie innerhalb eines kurzen Zeitraums erneut Verbindungen aus. Diese Ergebnisse wurden bereits in [1] veröffentlicht.



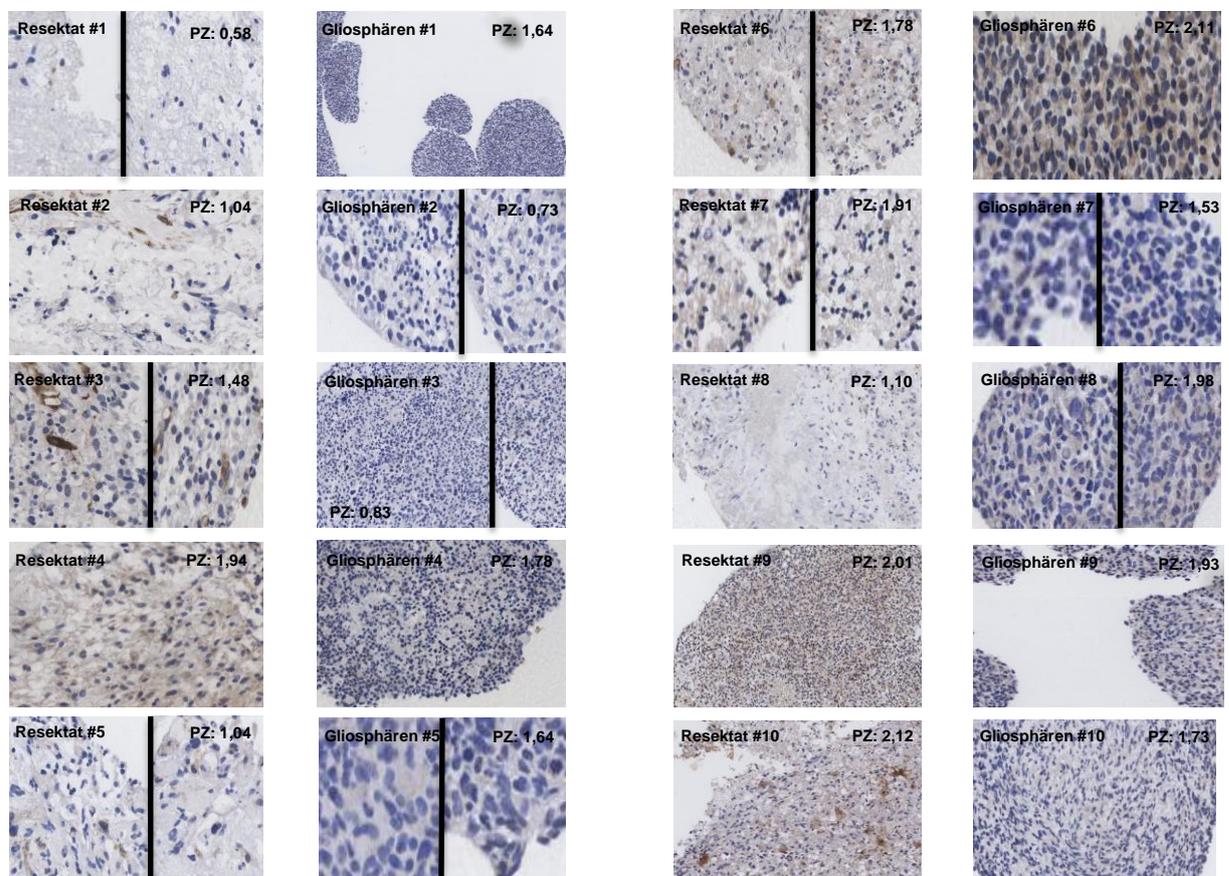
**Abbildung 8: Phänotypen von Gliosphäroiden in der Zellkultur**

**A)** Freischwebende Gliosphäroide im mikroskopischen Bild **B)** Adhärenente Gliosphäroide im mikroskopischen Bild. Deutlich sichtbar stellen sich Zell-Zell- und Zell-Bodenkontakte an den Seiten der Gliosphäre dar.

### 3.2 ALDH1A3-, CXCR4-, Nestin- und GFAP-Expression

#### 3.2.1 ALDH1A3-Expression in GB-Resektaten und Gliosphäroiden

ALDH1A3 dient der Identifizierung von mesenchymalen Stammzellen, die im Verdacht stehen wesentlich zur Radioresistenz von GB beizutragen. Die ALDH1A3 Punktzahl (PZ) stieg bei 4 der 10 Gliosphäroide im Vergleich zu deren chirurgischen Resektaten (siehe Abbildung 9 und Tabelle 24). Bei den restlichen 6 Proben fiel dieser mesenchymale Stammzellmarker. Auch bei den durchschnittlichen Punktzahlen ergab sich zwischen Resektaten und Gliosphäroiden (MW 1,50 [SD 0,53] vs. 1,59 [SD 0,46];  $p=0,93$ ; Mann-Whitney-U-Test) kein signifikanter Unterschied. Betrachtet man den Unterschied der ALDH1A3-Expression zwischen frei schwebenden und adhärennten Gliosphäroiden ergibt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied (MW: 1,65 [SD 0,41] vs. 1,45 [0,65];  $p=0,70$ ; Mann-Whitney-U-Test).

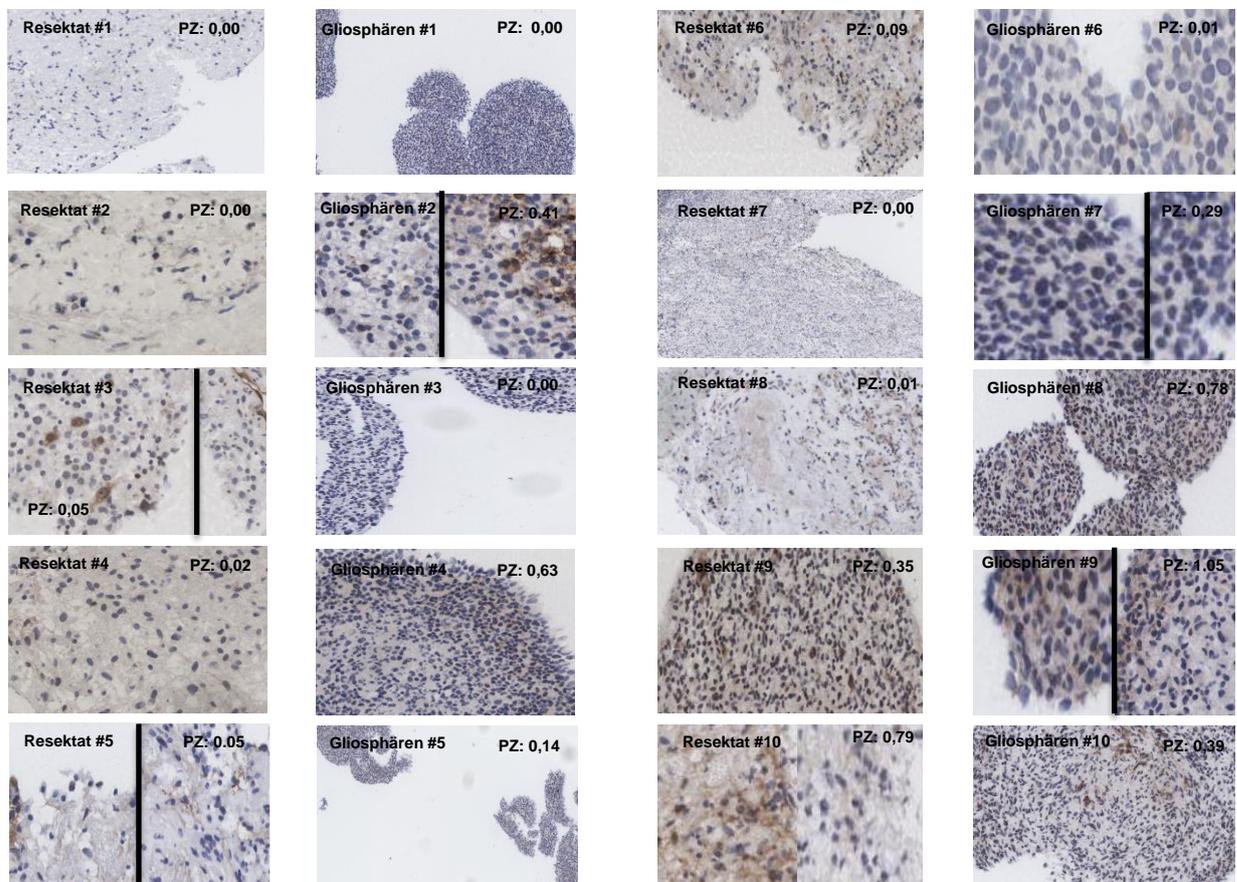


**Abbildung 9: ALDH1A3-Expression in Resektaten und Gliosphären**

Dargestellt sind immunhistochemische ALDH1A3-Färbungen an Paraffinschnitten aller 10 Glioblastomresektate und deren Gliosphäroiden. Die Intensität der Färbung wurde automatisiert mit Hilfe des Programms *Tissue Definiens Studio* analysiert. Konnten auf einer Aufnahme nicht beide ROIs dargestellt werden, so wurden die Abbildungen nachträglich zusammengefügt und mit einem Trennstrich versehen. MW (Resektate): 1,50 [SD 0,53]; MW (Gliosphäroide): 1,59 [SD 0,46]; MW (frei schwebend): 1,65 [SD 0,41]; MW (adhäriert): 1,45 [0,65]

### 3.2.2 CXCR4-Expression in GB-Resektaten und Gliosphären

CXCR4 ist ein Chemokinrezeptor, der auf Glioblastomzellen exprimiert wird. Das Protein vermittelt Proliferation, Invasion, Angiogenese und moduliert die Immunantwort [97]. Darüber hinaus stellt CXCR4 ein potentielles Zielmolekül zur Radiosensibilisierung dar [101, 102]. Im Mittel betrug die Punktzahl der Gliosphäreide 0,37 [SD 0,36] während der mittlere Punktwert der Resektate bei 0,14 [SD 0,26] lag (keine Signifikanz;  $p = 0,17$ ; Mann-Whitney-U-Test). Bei 7 der 10 Paare konnte ein Anstieg der CXCR4-Expression in den Gliosphären beobachtet werden (siehe Abbildung 10 und Tabelle 25). Darüber hinaus besteht kein signifikanter Unterschied in der CXCR4-Expression zwischen freischwebenden Gliosphären und adhärenen Zelllinien (MW: 0,34 [0,39] vs. 0,44 [0,32];  $p = 0,48$ ; Mann-Whitney-U-Test).



**Abbildung 10: CXCR4-Expression in Resektaten und Gliosphären**

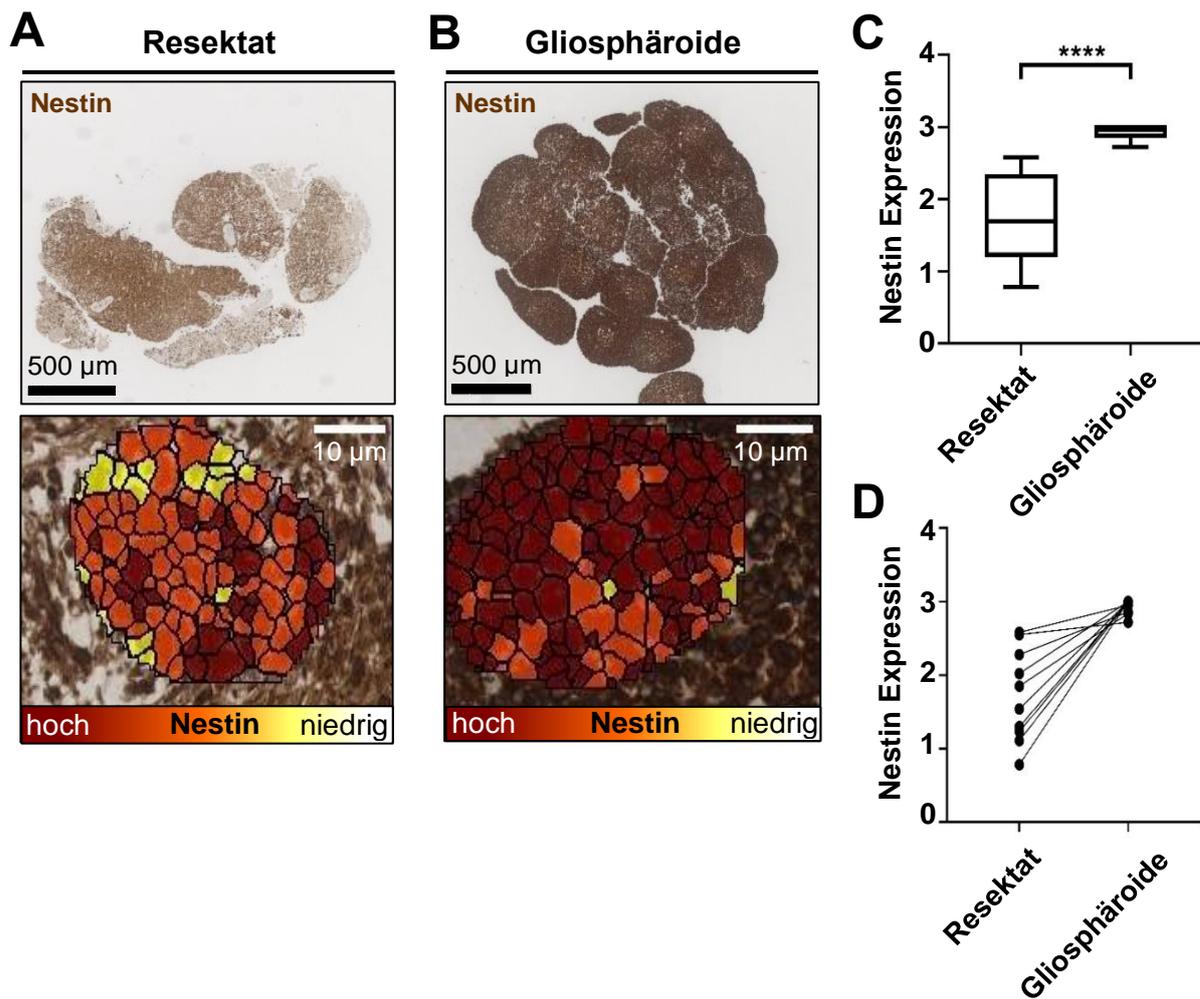
Abgebildet sind die CXCR4-Färbungen der GB-Resektate und der daraus gewonnen Stammzellkulturen an Paraffinschnitten. Die Auswertung der Färbungen erfolgte mittels *Tissue Definiens Studio*. Zusammengefügte Aufnahmen sind durch einen Trennstrich gekennzeichnet, um alle ROIs darstellen zu können. MW (Resektate): 0,14 [SD 0,16]; MW (Gliosphäreide): 0,37 [SD 0,36]; MW (frei schwebend): 0,34 [SD 0,39]; MW (adhäriert): 0,44 [0,32]

### 3.2.3 Nestin-Expression in GB-Resektaten und Gliosphäroiden

Die hier dargestellten Ergebnisse wurden bereits in [1] veröffentlicht. Nestin dient als Stammzellmarker um den Anteil an GSZ im ex vivo Modell sowie der stammzellangereicherten Zellkultur zu charakterisieren (siehe Abbildung 11 A und B). Die Nestinexpression der Zellen steigt in Gliosphäroiden signifikant an im Vergleich zu den zugehörigen ex vivo Proben (MW: 2,9 [SD 0,10] vs. 1,7 [0,63];  $p < 0,0001$ ; Mann-Whitney-U-Test) (siehe Tabelle 19 und Abbildung 11 C und D) [1]. Des Weiteren ist die Nestin-Färbung in Gliosphäroiden gleichmäßiger (SD 0,10 vs. 0,63), während sich in ex- vivo Proben große Unterschiede hinsichtlich der Färbung feststellen lassen. Es besteht kein signifikanter Unterschied der Nestinexpression zwischen freischwebenden und adhärenen Sphäroiden (MW: 2,93 [0,11] vs. 2,95 [0,09];  $p > 0,99$ ; Mann-Whitney-U-Test). Die detaillierten Werte und statistischen Auswertungen aller Proben sind in der Tabelle 19 dargestellt.

**Tabelle 19: Nestin Expressionsanalyse, adaptiert aus Riedel et al. (2021), *gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture***

Patient #	Resektat	Glio-sphäroide	Median Resektat	Median Gliosphäroide	Mann-Whitney Test
1	1,11	3,00			
2	1,85	2,84			
3	2,55	2,72			
4	2,28	2,86			
5	1,54	3,00	1,70	3,00	$P < 0,0001$ (zweiseitig)
6	2,02	3,00			
7	0,78	3,00			
8	1,3	3,00			
9	2,58	2,95			
10	1,23	3,00			



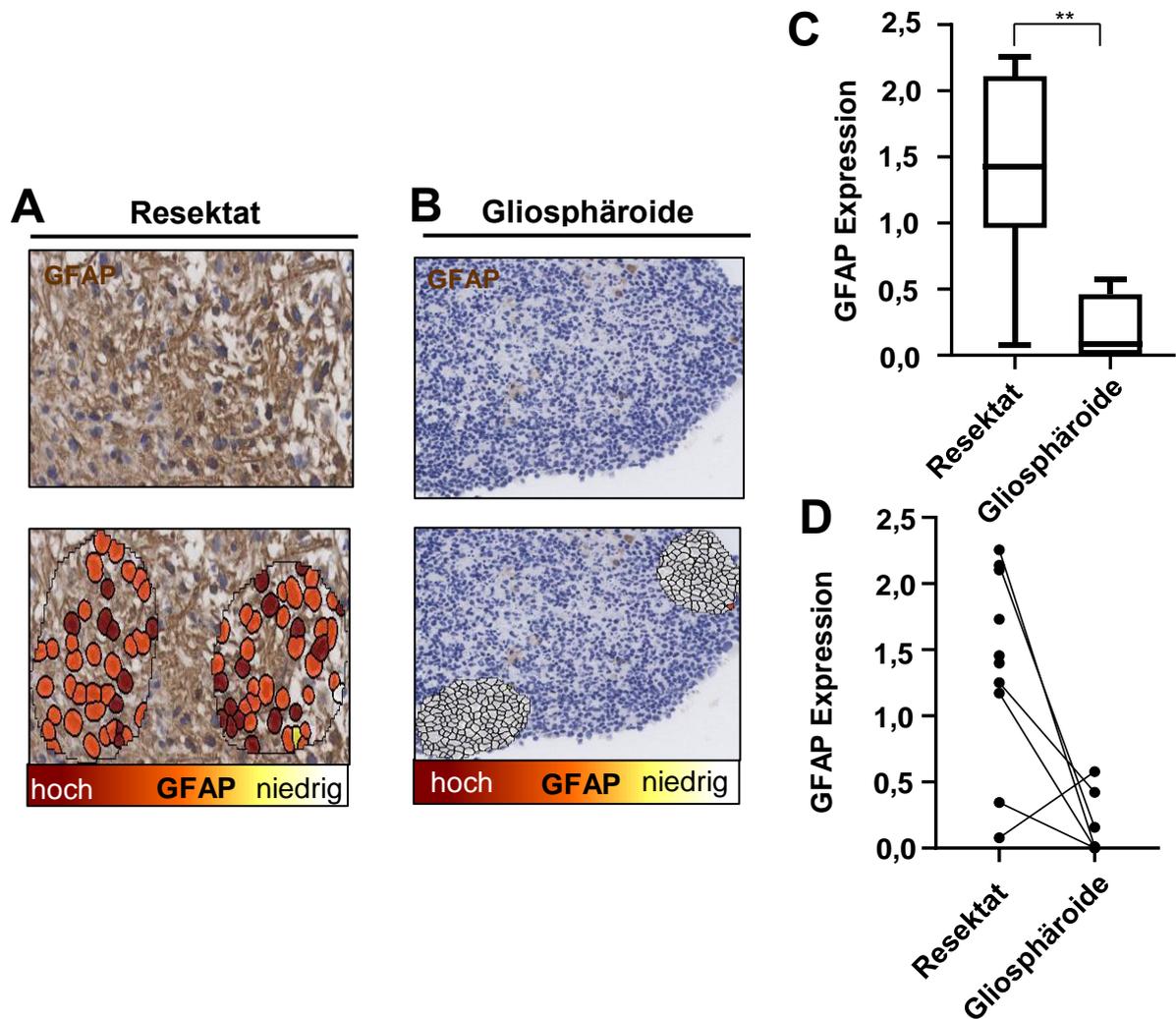
**Abbildung 11: Nestin-Expressionsanalyse**, adaptiert aus Riedel et al. (2021), *gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture*

**A)** Immunhistochemische Nestin Färbung Resektat #4 (5x) und automatische Analyse der Nestinexpression. Farbcodierung: weiß - negativ; gelb – niedrig; orange – mittel; rot – hoch. Punktzahl 2,14  
**B)** Immunhistochemische Nestin Färbung – Gliosphäre Patient #4 (5x) und automatische Auswertung. Punktzahl: 3,00  
**C)** Vergleich der Nestin-Scores mittels Tukey Boxplot in allen 10 Paaren aus Gliosphären und Ex vivo Proben ( $p < 0,0001$ , Mann-Whitney-U-Test)  
**F)** Verschiebung der Nestinexpression zwischen Resektat und den korrespondierenden Stammzellkulturen.

### 3.2.4 GFAP-Expression in GB-Resektaten und Gliosphären

GFAP dient als Marker zur Identifizierung von Zellen, die in ihrer Differenzierung weiter vorangeschritten sind. Dies wird genutzt um den Anteil an ausdifferenzierten Zellen in den Proben abzuschätzen. Die Expression des sauren Gliafaserproteins ist in den Resektaten ( $n=10$ ) signifikant höher als in den stammzellangereicherten Kulturen ( $n=6$ ) (MW: 1,4 [SD 0,73] vs. 0,2 [0,25];  $p=0,0047$ ; Mann-Whitney-U-Test) (siehe Abbildung 12 A-C und Tabelle 20). In 5 der 6 vorhandenen Paare aus Resektat und

Gliosphären sinkt die GFAP-Expression in der Stammzellkultur (siehe Abbildung 12 D und Tabelle 20).



**Abbildung 12: GFAP-Expression in Resektaten und Gliosphäroiden**

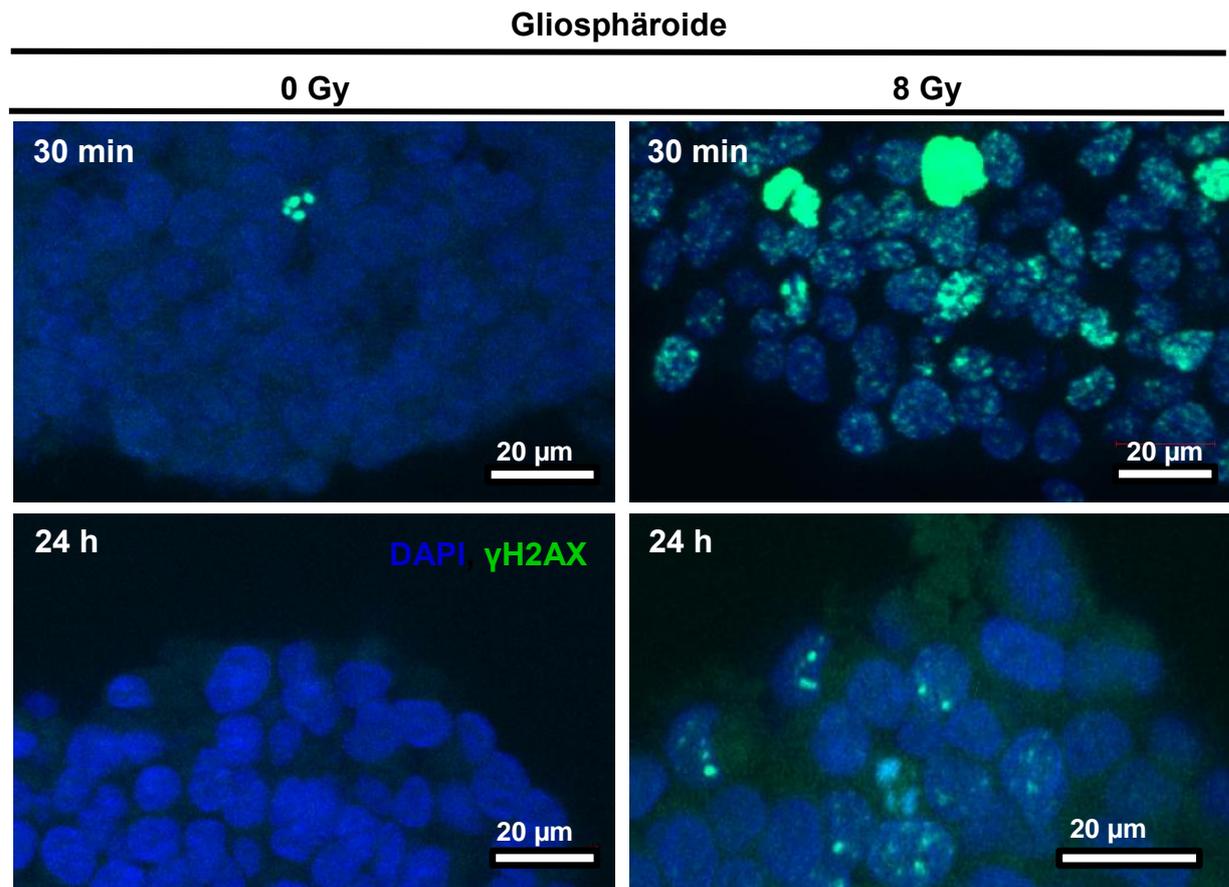
**A)** Immunhistochemische GFAP-Färbung des Resektats #4 und automatisierte Auswertung mit dem Programm *Tissue Definiens Studio*. Punktwert: 2,25 **B)** Auswertung der GFAP-Färbung an der stamzellangereicherten Kultur #4. Punktwert: 0,01 **C)** Tukey Boxplot der GFAP-Expression von Resektaten (n=10) verglichen mit Gliosphäroiden (n=6);  $p = 0,0047$ ; Mann-Whitney-U-Test **D)** Veränderung der GFAP-Expression zwischen Resektaten und den korrespondierenden Gliosphäroiden.

**Tabelle 20: GFAP-Expression**

Patient #	Resektat	Gliosphären	Median Resektat	Median Gliosphären	Mann-Whitney Test
1	1,17	0,00			
2	1,25	0,42			
3	0,34	0,00			
4	2,25	0,01			
5	1,40		1,43	0,08	P=0.0047 (zweiseitig)
6	1,73				
7	1,46				
8	0,08	0,58			
9	2,14	0,16			
10	2,10				

### 3.3 Induktion von $\gamma$ H2AX-Foci in Gliosphären

Die in diesem Absatz beschriebenen Resultate wurden bereits in [1] publiziert. Freischwebende Gliosphären (*free floating spheres*) zeigten sich in Vorversuchen ausgesprochen radioresistent. Aufgrund dessen wurde ein Foci-Induktionsversuch durchgeführt, um zu prüfen ob Gliosphären in der Lage sind  $\gamma$ H2AX-Foci zu bilden. Hierfür wurden die Zellkulturen mit 0 Gy bzw. 8 Gy bestrahlt und die unterschiedlichen Ansätze nach je 30 min bzw. 24 h gestoppt und in Formalin fixiert. Für die Durchführung wurden die Gliosphären #3 (75 a; MGMT methyliert und IDH1 WT) ausgewählt. Nach 30 min mit 8 Gy Bestrahlung wurde eine intensive Foci-Induktion sichtbar (siehe Abbildung 13). Dies wurde bei 0 Gy nicht beobachtet. Innerhalb der nächsten 24 h nahm die Anzahl der Foci bei 8 Gy stark ab, während bei dem Ansatz mit 0 Gy konstant wenige Foci sichtbar waren (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13: Foci-Induktionsversuch in Gliosphäroiden #3, adaptiert aus Riedel et al. (2021), *gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture***

$\gamma$ H2AX Foci Induktion nach 30 min und Abbau nach 24 h. Bestrahlung mit 0 Gy respektive 8 Gy. Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX Foci (grün) und Kernfärbung (blau)

### 3.4 $\gamma$ H2AX-Foci Analyse in GB-Resektaten und Gliosphäroiden

#### 3.4.1 Intertumorale Radioresistenz in GB-Resektaten

Die GB-Resektate zeigen eine ausgeprägte intertumorale Heterogenität (ANCOVA;  $p < 0,0001$ ), sodass die Daten nicht mit einer Regression beschrieben werden können [1]. Zwischen den MGMT-methylierten und unmethylierten Proben besteht keine signifikante Differenz hinsichtlich der  $\gamma$ H2AX-Anstiege in der linearen Regression (Median positiv: 0,92 Foci/ Gy; Median negativ: 0,39 Foci/ Gy;  $p = 0,31$ ; Mann-Whitney-U-Test) (siehe Abbildung 14 A). Die Anstiege der linearen Regression variieren zwischen 0,15 Foci/ Gy (95%-Konfidenzintervall: 0,05-0,25 Foci/ Gy) bei Patient #3 (W, 75a, meth, IDH1 WT) und 1,30 Foci/ Gy (95%-Konfidenzintervall: 0,90-1,69 Foci/ Gy) bei Patient #6 (W, 67a, meth, IDH1 WT) (siehe Abbildung 14 B und Tabelle 21) [1]. Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden bereits in [1] veröffentlicht.

**Tabelle 21:  $\gamma$ H2AX slopes (ex vivo), adaptiert aus Riedel et al. (2021), gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture**

Patient #	MGMT	cfoci <sub>0Gy</sub>	lineare Regression (Anstieg)	SE	95% Konfidenz Intervalle	r <sup>2</sup>	ANCOVA (lineare Regression)
1	positiv	1.27	1.10	0.16	0.79-1.42	0.24	
2	negativ	1.96	0.66	0.22	0.23-1.09	0.06	
3	positiv	0.76	1.30	0.20	0.90-1.69	0.22	
4	negativ	2.14	0.65	0.17	0.31-0.99	0.09	
5	positiv	0.42	0.92	0.13	0.66-1.18	0.25	P<0.0001
6	positiv	0.35	0.15	0.06	0.05-0.25	0.05	
7	positiv	0.04	0.40	0.12	0.16-0.65	0.07	
8	negativ	0.17	0.19	0.05	0.08-0.31	0.07	
9	negativ	0.13	0.37	0.11	0.16-0.58	0.08	
10	negativ	0.11	0.39	0.10	0.19-0.59	0.13	

### 3.4.2 Intertumorale Radioresistenz in Gliosphäroiden

Ergebnisse aus diesem Abschnitt wurden bereits in der Veröffentlichung [1] publiziert. Die stammzellangereicherten Zellkulturen in dieser Studie lassen sich in zwei Phänotypen einteilen; freischwebende Sphäroide und adhärierte Sphäroide. Diese Einteilung schlägt sich auch in der Radioresistenz nieder. Adhärierte Gliosphäroide (n=3) sind signifikant radiosensitiver als freischwebende Gliosphäroide (n=7) (Median: 2,14 [Spannweite 0,99; 3,00] vs. 0,13 [0,04; 0,95]; p=0,02; Mann-Whitney-U-Test). (Tabelle 22 und 23, sowie Abbildung 14 C) [1]. Zellkulturen die den Phänotyp von freischwebenden Sphäroiden annehmen, sind darüber hinaus auch signifikant radioresistenter als ihr ursprüngliches Tumorgewebe (Median: 0,53 [0,15; 1,30]; p=0,03; Mann-Whitney-U-Test) [1]. Im Gegensatz zu den ex vivo Proben sind diese auch homogener in ihrer Strahlenresistenz, die  $\gamma$ H2AX-Anstiege variieren bei 5 von 6 freischwebenden Zelllinien zwischen 0,04 und 0,23 (Tabelle 22). Dennoch zeigte sich

eine signifikante Heterogenität der Gliosphäroide zwischen den einzelnen Patienten (ANCOVA,  $p < 0,0001$ ) [1].

**Tabelle 22:  $\gamma$ H2AX-Anstiege (Gliosphäroide), adaptiert aus Riedel et al. (2021), *gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture***

Patient #	Phänotyp	cfoci <sub>0Gy</sub>	lineare Regression (Anstieg)	SE	95%-Konfidenz Intervalle	r <sup>2</sup>	ANCOVA (lineare Regression)
1	fs	0.09	0.95	0.13	0.69-1.21	0.26	
2	ad	1.54	2.14	0.31	1.53-2.75	0.24	
3	fs	0.14	0.22	0.08	0.06-0.39	0.05	
4	fs	0.04	0.13	0.05	0.03-0.23	0.04	
5	ad	0.72	3.01	0.47	2.07-3.94	0.21	P<0.0001
6	fs	0.34	0.23	0.12	-0.01-0.47	0.02	
7	fs	0.04	0.04	0.02	0.01-0.07	0.03	
8	ad	0.44	0.99	0.18	0.54-1.35	0.17	
9	fs	0.00	0.07	0.02	0.03-0.11	0.07	
10	fs	0.39	0.12	0.05	0.02-0.22	0.04	

fs freischwebend  
ad adhärent

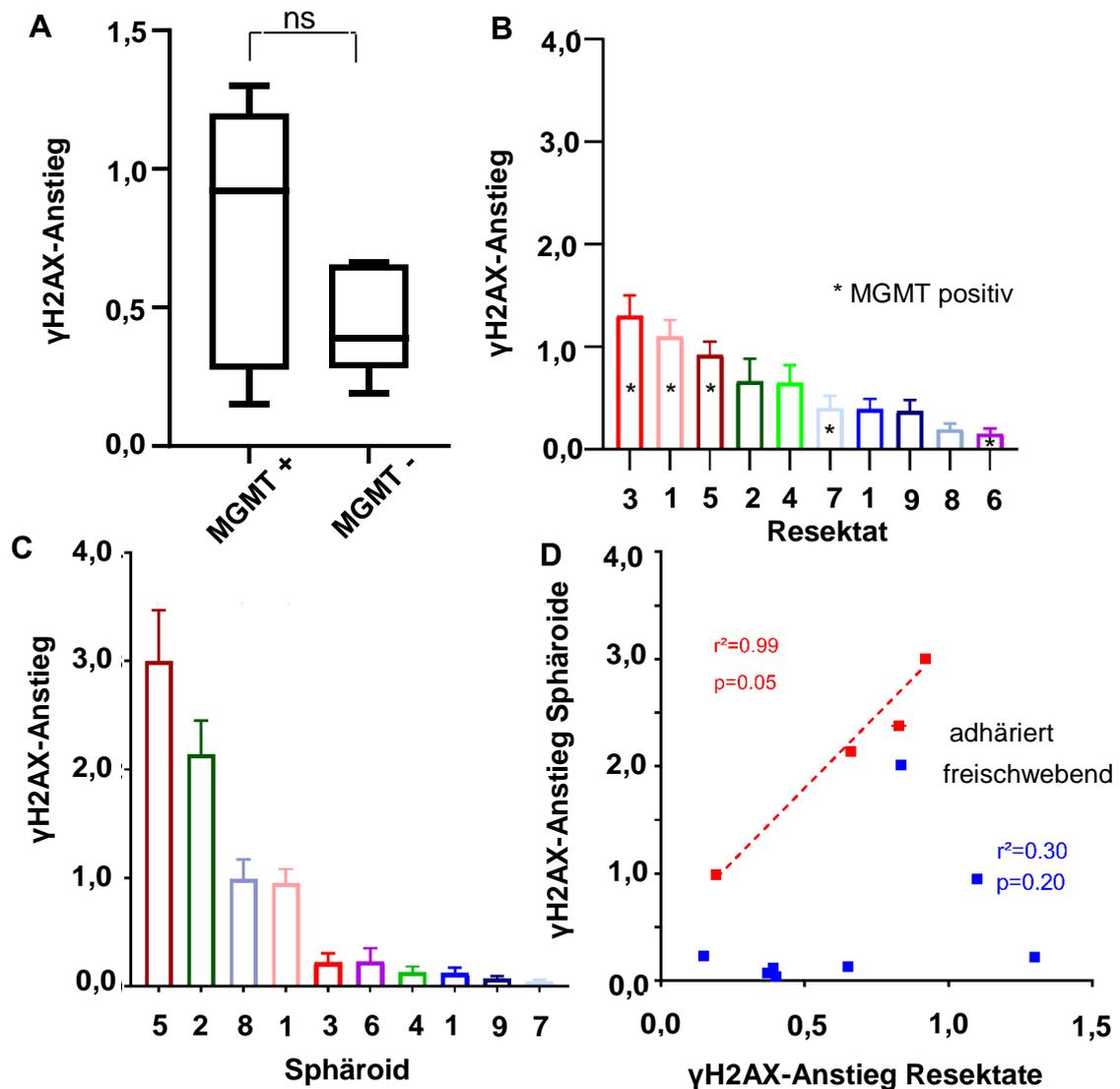
**Tabelle 23:  $\gamma$ H2AX Auswertung (Mann-Whitney-U-Test)**

*adaptiert aus Riedel et al. (2021), gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture*

	N	Median ( $\gamma$ H2AX)	Min-Max	Resektat vs. fs	ad vs. fs
<b>Resektat</b>	10	0.53	0.15-1.30		
<b>Freischwebend (fs)</b>	7	0.13	0.04-0.95	p=0.03 (zweiseitig)	p=0.02 (zweiseitig)
<b>Adhärenz (ad)</b>	3	2.14	0.99-3.00		

### 3.4.3 Korrelation der $\gamma$ H2AX-Anstiege von Sphäroiden und Resektaten

Um die Abhängigkeit der linearen Regression der Resektate von den Stammzellkulturen zu untersuchen, wurden die  $\gamma$ H2AX-Anstiege gegeneinander aufgetragen.



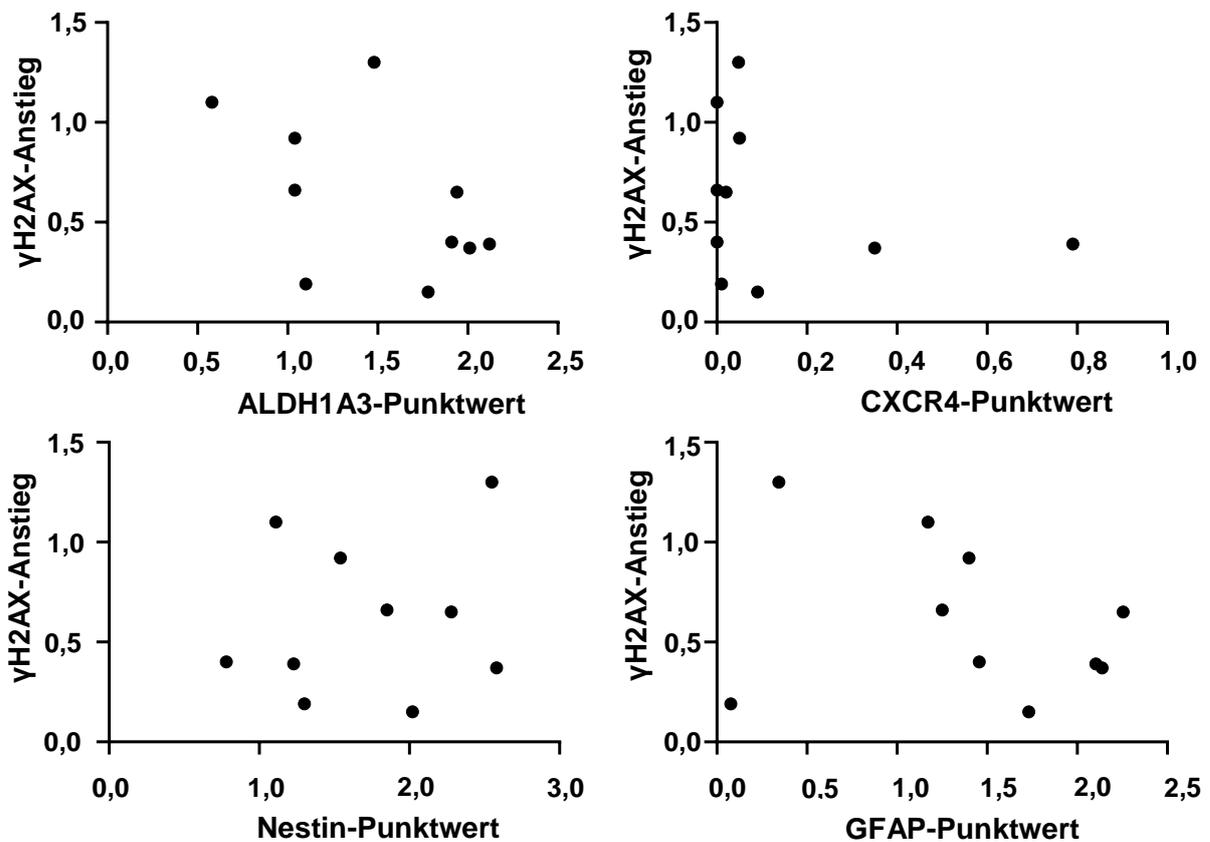
**Abbildung 14:  $\gamma$ H2AX slope Analyse, adaptiert aus Riedel et al. (2021), gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture**

**A)** Tukey Boxplot der  $\gamma$ H2AX Auswertung in Abhängigkeit des MGMT-Status an Resektaten. (Median positiv: 0,92 Foci/ Gy; Median negativ: 0,39 Foci/ Gy;  $p=0,31$ ) **B)**  $\gamma$ H2AX Auswertung an Resektaten (0,15-1,30 foci/Gy; Median 0.53 foci/Gy) und **C)** Sphäroiden (freischwebend: 0,04-0,95; Median 0,13), (adhäriert: 0,99-3,00; Median 2,14). Die Balken stellen den Anstieg der Regressionsgerade dar, während die Fehlerbalken den Standardfehler zeigen. Das Resektat #8 enthielt in der 8 Gy Probe nicht genügend auswertbare Zellen, sodass eine Regressionsgerade aus den Werten von 0 und 4Gy ermittelt wurde. **D)** Korrelation der Sphäroide mit deren ursprünglichen Tumorgewebe. Adhärierte Sphäroide:  $r^2=0,99$ ;  $p=0,05$ ; freischwebende Sphäroide:  $r^2=0,30$ ;  $p=0,20$

Es wurde keine Korrelation zwischen freischwebenden Sphäroiden und deren ursprünglichem Tumorgewebe beobachtet ( $r^2= 0,30$ ;  $p=0,20$ ) (Abbildung 14 D) [1]. Ein Trend für eine positive Korrelation hingegen konnte zwischen adhärenzten Sphäroiden und deren Tumorsektat nachgewiesen werden ( $r^2= 0,99$ ;  $p=0,05$ ) (Abbildung 14 D) [1]. Diese Ergebnisse wurden bereits in einer Veröffentlichung [1] publiziert.

### 3.4.4 Korrelation der $\gamma$ H2AX-Analyse und der Markerproteine

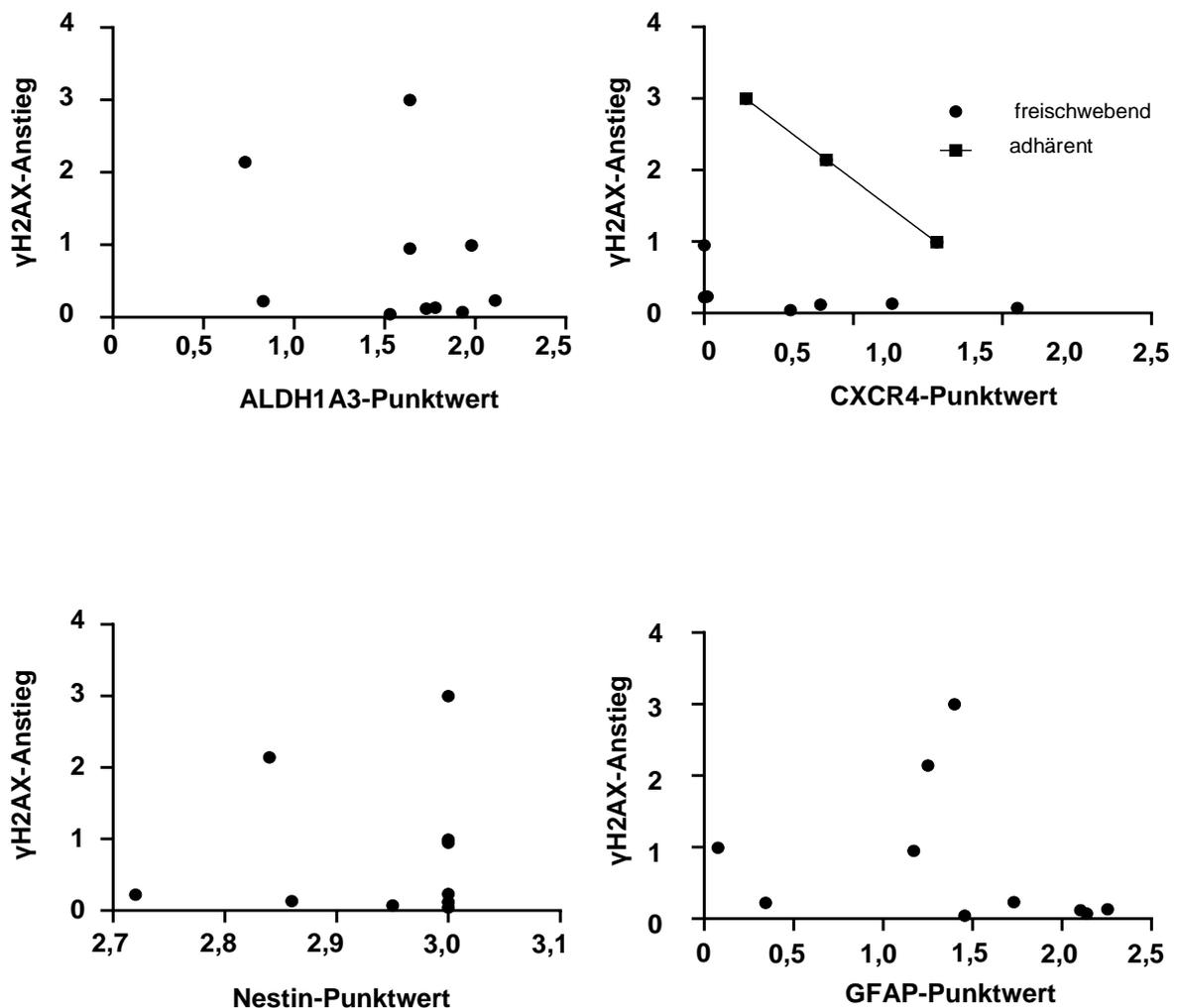
Um zu untersuchen, ob die Expression der Stammzellmarker ALDH1A3, CXCR4, Nestin und des Differenzierungsmarkers GFAP einen Einfluss auf die Radiosensibilität des Resektats haben, wurden die Punktwerte mit der  $\gamma$ H2AX-Analyse korreliert (siehe Abbildung 15). Es ergab sich für keinen der Marker eine signifikante Korrelation (ALDH1A3:  $p=0,14$ ;  $r^2=0,25$ ; CXCR4:  $p=0,41$ ;  $r^2=0,09$ ; Nestin:  $p=0,63$ ;  $r^2=0,03$ ; GFAP:  $p=0,41$ ;  $r^2=0,09$ ).



**Abbildung 15:  $\gamma$ H2AX-Anstiege in Abhängigkeit der Expression einzelner Markerproteine in Resektaten**

Berechnungen der einzelnen linearen Regressionen. **ALDH1A3:**  $p=0,14$ ;  $r^2=0,25$ ; **CXCR4:**  $p=0,41$ ;  $r^2=0,09$ ; **Nestin:**  $p=0,63$ ;  $r^2=0,03$ ; **GFAP:**  $p=0,41$ ;  $r^2=0,09$

Es wurden auch Korrelationen der Markerproteine mit den  $\gamma$ H2AX-Analysen der Stammzellkulturen durchgeführt. Betrachtete man freischwebende und adhärenzte Gliosphäroide gemeinsam ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Korrelationen (ALDH1A3:  $p=0,41$ ;  $r^2=0,09$ ; CXCR4:  $p=0,60$ ;  $r^2=0,04$ ; Nestin:  $p=0,83$ ;  $r^2=0,01$ ; GFAP:  $p=0,48$ ;  $r^2=0,06$ ). Hingegen zeigten adhärenzte Sphäroide eine starke negative Korrelation mit der CXCR4-Expression der Zellen ( $n=3$ ;  $p=0,004$ ;  $r^2=1,00$ ) (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16:  $\gamma$ H2AX-Anstiege in Abhängigkeit der Expression einzelner Markerproteine in Sphäroiden**

Berechnungen der einzelnen linearen Regressionen. **ALDH1A3**:  $p=0,14$ ;  $r^2=0,25$ ; **CXCR4 (gesamt)**:  $p=0,41$ ;  $r^2=0,09$ ; **CXCR4 (adhärent)**:  $n=3$ ;  $p=0,004$ ;  $r^2=1,00$ ; **Nestin**:  $p=0,63$ ;  $r^2=0,03$ ; **GFAP**:  $p=0,41$ ;  $r^2=0,09$

## 4 Diskussion

Die Ursachen für die unbefriedigenden Behandlungsergebnisse des Glioblastoms sind vielfältig. Eine herausragende Rolle könnten besonders GSZ spielen [34, 67, 68]. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich nur um eine kleine Subpopulation an Zellen im Tumor [31, 36]. Diese sind aber in der Lage aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften das Tumorstammzellwachstum dauerhaft aufrechtzuerhalten und auch im Falle einer erfolgten Therapie einen Rückfall zu bewirken [58, 70, 103]. Tumorgewebe, wie das GB, sind wahrscheinlich hierarchisch aufgebaut [38, 95]. Stammzellen stehen in der Rangfolge zu Beginn der Differenzierung der Zellreihen [32, 38, 95]. Es gibt Hinweise darauf, dass besonders sie eine ausgeprägte Selbsterneuerungskapazität besitzen und sie tumorinitiierend wirken [4, 32, 34, 36, 38, 58, 95]. Aus diesen Gründen erachten einige Autoren Therapien vor allem dann als besonders erfolgreich, wenn sie in der Lage sind alle Tumorstammzellen zu eradizieren [70, 71]. Bislang bleibt jedoch noch unklar wie groß der Einfluss dieser Zellen auf die Radioresistenz ihrer Tumoren wirklich ist und von welchen weiteren Faktoren diese abhängt. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Charakterisierung der Radioresistenz mittels  $\gamma$ H2AX-Analyse von 10 GB-Resektaten und den daraus gewonnenen Stammzellkulturen. Anhand dieser Daten sollten mögliche Korrelationen zwischen ursprünglichem Tumor und GSZ-Kultur untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der Expression verschiedener Stammzellmarker, um den Anteil an Stammzellpopulationen zu identifizieren und ggf. therapierbare Zielmoleküle zu identifizieren.

Die stammzellangereicherten Zellkulturen bildeten *in vitro* zwei Phänotypen aus; freischwebende (n=7) und adhärenente (n=3) Sphäroide [1]. Diese Beobachtung deckt sich mit bereits veröffentlichten Daten [104, 105] und lässt vermuten, dass der Begriff der GSZ keine homogene Zellpopulation beschreibt. Interessanterweise gehen die Autoren in [105] davon aus, dass besonders freischwebende Sphäroide in sich die typischen Eigenschaften von Stammzellen vereinen. Sie zeigen multipotente Charakteristika, exprimieren stärker CD133 und wirken *in vivo* äußerst tumorinitiierend [105]. All diese Eigenschaften sind in adhärenenten Sphäroiden deutlich geringer ausgeprägt. Des Weiteren weisen adhärenente Stammzellkulturen ein anderes genetisches Expressionsmuster auf. Sie überexprimieren, im Gegensatz zu freischwebenden Kulturen, vor allem Proteine der Extrazellulärmatrix (ITGB1,

COL1A2, SDC4, ITGB5, CD44) [105]. Auch die Autoren in [104] beschreiben abweichende mRNA-Abundanzen in Abhängigkeit des Phänotyps. Während sich adhärenente Sphäroide durch eine erhöhte Expression von ALDH1A3 auszeichnen, exprimieren freischwebende Zelllinien stärker den neuronalen Vorläuferzellmarker CXCR4 [104]. Die Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt vermuten, dass es sich bei adhärenenten Gliosphäroiden um einen weiter differenzierten Zelltyp handeln könnte, der bereits typische Stammzeleigenschaften verloren hat [1]. Entsprechend lassen sich auch die Ergebnisse der  $\gamma$ H2AX-Auswertung interpretieren. Während freischwebende Zelllinien eine ausgesprochen hohe Radioresistenz aufwiesen, zeigten sich adhärenente Sphäroide deutlich radiosensibler (0,13 [0,04-0,95] vs. 2,14 [0,99-3,00]) [1]. Ungeklärt bleibt somit auch, ob es sich um ein artifizielles Verhalten der Zellen in vitro handelt, oder ob es sich wirklich um verschiedene Stammzelltypen handelt. Um diese Frage beantworten zu können, braucht es sicherlich weitere systematische Experimente. Diese sollten genauere Untersuchungen der Reparatur von DSB, die Beleuchtung der Rolle von EZM-Proteinen und Genexpressions- sowie Transkriptomanalysen beinhalten.

Gliosphäroide sind in der modernen Stammzellforschung ein häufig eingesetztes Mittel [37, 105, 106]. Jedoch besitzt auch diese Methode Einschränkungen. Nicht alle Zellen innerhalb des dreidimensionalen Sphäroids sind auch GSZ. Es ist sogar davon auszugehen, dass nur ein geringer Teil der Zellen innerhalb der Struktur Stammzeleigenschaften besitzt [33]. Die Stammzellen befinden sich wahrscheinlich vor allem auf der Oberfläche der Sphäroide [34, 40]. Dieser Besonderheit haben wir auch in unserer Auswertung Rechnung getragen und Bereiche der Gliosphäroide für die Auswertung genutzt, welche besonders oberflächlich liegen und nicht hypoxisch sind [1]. Dennoch bleiben weitere Limitationen, wie das artifizielle Wachstum für das es kein physiologisches Korrelat gibt [33], die eingeschränkte Klonogenität innerhalb der Zellkultur, sowie die unterschiedlichen Mikromilieus zwischen den Sphäroiden [40].

Zur allgemeinen Charakterisierung von Stammzellen können auch sogenannte Stammzellmarker hinzugezogen werden. In dieser Studie wurde hierfür das Klasse VI Intermediärfilament Nestin genutzt. Nestin wird vor allem in der embryonalen Entwicklung in verschiedenen Geweben exprimiert [41] bevor es mit zunehmender Differenzierung durch andere Intermediärfilamente wie beispielsweise GFAP ersetzt wird. Es spielt jedoch auch unter pathologischen Umständen eine entscheidende Rolle. So wird Nestin sowohl in malignen Zellen als auch in Zellen, die an reparativen

Prozessen beteiligt sind, vermehrt exprimiert [107]. In unseren Untersuchungen zeigten sich deutlich erhöhte Nestinexpressionswerte in Sphäroiden verglichen mit deren ursprünglichen Resektaten. Dies stützt die Vermutung, dass es sich bei Gliosphäroiden um stammzellangereicherte Zellkulturen handelt, während der ursprüngliche Tumor vor allem durch weiter differenzierte Zellen geprägt ist [1]. Anders als zu erwarten, gab es jedoch zwischen freischwebenden und adhären Zellen keinen signifikanten Unterschied in der Nestinexpression [1]. Dies überrascht insofern, dass wie oben bereits erwähnt, adhären Zellen im Verdacht stehen vermehrt ausdifferenzierte Zellen zu enthalten [105].

Da GFAP in der Zellentwicklung und fortlaufenden Ausdifferenzierung Nestin als Intermediärfilament ablöst, wurde in dieser Arbeit GFAP als ein Differenzierungsmarker verwendet [108]. Im Einklang mit der Tumorstammzelltheorie zeigten Resektate deutlich höhere Expressionswerte als Stammzellkulturen. Dies lässt vermuten, dass im ursprünglichen Tumor differenzierte Zellen vorherrschen, während Sphäroide stammzellangereicht sind. Lediglich in einer der 7 gepaarten Proben kam es zu einer Erhöhung der GFAP-Expression in der Zelllinie. Hierbei handelt es sich um die adhären Zelllinie #8 (Punktwert: 0,58). Interessanterweise zeigt nur die ebenfalls adhären Zelllinie #2 ähnlich hohe Werte (Punktwert 0,42). Dies legt nahe, dass der adhären Phänotyp tatsächlich von differenzierten Zellen dominiert wird. Es muss jedoch beachtet werden, dass verschiedene GFAP-Isoformen bestehen von denen einige auch stammzelltypisch sein können [56]. Insbesondere GFAP $\delta$  und ein hohes GFAP $\delta/\alpha$  Verhältnis sind mit einem hohen Stammzellanteil und einer höhergradigen Malignität assoziiert [56]. Um die Unterschiede in der GFAP-Expression zwischen adhären und freischwebenden Sphäroiden besser zu charakterisieren, sind somit weitere Experimente nötig. Es sollte die Expression unterschiedlicher GFAP-Isoformen an einer größeren Kohorte untersucht werden. Dies könnte einen Anhalt geben, ob adhären Sphäroide differenzierte Zellen oder aber einen eigenen Stammzelltypen widerspiegeln.

Die Nutzung der Analyse von  $\gamma$ H2AX-Foci ist eine weit verbreitete Methode in der translationalen radioonkologischen Forschung. Sie eignet sich zur Abschätzung der in-vitro Radioresistenz von Zellen [90] und der ex-vivo Radioresistenz von Geweben [65, 91]. Hierbei stellt insbesondere die Induktion von Foci pro Gy einen Surrogatparameter für die zelluläre Radioresistenz dar [85, 109]. Frühere Studien zeigten auch einen Zusammenhang zwischen residuellen DSB und dem klonogenen

Überleben von Zellen [88, 90]. Darüber hinaus prädisponiert die einfache Anwendbarkeit und die schnelle Verfügbarkeit der Ergebnisse die  $\gamma$ H2AX-Analyse als ein mögliches klinisches Instrument zur Abschätzung der Radioresistenz von Tumoren [1, 64, 91].

Im Vergleich zu den von [64] publizierten Ergebnissen der Radioresistenz von Glioblastomen und anderen Tumoren konnten wir zeigen, dass Glioblastomgewebe mit  $\gamma$ H2AX Werten zwischen 0,15 und 1,30 Foci/ Gy zu den resistentesten Entitäten zählen [1]. In den von [64] publizierten Daten lagen die drei untersuchten Glioblastomproben bei Werten zwischen 0,62 bis 1,24 Foci/ Gy und somit in einem ähnlichen Bereich. Im Vergleich zeigen Prostatakarzinome Werte zwischen 0,83 und 2,18 Foci/ Gy (n=3) und kolorektale Karzinome lagen zwischen 1,92 und 2,02 Foci/ Gy (n=3) [64]. Bei dem resistentesten Tumor in der Studie von [64] handelte es sich um ein Cervix-Karzinom mit einem  $\gamma$ H2AX Wert von 0,58 Foci/ Gy. Die in unserer Studie erhobenen  $\gamma$ H2AX-Anstiege zeigten noch einmal deutlich radioresistentere Ergebnisse. Darüber hinaus konnten wir in der Gruppe der Glioblastome eine ausgeprägte Heterogenität hinsichtlich der  $\gamma$ H2AX-Anstiege nachweisen [1]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch die Autoren in [91]. Sie konnten zeigen, dass intertumorale Unterschiede zwischen Prostatakarzinom größer sind als die intratumoralen Unterschiede innerhalb eines Karzinoms [91]. Dies erlaubt die Vermutung, dass sich auch innerhalb der Entität der Gliome weitreichende Unterschiede hinsichtlich der Radioresistenz einzelner Tumore ergeben könnten. Diese sollten im Hinblick auf eine personalisierte Therapie in der Entscheidung um die Behandlung beachtet werden. Dennoch muss die kleine Fallzahl (n= 10) und auch die geringe Anzahl an ROIs (n=2) pro Gewebe beachtet werden [1]. Um allgemeingültige Aussagen treffen zu können, bedarf es momentan größerer Fallzahlen und einer ausgereiften technischen Möglichkeit der automatisierten Foci-Auswertung.

Aufgrund der klinischen Erfahrung und einiger Vorexperimente war eine ausgeprägte Radioresistenz von GSZ zu erwarten. Auch deshalb entschieden wir uns einen sogenannten Foci-Induktionsversuch durchzuführen. Dieser zeigt kurz nach Bestrahlung eine starke Induktion von  $\gamma$ H2AX-Foci und erbringt somit den konzeptionellen Beweis, dass Zellen in Gliosphäroiden in der Lage sind radiogen-induzierte Foci zu bilden und die hierfür benötigten Enzyme und anderen Proteine besitzen. Diese DNA-Schäden wurden aber im weiteren Verlauf sehr effizient repariert, sodass die Anzahl der Foci

innerhalb der Beobachtungsdauer von 24 Stunden sehr stark gesunken ist. Diese Daten lassen auf eine sehr ausgeprägte DNA-Reparaturkapazität der GSZ schließen und erhärten den Verdacht, dass es sich um intrinsisch sehr radioresistente Zellen handelt [34, 36].

Um Unterschiede in der Radioresistenz von GSZ und ihrem ursprünglichen Tumoren zu untersuchen wurde die  $\gamma$ H2AX-Analyse auch an Stammzellkulturen durchgeführt. Es zeigte sich das freischwebende Gliosphäroide deutlich radioresistenter sind, als ihre ursprünglichen Tumoren (0,13 [0,04-0,95] Foci/ Gy vs. 0,53 [0,15-1,30] Foci/ Gy;  $p=0,03$ ) [1]. Diese Ergebnisse und der Foci-Induktionsversuch lassen vermuten, dass GSZ eine erhöhte DNA-Reparaturkapazität besitzen im Vergleich zu differenzierten Tumorzellen. Die Hintergründe dieser Eigenschaft sind bislang noch nicht genügend verstanden. Beispielsweise beschreiben die Autoren in [34] vier- bis fünffach höhere Apoptoseraten in CD133-negativen Zellen nach Bestrahlung. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich durch eine geringere Aktivierung der Caspase-3 in GSZ zu erklären [34]. Im Gegensatz hierzu sind Phosphorylierungen der Kontrollproteine ATM, Rad17 und Chk1/2 in CD133-positiven Zellen deutlich hochreguliert und Kontrollmechanismen somit aktiviert [34]. Weitere Mechanismen, die die höhere Radioresistenz von GSZ erklären könnten, wären eine effizientere homologe Reparatur von DNA-Schäden [72], eine verstärkte Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs [110] und die vermehrte Expression von  $K_{Ca}3.1$ -Kanälen [104]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die ausgeprägte intrinsische Radioresistenz der GSZ relevant für den gesamten Tumor sein könnte. Dennoch sind Tumorstammzellen nur ein Teil der Erklärung für die ausgeprägte Therapieresistenz von Glioblastomen. In diesem Zusammenhang müssen auch Faktoren wie das Tumormikromilieu, immunologische Prozesse, Zell-Zellinteraktionen und Wechselbeziehungen mit der Extrazellulärmatrix betrachtet werden.

Um den Zusammenhang der Radioresistenz zwischen Stammzellen und Resektaten zu untersuchen wurden die  $\gamma$ H2AX-Anstiege korreliert. Es bestand keine Korrelation zwischen freischwebenden Sphäroiden und dem primären Gewebe. Die fehlende Korrelation kann unter Umständen auf die geringe Strahlensensibilität der Stammzellkulturen zurückgeführt werden, die eventuell eine ausreichende Differenzierung nicht erlaubt. Ein weiterer Grund könnte in diesem Zusammenhang auch die geringe Fallzahl darstellen. Darüber hinaus müssen auch die Versuchsbedingungen kritisch diskutiert werden, zumal für die Resektate und die Sphäroide unterschiedliche Medien genutzt werden mussten und die Resektate ein

deutlich größeres Volumen aufwiesen. Zum Vergleich gab es bei den adhärennten Sphäroiden einen Trend zur linearen Korrelation zwischen Stammzellen und Tumor ( $r^2=0,99$ ;  $p=0,05$ ;  $n=3$ ) [1]. Diese Ergebnisse bekräftigen weiter die Vermutung, dass es sich bei adhärennten Sphäroiden wohl um Zellen handelt, die einen Differenzierungsprozess begonnen haben und somit den ursprünglichen Tumor gut widerspiegeln [1, 105]. Diese Ergebnisse lassen hoffen, dass es sich bei diesen Zellkulturen um gute Langzeitmodelle für die Erforschung der intrinsischen Radioresistenz des Glioblastoms handeln könnte. Die Ursachen der fehlenden Korrelation der freischwebenden Sphäroide und ihrer Resektate hingegen müssen weiter untersucht werden. Hierfür bedarf es einer größeren Kohorte und die Rolle der Stammzellendichte im Resektat muss genauer betrachtet werden. Erst weitere klinische Auswertungen des Gesamtüberlebens und des Therapieansprechens können die Relevanz der  $\gamma$ H2AX-Analyse darlegen. Auch bleibt es bislang unklar, ob die Radioresistenz der GSZ oder des gesamten Tumorgewebes ausschlaggebend für die Prognose der Patienten ist.

Um den Anteil an mesenchymalen Stammzellen in den Proben zu klären wurden ALDH1A3 Färbungen durchgeführt. Glioblastome sind heterogene Tumoren, die sich in molekularbiologische Subtypen (klassisch, proneural, mesenchymal, neural) unterteilen lassen [19]. Tumoren, die dem mesenchymalen Typ zugeordnet werden sind durch höhere Nekroseraten und verstärkte Entzündung charakterisiert, dementsprechen sind auch Tumornekrosefaktor-Gene und Gene des NF- $\kappa$ B Signalweges vermehrt exprimiert [19]. Die Zusammenhänge zwischen Strahlenresistenz und molekularen Aberrationen sind wenig verstanden. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen gegenüber Bestrahlung resistenter sind [96] und sich durch ein besonders ausgeprägtes aggressives Wachstum auszeichnen [111]. ALDH1A3 wird in mesenchymalen GSZ vermehrt exprimiert [96]. Des Weiteren führt ionisierende Strahlung zu einer Anreicherung von mesenchymalen Stammzellen in Glioblastomen [96]. Die immunhistochemischen ALDH1A3-Färbungen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sphäroiden und den ursprünglichen Resektaten. Dies lässt vermuten, dass ALDH1A3 nicht in allen Stammzellen verstärkt exprimiert wird. Dennoch scheint es als spiele ALDH1A3 eine wichtige Rolle in der Tumorbilogie des Glioblastoms, indem es zur mesenchymalen Transformation beiträgt [48] und somit auch eine erhöhte Radioresistenz vermittelt [45]. Dennoch konnten wir in unseren

Auswertungen keine Korrelation zwischen ALDH1A3 Expression und  $\gamma$ H2AX-Messwerten beobachten. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die geringe Fallzahl (n=10) liefern. Auch aus diesem Grund sollten weitere Untersuchungen mit einer größeren Probenzahl angeschlossen werden, um die Ergebnisse zu bestätigen. Eine Auswertung hinsichtlich der GSZ Anreicherung nach Bestrahlung sowohl in den Sphäroiden als auch in den primären Tumorgewebe könnte Aufschluss bringen, in welchen Maße sich der Anteil an mesenchymalen Stammzellen erhöht, und ob er von der ursprünglichen Stammzellichte abhängig ist. Darüber hinaus könnten Untersuchungen der Zellmigration, des Zellzyklus und der Interaktion mit Extrazellulärmatrixproteinen an Stammzellkulturen mit hohen ALDH1A3 Expressionswerten das grundlegende Verständnis der mesenchymalen Stammzellpopulation verbessern.

Im besonderen Fokus der onkologischen Forschung stehen momentan zielgerichtete Therapieoptionen. Eine hierfür geeignete Zielstruktur könnte der Chemokinrezeptor CXCR4 sein. Unsere Auswertungen ergaben, dass CXCR4 sowohl in den ursprünglichen Tumorgewebe, als auch in den GSZ exprimiert wird. In 7 der 10 Paare stieg die CXCR4-Expression in den Sphäroiden an, dennoch war kein signifikanter Unterschied zu beobachten. CXCR4 steht im Verdacht besonders relevant für das Mikromilieu im Tumor zu sein und dieses aktiv zu beeinflussen [101, 102, 112], sowie essentiell für die Proliferation, Invasion und Angiogenese von Gliomen zu sein [97]. Darüber hinaus scheint CXCR4 eine entscheidende Rolle in der Radioresistenz von Glioblastomen zu spielen [51]. In den CXCR4-Färbungen der Resktate und der freischwebenden Sphäroide ergab sich keine Korrelation zwischen den  $\gamma$ H2AX-Anstiegen und den CXCR4-Punktwerten. Im Gegensatz dazu zeigten adhärenente Gliosphären eine negative lineare Korrelation. Es scheint als würde CXCR4 vor allem in der Subgruppe der adhärenenten Gliosphären in der Vermittlung von Radioresistenz beteiligt zu sein. Diese Ergebnisse bedürfen jedoch noch weiterer Untersuchungen. Es bedarf insbesondere einer größeren Probenzahl und Untersuchungen der Expression von CXCR4 nach Bestrahlung. Es stehen momentan mit AMD3100 und AMD070 selektive CXCR4-Antagonisten zur Verfügung, die potentiell zur Radiosensibilisierung in neuen Versuchen genutzt werden könnten.

In der Zusammenschau der Ergebnisse könnten Gliosphäroide einen Beitrag zum weiteren Verständnis von Gliomen beitragen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sie sich in Form von adhärenierten Sphäroiden als in vitro Langzeitmodell des ursprünglichen

Tumors eignen und in Form von freischwebenden Sphäroiden einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis von GSZ und deren Rolle in der Therapieresistenz erbringen könnten. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass der fehlenden Korrelation zwischen freischwebenden Sphäroiden und deren ursprünglichen Gewebe Rechnung getragen werden muss und sie nicht isoliert stellvertretend für den Tumor gesehen werden dürfen. Darüber hinaus lassen Gliosphäroide momentan weitere Faktoren, wie immunologische Reaktionen und Effekte anderer Zellreihen auf die Therapieresistenz noch weitestgehend außer Acht.

## 5 Zusammenfassung

Zahlreiche Daten legen nahe, dass sogenannte Tumorstammzellen für das Entstehen von Malignomen und deren Rezidiven eine übergeordnete Rolle spielen könnten. Darüber hinaus werden mit dieser Art von Zellen auch ausgeprägte Resistenzmechanismen verbunden, die es bei einer effektiven Therapie zu überwinden gilt. Auch beim Glioblastom könnten sogenannte GSZ eine Rolle in oben genannten Punkten spielen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die DNA-Reparaturkapazität von Gliosphäroiden mit deren ursprünglichen Tumoren verglichen und zu Stammzellmarkern korreliert.

Zunächst wurde die Expression der Stammzellmarker Nestin, ALDH1A3 und CXCR4, sowie des Differenzierungsmarkers GFAP zwischen den Stammzellkulturen und den Tumoren betrachtet. Dabei wurde deutlich, dass es sich bei Gliosphäroiden vermutlich um GSZ angereicherte Kulturen handelt, da sie den allgemeinen Stammzellmarker Nestin in allen vergleichenden Proben signifikant höher exprimieren. Des Weiteren ist die GFAP-Expression in Sphäroiden signifikant niedriger als in den ursprünglichen Resektaten. Die weiteren Marker ALDH1A3, der vor allem in mesenchymalen Stammzellen exprimiert wird und CXCR4, der als ein mögliches radiosensitivierendes Zielmolekül gehandelt wird, werden nicht uneingeschränkt vermehrt in Sphäroiden exprimiert.

Während der Kultivierung der GSZ zeigten sich zwei verschiedenen Phänotypen; adhärenente Sphäroide und freischwebende Sphäroide. Auch hinsichtlich ihrer DNA-Reparaturkapazität in der  $\gamma$ H2AX-Foci Analyse zeigten sich signifikante Unterschiede. Während freischwebende Sphäroide eine sehr ausgeprägte Strahlenresistenz zeigten und signifikant resistenter als ihre ursprünglichen Tumoren waren, zeigten adhärenente Sphäroide eine signifikant niedrigere Strahlenresistenz. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich bei diesen Stammzellkulturen um Zellkonglomerate handelt, die vermehrt differenzierte Zellen beinhalten. Hierfür spricht auch, dass sie eine Tendenz zu einer positiven linearen Korrelation hinsichtlich ihrer Strahlenresistenz zu ihrem ursprünglichen Tumorgewebe zeigen. Aufgrund dieser Erkenntnisse könnten adhärenente Sphäroide ein geeignetes Langzeitmodell in der experimentellen Radioonkologie sein.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der freischwebenden Sphäroide lassen vermuten, dass es sich hierbei um Zellpopulationen handelt, die einen

stammzellähnlichen Charakter haben. Einer der Gründe für die ausgeprägte Strahlenresistenz dieser Zellen könnte ein besonders effektiver DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismus sein. Im Foci-Induktionsversuch konnte beobachtet werden, dass trotz einer Vielzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung, innerhalb von 24 Stunden nahezu alle Foci repariert wurden. Es wurde jedoch keine Korrelation zwischen diesen Stammzellkulturen und den ursprünglichen Tumoren festgestellt. Dennoch zeigen die Untersuchungen, dass GSZ in Form von freischwebenden Kulturen eine ausgesprochen ausgeprägte Radioresistenz besitzen. Zusammenfassend gibt es deutliche Hinweise darauf, dass die GSZ einen erheblichen Beitrag zur Radioresistenz von Glioblastomen beitragen und ein limitierender Faktor in der Therapie sein könnten. Aufgrund ihrer ausgeprägten Radioresistenz gilt es besonders diese Zellen durch eine effektive Therapie zu eradizieren.

## 6 Anhang

**Tabelle 24: Tissue Definiens Studio Einstellungen**

	<b>ALDH1A3</b>	<b>CXCR4</b>	<b>Nestin</b>
<b>Magnification</b>	40	40	40
<b>µm/pixel</b>	0,23	0,23	0,23
<b>IHC marker</b>	nuclear	nuclear	nuclear
<b>Tissue detection</b>	automatic	automatic	automatic
<b>Tissue min size</b>	490	490	110
<b>Measurement in</b>	cytoplasm	cytoplasm	cytoplasm
<b>Threshold none/low</b>	0,05	0,2	0,2
<b>Threshold low/medium</b>	0,1	0,3	0,6
<b>Threshold medium/high</b>	0,3	0,5	1,0

**Tabelle 25: ALDH1A3-Expressionsanalyse**

<b>Patient #</b>	<b>Resektat</b>	<b>Glio-sphäroide</b>	<b>Median Resektat</b>	<b>Median Gliosphäroide</b>	<b>Mann-Whitney Test</b>
<b>1</b>	0,58	1,64			
<b>2</b>	1,04	0,73			
<b>3</b>	1,48	0,83			
<b>4</b>	1,94	1,78			
<b>5</b>	1,04	1,64	1,63	1,67	P=0,93
<b>6</b>	1,78	2,11			
<b>7</b>	1,91	1,53			
<b>8</b>	1,10	1,98			
<b>9</b>	2,01	1,93			
<b>10</b>	2,12	1,73			

**Tabelle 26: CXCR4-Expressionsanalyse**

<b>Patient #</b>	<b>Resektat</b>	<b>Glio-sphäroide</b>	<b>Median Resektat</b>	<b>Median Gliosphäroide</b>	<b>Mann-Whitney Test</b>
<b>1</b>	0,00	0,00			
<b>2</b>	0,00	0,41			
<b>3</b>	0,05	0,00			
<b>4</b>	0,02	0,63			
<b>5</b>	0,05	0,14	0,03	0,34	P=0,17
<b>6</b>	0,09	0,01			
<b>7</b>	0,00	0,29			
<b>8</b>	0,01	0,78			
<b>9</b>	0,35	1,05			
<b>10</b>	0,79	0,39			

## 7 Literaturverzeichnis

1. Riedel, A., et al., *γH2AX foci assay in glioblastoma: surgical specimen versus corresponding stem cell culture*. Radiother Oncol, 2021.
2. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012*. Neuro Oncol, 2015. **17 Suppl 4**: p. iv1-iv62.
3. Papaevangelou, G., et al., *Cerebellar Glioblastoma in a Child*. Pediatr Neurosurg, 2017. **52**(3): p. 211-213.
4. Noroxe, D.S., H.S. Poulsen, and U. Lassen, *Hallmarks of glioblastoma: a systematic review*. ESMO Open, 2016. **1**(6): p. e000144.
5. Stupp, R., et al., *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. Lancet Oncol, 2009. **10**(5): p. 459-66.
6. Omuro, A. and L.M. DeAngelis, *Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review*. JAMA, 2013. **310**(17): p. 1842-50.
7. Bondy, M.L., et al., *Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium*. Cancer, 2008. **113**(7 Suppl): p. 1953-68.
8. Ohgaki, H., *Epidemiology of brain tumors*. Methods Mol Biol, 2009. **472**: p. 323-42.
9. Linsenmann, T., et al., *Long-term tumor control of spinal dissemination of cerebellar glioblastoma multiforme by combined adjuvant bevacizumab antibody therapy: a case report*. BMC Res Notes, 2014. **7**: p. 496.
10. Takahashi, Y., et al., *Clinical characteristics and pathogenesis of cerebellar glioblastoma*. Mol Med Rep, 2014. **10**(5): p. 2383-8.
11. 9 ZNS, in *Duale Reihe Radiologie*, M. Reiser, F.-P. Kuhn, and J. Debus, Editors. 2006, Georg Thieme Verlag.
12. Th. Kirchner, H.K.M.-H., A. Roessner, *Kurzlehrbuch Pathologie*. 2014: Elsevier
13. Zacher, A., et al., *Molecular Diagnostics of Gliomas Using Next Generation Sequencing of a Glioma-Tailored Gene Panel*. Brain Pathol, 2017. **27**(2): p. 146-159.
14. Parsons, D.W., et al., *An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1807-1812.
15. Aldape, K., et al., *Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers*. Acta Neuropathologica, 2015. **129**(6): p. 829-848.
16. Binabaj, M.M., et al., *The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials*. Journal of Cellular Physiology, 2018. **233**(1): p. 378-386.
17. Gilbert, M.R., et al., *Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial*. J Clin Oncol, 2013. **31**(32): p. 4085-91.
18. Brennan, C.W., et al., *The somatic genomic landscape of glioblastoma*. Cell, 2013. **155**(2): p. 462-77.
19. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 98-110.
20. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
21. Wilson, T.A., M.A. Karajannis, and D.H. Harter, *Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics*. Surg Neurol Int, 2014. **5**: p. 64.
22. Haj, A., et al., *Extent of Resection in Newly Diagnosed Glioblastoma: Impact of a Specialized Neuro-Oncology Care Center*. Brain Sci, 2017. **8**(1).
23. Lakomkin, N. and C.G. Hadjipanayis, *Fluorescence-guided surgery for high-grade gliomas*. Journal of Surgical Oncology, 2018. **118**(2): p. 356-361.

24. Wach, J., et al., *Dual-Use Intraoperative MRI in Glioblastoma Surgery: Results of Resection, Histopathologic Assessment, and Surgical Site Infections*. J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg, 2019. **80**(6): p. 413-422.
25. Sanai, N. and M.S. Berger, *Intraoperative stimulation techniques for functional pathway preservation and glioma resection*. Neurosurg Focus, 2010. **28**(2): p. E1.
26. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
27. Stupp, R., et al., *Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial*. JAMA, 2017. **318**(23): p. 2306-2316.
28. Chinot, O.L., et al., *Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(8): p. 709-722.
29. Herrlinger, U., et al., *Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial*. Lancet, 2019. **393**(10172): p. 678-688.
30. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
31. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
32. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
33. Rich, J.N. and C.E. Eyler, *Cancer stem cells in brain tumor biology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2008. **73**: p. 411-20.
34. Bao, S., et al., *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. Nature, 2006. **444**(7120): p. 756-60.
35. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
36. Rycaj, K. and D.G. Tang, *Cancer stem cells and radioresistance*. Int J Radiat Biol, 2014. **90**(8): p. 615-21.
37. Azari, H., et al., *Isolation and expansion of human glioblastoma multiforme tumor cells using the neurosphere assay*. J Vis Exp, 2011(56): p. e3633.
38. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
39. Kondo, T., T. Setoguchi, and T. Taga, *Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(3): p. 781-6.
40. Singec, I., et al., *Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology*. Nat Methods, 2006. **3**(10): p. 801-6.
41. Zhang, M., et al., *Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients*. J Exp Clin Cancer Res, 2008. **27**: p. 85.
42. Kemper, K., et al., *The AC133 Epitope, but not the CD133 Protein, Is Lost upon Cancer Stem Cell Differentiation*. Cancer Research, 2010. **70**(2): p. 719-729.
43. Glumac, P.M. and A.M. LeBeau, *The role of CD133 in cancer: a concise review*. Clin Transl Med, 2018. **7**(1): p. 18.
44. Barrantes-Freer, A., et al., *CD133 Expression Is Not Synonymous to Immunoreactivity for AC133 and Fluctuates throughout the Cell Cycle in Glioma Stem-Like Cells*. PLOS ONE, 2015. **10**(6): p. e0130519.
45. Stanzani, E., et al., *Radioresistance of mesenchymal glioblastoma initiating cells correlates with patient outcome and is associated with activation of inflammatory program*. Oncotarget, 2017. **8**(43): p. 73640-73653.
46. Chandran, U.R., et al., *Gene expression profiling distinguishes proneural glioma stem cells from mesenchymal glioma stem cells*. Genom Data, 2015. **5**: p. 333-336.

47. Ying, M., et al., *Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition*. *Oncogene*, 2011. **30**(31): p. 3454-67.
48. Li, G., et al., *ALDH1A3 induces mesenchymal differentiation and serves as a predictor for survival in glioblastoma*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(12): p. 1190.
49. Liu, G., et al., *Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma*. *Mol Cancer*, 2006. **5**: p. 67.
50. Salmaggi, A., et al., *Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype*. *Glia*, 2006. **54**(8): p. 850-860.
51. Eckert, F., et al., *Potential Role of CXCR4 Targeting in the Context of Radiotherapy and Immunotherapy of Cancer*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 3018.
52. Kozin, S.V., et al., *Recruitment of myeloid but not endothelial precursor cells facilitates tumor regrowth after local irradiation*. *Cancer Res*, 2010. **70**(14): p. 5679-85.
53. Moeller, B.J., et al., *Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules*. *Cancer Cell*, 2004. **5**(5): p. 429-41.
54. Bian, X.-w., et al., *PREFERENTIAL EXPRESSION OF CHEMOKINE RECEPTOR CXCR4 BY HIGHLY MALIGNANT HUMAN GLIOMAS AND ITS ASSOCIATION WITH POOR PATIENT SURVIVAL*. *Neurosurgery*, 2007. **61**(3): p. 570-579.
55. Middeldorp, J. and E.M. Hol, *GFAP in health and disease*. *Prog Neurobiol*, 2011. **93**(3): p. 421-43.
56. van Bodegraven, E.J., et al., *Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma*. *Glia*, 2019. **67**(8): p. 1417-1433.
57. Bramanti, V., et al., *Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture*. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2010. **2**: p. 558-70.
58. Schonberg, D.L., et al., *Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy*. *Mol Aspects Med*, 2014. **39**: p. 82-101.
59. Cheng, L., et al., *Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth*. *Cell*, 2013. **153**(1): p. 139-52.
60. Bao, S., et al., *Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor*. *Cancer Research*, 2006. **66**(16): p. 7843-7848.
61. Evans, S.M., et al., *The Relationship among Hypoxia, Proliferation, and Outcome in Patients with De Novo Glioblastoma: A Pilot Study*. *Transl Oncol*, 2010. **3**(3): p. 160-9.
62. Pistollato, F., et al., *Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma*. *Stem Cells*, 2010. **28**(5): p. 851-62.
63. Wei, J., et al., *Hypoxia Potentiates Glioma-Mediated Immunosuppression*. *PLOS ONE*, 2011. **6**(1): p. e16195.
64. Menegakis, A., et al., *Residual gammaH2AX foci after ex vivo irradiation of patient samples with known tumour-type specific differences in radio-responsiveness*. *Radiother Oncol*, 2015. **116**(3): p. 480-5.
65. Menegakis, A., et al., *gammaH2AX assay in ex vivo irradiated tumour specimens: A novel method to determine tumour radiation sensitivity in patient-derived material*. *Radiother Oncol*, 2015. **116**(3): p. 473-9.
66. Carruthers, R.D., et al., *Replication Stress Drives Constitutive Activation of the DNA Damage Response and Radioresistance in Glioblastoma Stem-like Cells*. *Cancer Res*, 2018. **78**(17): p. 5060-5071.
67. Nguyen, H.S., et al., *Molecular Markers of Therapy-Resistant Glioblastoma and Potential Strategy to Combat Resistance*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(6).
68. Taghian, A., et al., *In vivo radiation sensitivity of glioblastoma multiforme*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1995. **32**(1): p. 99-104.
69. Carruthers, R., et al., *Abrogation of radioresistance in glioblastoma stem-like cells by inhibition of ATM kinase*. *Mol Oncol*, 2015. **9**(1): p. 192-203.
70. Baumann, M., M. Krause, and R. Hill, *Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(7): p. 545-54.

71. Dingli, D. and F. Michor, *Successful therapy must eradicate cancer stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(12): p. 2603-10.
72. Lim, Y.C., et al., *A role for homologous recombination and abnormal cell-cycle progression in radioresistance of glioma-initiating cells*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(9): p. 1863-72.
73. Weber, K.-J. and F. Wenz, *Strahlenbiologische Grundlagen*, in *Strahlentherapie*, M. Wannemacher, F. Wenz, and J. Debus, Editors. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 47-85.
74. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 2009. **461**(7267): p. 1071-1078.
75. Ward, I. and J. Chen, *Early events in the DNA damage response*. Curr Top Dev Biol, 2004. **63**: p. 1-35.
76. Lieber, M.R., *The mechanism of human nonhomologous DNA end joining*. J Biol Chem, 2008. **283**(1): p. 1-5.
77. Downs, J.A. and S.P. Jackson, *A means to a DNA end: the many roles of Ku*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 367-78.
78. Goodarzi, A.A., et al., *DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity*. Embo j, 2006. **25**(16): p. 3880-9.
79. Ahnesorg, P., P. Smith, and S.P. Jackson, *XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining*. Cell, 2006. **124**(2): p. 301-13.
80. Pallis, A.G. and M.V. Karamouzis, *DNA repair pathways and their implication in cancer treatment*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(4): p. 677-85.
81. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
82. Fernandez-Capetillo, O., et al., *H2AX: the histone guardian of the genome*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 959-67.
83. Stiff, T., et al., *ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2390-6.
84. Keogh, M.C., et al., *A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery*. Nature, 2006. **439**(7075): p. 497-501.
85. Olive, P.L., *Retention of  $\gamma$ H2AX foci as an indication of lethal DNA damage*. Radiotherapy and Oncology, 2011. **101**(1): p. 18-23.
86. Kato, T.A., et al., *Levels of gamma-H2AX Foci after low-dose-rate irradiation reveal a DNA DSB rejoining defect in cells from human ATM heterozygotes in two at families and in another apparently normal individual*. Radiat Res, 2006. **166**(3): p. 443-53.
87. Kuhne, M., et al., *A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity*. Cancer Res, 2004. **64**(2): p. 500-8.
88. Menegakis, A., et al., *Prediction of clonogenic cell survival curves based on the number of residual DNA double strand breaks measured by  $\gamma$ H2AX staining*. International Journal of Radiation Biology, 2009. **85**(11): p. 1032-1041.
89. Menegakis, A., et al., *Residual DNA double strand breaks in perfused but not in unperfused areas determine different radiosensitivity of tumours*. Radiother Oncol, 2011. **100**(1): p. 137-44.
90. Hauth, F., et al., *Cell-line dependent effects of hypoxia prior to irradiation in squamous cell carcinoma lines*. Clinical and Translational Radiation Oncology, 2017. **5**: p. 12-19.
91. De-Colle, C., et al., *Ex vivo gammaH2AX radiation sensitivity assay in prostate cancer: Inter-patient and intra-patient heterogeneity*. Radiother Oncol, 2017. **124**(3): p. 386-394.
92. Sedelnikova, O.A., et al., *Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(2): p. 168-70.
93. Rogakou, E.P., et al., *Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9390-5.

94. Löbrich, M., et al., *gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization*. Cell Cycle, 2010. **9**(4): p. 662-9.
  95. Lathia, J.D., et al., *Cancer stem cells in glioblastoma*. Genes Dev, 2015. **29**(12): p. 1203-17.
  96. Mao, P., et al., *Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(21): p. 8644-9.
  97. Gagliardi, F., et al., *The role of CXCR4 in highly malignant human gliomas biology: current knowledge and future directions*. Glia, 2014. **62**(7): p. 1015-23.
  98. Lang, G., *Histotechnik*. 2013: Springer-Verlag Wien.
  99. Hermey, G., et al., *Der Experimentator: Neurowissenschaften*. Vol. X, 278. 2011: Springer Spektrum.
  100. Schittenhelm, J., et al., *Longitudinal expression analysis of alphav integrins in human gliomas reveals upregulation of integrin alphavbeta3 as a negative prognostic factor*. J Neuropathol Exp Neurol, 2013. **72**(3): p. 194-210.
  101. Mercurio, L., et al., *Targeting CXCR4 by a selective peptide antagonist modulates tumor microenvironment and microglia reactivity in a human glioblastoma model*. J Exp Clin Cancer Res, 2016. **35**: p. 55.
  102. Mercurio, L., et al., *Phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibition down-regulates CXCR4 expression and interferes with proliferation, invasion and glycolysis in glioma cells*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0176108.
  103. Tamura, K., et al., *Expansion of CD133-positive glioma cells in recurrent de novo glioblastomas after radiotherapy and chemotherapy*. J Neurosurg, 2013. **119**(5): p. 1145-55.
  104. Klumpp, L., et al., *KCa3.1 channels and glioblastoma: in vitro studies*. Curr Neuropharmacol, 2017.
  105. Günther, H.S., et al., *Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria*. Oncogene, 2008. **27**(20): p. 2897-2909.
  106. Klumpp, L., et al., *KCa3.1 Channels and Glioblastoma: In Vitro Studies*. Curr Neuropharmacol, 2018. **16**(5): p. 627-635.
  107. Neradil, J. and R. Veselska, *Nestin as a marker of cancer stem cells*. Cancer Science, 2015. **106**(7): p. 803-811.
  108. Dahlstrand, J., V.P. Collins, and U. Lendahl, *Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors*. Cancer Res, 1992. **52**(19): p. 5334-41.
  109. Ivashkevich, A., et al., *Use of the gamma-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research*. Cancer Lett, 2012. **327**(1-2): p. 123-33.
  110. Bhat, K.P.L., et al., *Mesenchymal differentiation mediated by NF- $\kappa$ B promotes radiation resistance in glioblastoma*. Cancer Cell, 2013. **24**(3): p. 331-46.
  111. Carro, M.S., et al., *The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours*. Nature, 2010. **463**(7279): p. 318-25.
  112. Burger, J.A. and T.J. Kipps, *CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment*. Blood, 2006. **107**(5): p. 1761-7.
-

## 8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Radioonkologie unter Betreuung von Professor Daniel Zips durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Professor Daniel Zips in Zusammenarbeit mit Professor Stephan Huber (AG-Leiter Experimentelle Radioonkologie)

Die Gewinnung der Proben erfolgte im Universitätsklinikum für Neurochirurgie Tübingen. In Zusammenarbeit mit Herrn Professor Marcos Tatagiba und Frau Privatdozentin Noell erfolgte die Etablierung einer geeigneten Probenaufbearbeitung.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Lukas, Klumpp M. Sc., Prof. Stephan Huber, Heidrun Faltin) von mir eigenständig durchgeführt. Die immunhistochemischen Färbungen der Marker GFAP, Nestin, CXCR4 und ALDH1A3 wurden in Zusammenarbeit mit Frau Professorin Neumann am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Die Validierung der Glioblastomresektate und der geeigneten Bereiche zur Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Jens Schittenhelm (Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen).

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Doktor Chiara De-Colle und Doktor Apostolos Menegakis durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 09.10.2021

---

## 9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Daniel Zips für das Überlassen dieses Themas, die inhaltliche Unterstützung und die ausgezeichnete Betreuung bedanken.

Ich möchte mich auch bei Herrn Professor Stephan Huber für seine Einarbeitung und die fachlichen Diskussionen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit sehr geholfen haben.

Für die Unterstützung bei der Auswertung der Färbungen möchte ich mich bei Professor Jens Schittenhelm bedanken.

Auch dem Team der AG Huber und insbesondere Lukas Klumpp möchte ich danken. Durch die herzliche Art, die gute Atmosphäre im Labor und die hervorragende Einarbeitung brachte mir die gemeinschaftliche Arbeit immer viel Freude.

Frau Doktor Chiara de-Colle möchte ich für die Einführung in die  $\gamma$ H2AX-Auswertung danken.

Mein besonderer Dank gilt auch dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen für die gute wissenschaftliche Betreuung und die finanzielle Unterstützung.