

Aus der neurochirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Erstellung eines experimentellen Modells für radiochemoresistente Glioblastomzellen  
und Charakterisierung der Folgen klinisch relevanter Strahlen- und Temozolomid-  
Dosen auf Stammzelleneigenschaften, Proliferation und Chromatinstruktur in  
menschlichen Glioblastom-Stammzellen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Alhassan Elmasri  
aus Bochum

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild  
1. Gutachter: Prof. Dr. med. S. R. Kantelhardt  
2. Gutachter: PD Dr. med. D. Kalasauskas  
  
Tag der Promotion: 18.12.2024

Ihm, der mir dies ermöglichte

Meinen Eltern, denen ich nicht genug danken kann

Ezadin, der immer einen Platz in meinem Herzen innehat

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VII
1 Einleitung .....	1
2 Literaturdiskussion .....	2
2.1 Glioblastome.....	2
2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	2
2.1.2 WHO-Klassifikation – histomorphologische und klinische Kennzeichen.....	3
2.1.3 Klinischer Verlauf und Prognose.....	4
2.2 Aktueller Therapiestandard für Glioblastome .....	5
2.2.1 Chirurgische Therapie .....	5
2.2.2 Strahlentherapie .....	6
2.2.3 Chemotherapie .....	8
2.3 Molekulare Kennzeichen von Glioblastoma .....	11
2.3.1 Genetische Aberrationen .....	11
2.3.2 Epigenetische Merkmale .....	13
2.3.3 Bedeutende molekulare Subtypen in GB .....	13
2.4 Therapieresistenz .....	14
2.4.1 Rezidivierfähigkeit und Rezidivtherapie bei GB.....	14
2.4.2 Mechanismen der GB-Therapieresistenz.....	15
2.5 Intratumorale Heterogenität und Glioblastomstammzellen .....	24
2.5.1 Intratumorale Heterogenität .....	24
2.5.2 Konzept der Krebsstammzellen .....	25
2.5.3 Modelle des Glioblastom-Netzwerks.....	26
2.5.4 Tumormicroenvironment und Tumornischen.....	28
2.5.5 Phänotypische GSC-Marker .....	29
2.5.6 Epigenetische Mechanismen in GB und GSC.....	31
2.5.7 Experimentelle Methoden zur Untersuchung von GSC .....	38
2.5.8 Die Rolle von GSC in GB-Therapieresistenz.....	42
3 Materialien .....	46
3.1 Zelllinien .....	46
3.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits .....	47
3.3 Puffer, Medien und Zusätze.....	48
3.4 Antikörper .....	48
3.5 Enzyme, Proteine, Farbstoffe und Marker.....	49
3.6 Verbrauchsmaterialien .....	49
3.7 Laborgeräte .....	50
3.8 Datenverarbeitungsprogramme .....	51
4 Methoden.....	52
4.1 Zellkultur.....	52

4.1.1	Kultivierbedingungen und Herstellung des Mediums.....	52
4.1.2	Kultivierung von GSC-Sphärenkulturen .....	53
4.1.3	Kryokonservierung, Auftauen und Wiederkultivierung von GSC.....	53
4.2	Bestrahlung der Zellen.....	54
4.3	Selektion der Zellen durch Temozolomidbehandlung.....	54
4.3.1	Selektionsprozess .....	54
4.3.2	Herstellung der Temozolomid-Arbeitsstocklösung und Behandlungsschema .	55
4.4	Bestimmung der Selbsterneuerungskapazität durch das Extreme Limited Dilution Assay	56
4.4.1	Prinzip des Extreme-Limited-Dilution-Assays.....	56
4.4.2	Durchführung.....	56
4.4.3	Auswertung des Extreme-Limited-Dilution-Assays.....	57
4.5	Immunfluoreszenzfärbung .....	58
4.5.1	Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung .....	58
4.5.2	Herstellung von ornithinbeschichteten Deckgläschen .....	59
4.5.3	Vorbereitung: Zellausplattierung auf Deckgläschen .....	60
4.5.4	Fixierung der Zellen und Färben mit Primärantikörper .....	60
4.5.5	Auftragen der Sekundärantikörper .....	62
4.5.6	Dokumentation der gefärbten Zellen.....	63
4.5.7	Immunfluoreszenz-Auswertung .....	64
4.6	Live-Cell-Imaging-Mikroskopie.....	68
4.6.1	Auswertung der Verdopplungszeit via Live-Cell-Imaging .....	68
4.7	FAIRE.....	69
5	Ergebnisse.....	70
5.1	Zielsetzung und Design der Studie .....	70
5.2	Etablierung eines experimentellen Modells für TMZ-resistente GSC .....	70
5.3	Die Auswirkungen der TMZ-Behandlung auf die Selbsterneuerung von unbehandelten oder vorbestrahlten GSC .....	73
5.4	Auswirkungen von TMZ auf das Differenzierungspotenzial von unbestrahlten oder strahlenselektierten GSC .....	73
5.5	Die Auswirkungen der TMZ-Behandlung auf die Proliferation von GSC.....	76
5.6	Die Auswirkungen von TMZ auf die Genexpression in bestrahlten GSC.....	79
5.6.1	Optimierung des Protokolls und Generierung von FAIRE-DNA aus humanen GSC	80
5.6.2	Quantifizierung der Pure FAIRE DNA und der Input-Control-DNA .....	84
5.6.3	FAIREseq-Ergebnisse .....	85
6	Diskussion.....	90
6.1	Vorteile und Limitationen des experimentellen Modells.....	90
6.2	Zeitliche Dynamik und bestrahlungsvermittelter Konterkarieren der TMZ-Zytotoxizität	92
6.3	Selbsterneuerungskapazität unter TMZ .....	93
6.3.1	Vorteile und Limitationen des ELDA .....	93

6.3.2	TMZ-vermittelte Verstärkung der Stammzellkapazität von GSC .....	94
6.3.3	Erhöhung der Selbsterneuerungskapazität von GSC durch Strahlentherapie .	95
6.4	Negative Korrelation zwischen TMZ- und Strahlungsresistenz und Differenzierungsgrad.....	96
6.5	Proliferationsfördernde Wirkung der TMZ- und Strahlenresistenz .....	97
6.6	Verlängerte Zellzyklusdauer nach TMZ-Selektion.....	98
6.7	Globale Chromatinkondensation und locuspezifische Chromatinöffnung unter TMZ 100	
6.8	Breites Wirkungsspektrum von Dimethylsulfoxid.....	101
6.9	Schlussfolgerungen .....	102
7	Zusammenfassung.....	104
8	Literaturverzeichnis .....	106
9	Anhang .....	134
10	Danksagung.....	135

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
5mC	5-Methylcytosin
ABC	ATP binding cassette
ALDH	Aldehyddehydrogenase
BER	Basen-Exzisionsreparatur
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
d	Cohen's d
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
Extreme-Limited-Dilution-Assay	ELDA
FcR	Fc Receptor
GB	Glioblastome
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GSC	Glioblastom-Stammzelle
Gy	Gray
H <sub>2</sub> O	Wasser
HDAC	Histondeacetylase
i.d.R.	in der Regel
IDH	Isocitratdehydrogenase
IgG	Immunglobulin G
iPSC	induzierte pluripotente Stammzelle
IR	ionizing radiation
KCl	Kaliumchlorid
KPS	Karnofsky Performance Status
L	Liter
mg	Milligramm
Min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MSP	methylation-specific PCR
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nGB	neu diagnostiziertes Glioblastom
Ø	Durchmesser
O6-meG	O6-Methylguanin
OCT4	Octamer binding transcription factor 4

OS.....	overall survival
PBS.....	Phosphat buffered saline
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion
PFA.....	Paraformaldehyd
PFS.....	progression-free survival
pH.....	pondus Hydrogenii
rGB.....	rekurrentes Glioblastom
RNase.....	Ribonuklease
ROS.....	reaktive oxidative Spezies
rpm.....	revolutions per minute (eng.) - Umdrehungen pro Minute
RT.....	Radiation
scRNA-Seq.....	single cell RNA sequencing
SDS.....	Natriumdodecylsulfat
Smo.....	Smoothened
SOX2.....	Sex determining region Y (SRY)- box 2
SP.....	unbestrahlt
SZF.....	Stammzellfrequenz
T.....	Thymin
TET.....	Ten eleven translocation
TME.....	Tumormicroenvironment
TMZ.....	Temozolomid
TRIS.....	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V.....	Volt
Vol.....	Volumen
WHO.....	World Health Organization
wt/vol%.....	weight/volume %
ZNS.....	Zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MRT- und immunhistochemische Darstellung eines GB .....	3
Abbildung 2: Algorithmus der Standardtherapie neu diagnostizierter Glioblastome .....	6
Abbildung 3: Einteilung strahleninduzierter DNA-Schäden .....	7
Abbildung 4: Chemische Umwandlung und Reaktion von TMZ bei physiologischem pH .....	9
Abbildung 5: Glioblastom-Klassifikation .....	12
Abbildung 6: Modell der GB-Rezidiventwicklung .....	18
Abbildung 7: Lineare und verzweigte Evolution rekurrenter GB .....	19
Abbildung 8: Reparaturmechanismus von MGMT .....	22
Abbildung 9: Chromatin-Aufbau und Kondensationsgrad .....	32
Abbildung 10: Regulation der Chromatinstruktur .....	32
Abbildung 11: Tumorsphären der Zelllinien #1051 und #1051_IR .....	46
Abbildung 12: Verdünnungsmuster des ELDA .....	57
Abbildung 13: Indirekte Immunfluoreszenz und Doppelfärbung .....	59
Abbildung 14: Primärantikörper-Gemische .....	61
Abbildung 15: Verteilungsmuster der Primärantikörper .....	62
Abbildung 16: Färbungskombinationen pro Zelllinie .....	64
Abbildung 17: Mischmodi von DAPI- und GFAP-Färbung .....	65
Abbildung 18: Mischmodi von DAPI- und Nestin-Färbung .....	66
Abbildung 19: Mischmodi von DAPI- und Ki67-Färbung .....	67
Abbildung 20: Studiendesign zur Charakterisierung von phänotypischen und epigenetischen Veränderungen in GSC nach TMZ-Behandlung .....	70
Abbildung 21: Zellviabilität während des Selektionsprozesses .....	71
Abbildung 22: Selektion von TMZ-resistenten Populationen der GSC-Linie #1051 .....	73
Abbildung 23: Vergleichende Bewertungen der Selbsterneuerungskapazität in TMZ- selektierten GSC .....	75
Abbildung 24: Auswirkungen von TMZ auf die GFAP-Expression unter selbsterneuerungsfördernden und differenzierungsinduzierenden Bedingungen in unbestrahlten und bestrahlten GSC .....	76
Abbildung 25: Auswirkungen von TMZ auf die Proliferationsfähigkeit unter selbsterneuerungsfördernden und differenzierungsinduzierenden Bedingungen in unbestrahlten und bestrahlten GSC .....	77
Abbildung 26: Bestimmung der Zellverdopplungszeit mittels Live-Mikroskopie .....	78
Abbildung 27: Auswirkungen von TMZ auf die Verdopplungszeit unter selbsterneuerungsfördernden Bedingungen in unbestrahlten und bestrahlten GSC .....	79
Abbildung 28: FAIRE-Etappen und -Zeitrahen .....	81
Abbildung 29: Anfärbung der Input-Control-DNA (116-146-200 Zyklen) nach Gelelektrophorese .....	82
Abbildung 30: Anfärbung der Input-Control-DNA (200 Zyklen) nach Gelelektrophorese .....	84
Abbildung 31: Zusammenfassung der FAIRE-Analysen - Überblick .....	87
Abbildung 32: Zusammenfassung der FAIRE-Analysen – Funktionelle und Signalweg-Analyse .....	89

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien .....	47
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien .....	47
Tabelle 3: Puffer, Medien und Zusätze .....	48
Tabelle 4: Antikörper .....	48
Tabelle 5: Enzyme, Proteine, Farbstoffe und Marker .....	49
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien .....	49
Tabelle 7: Laborgeräte .....	50
Tabelle 8: Datenverarbeitungsprogramme.....	51
Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Medien.....	52
Tabelle 10: Exemplarisches Behandlungsschema.....	55
Tabelle 11: Exemplarische ELDA-Auswertung .....	57
Tabelle 12: Absorptions- und Emissionsspektren .....	63
Tabelle 13: Belichtungszeiten der Färbungen.....	63
Tabelle 14: Ratio FAIRE-DNA/Input-Control-DNA .....	84

# 1 Einleitung

Im Zeitalter der aufstrebenden personalisierten Krebsmedizin wird eine molekular definierte und maßgeschneiderte Krebstherapie für jeden Menschen individuell angestrebt. Eine Tumorentität, die trotz intensiver Erforschung ihrer molekularen Charakteristika bisher keinen breiten klinischen Nutzen für Erkrankte erfuhr ist das Glioblastom (GB). Es ist eines der häufigsten ZNS-Tumore und stellt unter ihnen die häufigste Todesursache dar [18]. Es weist aufgrund seiner ausgeprägten Aggressivität und Malignität eine äußerst schlechte Prognose auf mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von ca. 15 Monaten [18-20]. Trotz multimodaler Therapie mittels größtmöglicher Resektion, Strahlentherapie und Chemotherapie mit Temozolomid hat sich hieran in den letzten nahezu zwei Jahrzehnten prognostisch nur wenig geändert [21, 22]. Grund hierfür ist eine ausgeprägte Therapieresistenz von GB, die den Therapieerfolg auf den Behandlungsbeginn limitiert und nahezu immer zur Bildung eines noch resistenteren Rezidivtumors führt, der nur unzureichend zu behandeln ist und eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von nur 5 – 7 % bedingt [18-20]. Die Therapieresistenz von GB ist dabei sowohl gegen die Strahlen- wie Chemotherapie gerichtet und besteht aus inhärenten wie erworbenen Resistenzmechanismen. Letztere wirken sich durch molekulare dynamische Veränderungen infolge der Therapie aus, wie bspw. neue Mutationen und Dysregulation von Signalwegen [5, 23, 24]. Die inhärente Resistenz umfasst dagegen ureigene Elemente, wie der genetischen Instabilität und deregulierten wachstumsfördernden Signalwegen ([25, 26]), einer verstärkten DNA-Reparaturkapazität ([27, 28]) und einer ausgeprägten Tumorerheterogenität. Diese bezeichnet die Existenz von unterschiedlichen Tumorzelltypen inmitten desselben Tumors, die eine effektive Therapie aller Tumorzellen verhindert und zu einer Selektion von resistenteren Tumorzellen führt [29, 30].

Innerhalb dieser unterschiedlichen Tumorzellen desselben GB sticht dabei eine Subgruppe hervor, die zum einen unlimitiert proliferieren und sich selbsterneuern kann und zum anderen der Grund für die Heterogenität ist, da sie Tumorzellen mit unterschiedlicher genetischer und phänotypischer Ausstattung bilden kann. Diese stammzellähnlichen Zellen werden als Glioblastom-Stammzellen (GSC) bezeichnet und nehmen eine zentrale Rolle in der Therapieresistenz von GB ein [29, 31, 32]. Sie werden als Schlüsselement für die Erhaltung, das Wachstum und die Rezidivbildung von GB angesehen, da sie durch ihr vielfältiges Repertoire an Mechanismen dem Glioblastom Resistenz gegen die unterschiedlichen Therapien verleihen [33-35]. Sie können zum einen durch ihre intrinsische Robustheit den therapeutischen Druck überleben und ihn zum anderen durch die Variabilität ihrer genetischen Programme und epigenetischer Regulation umgehen [36-38]. Dabei spielen therapieinduzierte Veränderungen auf der Ebene des Transkriptoms und der Signalwege wie des Epigenoms eine zentrale Rolle in der Evolution von GSC, die hierdurch den malignen Progress und die Rezidivbildung diktieren [39]. Die Charakterisierung dieser longitudinalen Veränderungen und Anpassungen von GSC wie die Erforschung ihrer therapieinduzierten Veränderungen bedürfen der intensiven und systematischen Erforschung. Sie sind von wesentlicher Bedeutung für das Verständnis der globalen Therapieresistenz von GB und Grundlage für die Entwicklung einer zielgerichteten prognoseverbessernden Therapie für an Glioblastomen erkrankte Menschen.

Dementsprechend war das Ziel der vorliegenden Arbeit zum einen die Etablierung eines experimentellen Modells, das therapieresistente GSC hervorbringt und damit die therapieinduzierten Veränderungen in ihnen rekapituliert, um somit die Erforschung dieser Veränderungen zu ermöglichen. Zum anderen zielte sie auf die direkte Anwendung dieses Modells ab durch die Charakterisierung der therapieresistenten GSC auf zellulärer, phänotypischer und epigenetischer Ebene für die einzelnen Behandlungsmodalitäten aus Temozolomid und Strahlentherapie wie ihrer Kombination, um neue Einblicke in die dynamische Pathophysiologie von GSC und ihren Resistenzmechanismen zu gewinnen.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Glioblastome

#### 2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Glioblastome (GB) sind eine der häufigsten Tumorentitäten des ZNS. Während sie unter allen ZNS-Tumoren einen Anteil von 16 % besitzen, bilden sie die häufigste Todesursache unter ihnen [18]. Sie stellen mit 45 - 49 % den häufigsten malignen hirneigenen Tumor dar [18, 40]. Zugleich sind sie nach WHO-Klassifikation als Grad IV-Tumore klassifiziert und damit als die diffusen Gliome mit der höchsten Aggressivität und Malignität charakterisiert [41].

Ihre Inzidenz liegt bei etwa 3,2 Neuerkrankungen pro 100.000 Menschen, variiert jedoch weltweit [18, 40, 42]. Damit liegt sie niedriger als bei anderen Krebserkrankungen wie Lungenkarzinom, Prostata-, Mamma- und Kolonkarzinom, GB übertreffen diese allerdings in Bezug auf die durchschnittlich verlorenen Lebensjahre (mit 20,1 Jahren im Vergleich zu 6,1 Jahren beim Prostata- und 11,8 Jahren beim Lungenkarzinom) [43, 44]. GB können in jedem Lebensalter vorkommen, gleichwohl sie im Kindes- und Jugendalter selten auftreten [18]. Sie werden hauptsächlich in höherem Lebensalter diagnostiziert mit einem Durchschnittsalter von 64 bis 65 Jahren [18, 40]. Ihre Inzidenz steigt mit steigendem Lebensalter und erreicht ihren Peak zwischen 75 und 84 Lebensjahren [40]. Daher ist bei steigendem Durchschnittsalter der Bevölkerung in Deutschland durch den demographischen Wandel eine steigende Inzidenz zu erwarten [45].

Ferner zeigen sich Unterschiede in der Häufigkeit von GB ebenso im Hinblick auf andere Faktoren. So unterscheidet sich die Inzidenz im Hinblick auf das Geschlecht, mit einer 1,6-fach höheren Inzidenzrate bei Männern im Vergleich zu Frauen [18]. Ethnisch betrachtet weisen weiße Menschen eine doppelt so hohe Inzidenzrate auf wie schwarze Menschen; Menschen asiatischer Abstammung sind ebenso weniger häufig betroffen als weiße Menschen [18].

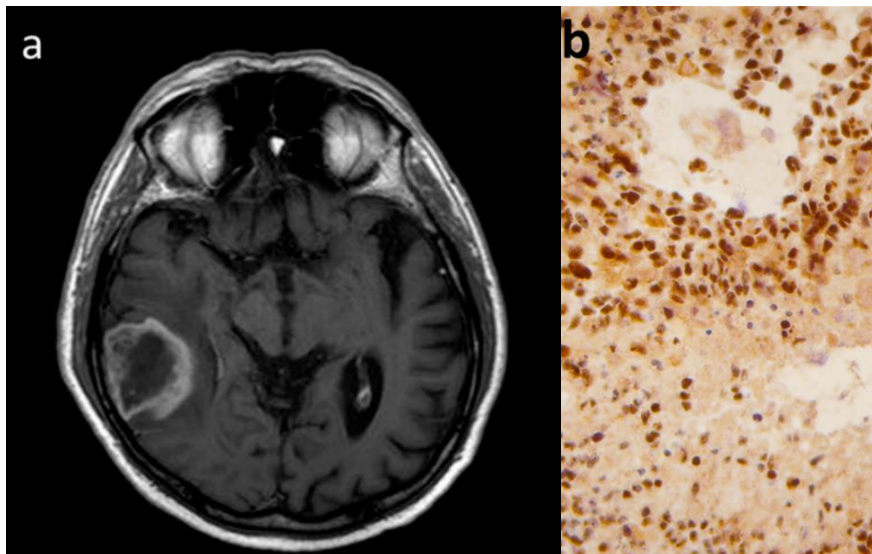
Ätiologisch konnten bisher nur solche Risikofaktoren identifiziert werden, die für einen kleinen Anteil an GB-Patienten zutreffen [46]. Die große Mehrheit an GB dagegen tritt sporadisch auf [47]. Der bekannteste dieser Risikofaktoren ist (vergangene therapeutische) ionisierende Strahlung bekannt, obgleich GB nur eine Minderheit unter mutmaßlich strahleninduzierten Hirntumoren darstellen [47, 48]. Definitive Zusammenhänge zwischen Faktoren, die der Lebensstil bedingt (Zigaretten-, Drogen-, Alkoholkonsum und diätische Besonderheiten) und der Erkrankung an GB konnten bisher nicht evident beschrieben werden [49, 50]. In mehreren Studien wurde ein etwaiger Zusammenhang zwischen nicht-ionisierender Strahlung (durch Mobiltelefone) und dem GB-Erkrankungsrisiko untersucht. Sie lieferten jedoch inkonstante Ergebnisse [46, 51-53]. Auch hier lässt sich daher keine definitive Kausalität beschreiben. Auch der Hypothese, dass EBV-Viren eine Rolle in der Entstehung von GB bzw. Gliomen (engl. gliomagenesis) spielen könnten, liegen uneinheitliche Ergebnisse zugrunde [54]. Unklar bleibt, ob gefundene Assoziationen kausaler Natur oder eine Begleiterscheinung sind [19].

Der hereditäre Aspekt als Risikofaktor betrifft bloß eine Minderheit an Patienten, da die große Mehrheit an Betroffenen eine negative Familienanamnese aufweist. In etwa 5 % der Fälle werden familiäre Häufungen berichtet, sodass zu einem geringen Anteil eine genetische Prädisposition existiert [55]. Zur genetischen Prädisposition zählen einige seltene, genetische Erkrankungen wie Neurofibromatose Typ 1 und 2, tuberöse Sklerose, Li-Fraumeni-Syndrom, Turcot-Syndrom Typ 1 und weitere, die mit einer erhöhten GB-Inzidenz assoziiert sind [46, 56]. Diese genetischen Syndrome steuern allerdings nur einen kleinen Teil zu den GB-Fällen mit familiärer Aggregation bei [57, 58]. Vielmehr wurden bei 13 % eines Patientenkollektivs mit diffusen Gliomen pathogene oder wahrscheinlich pathogene Keimbahnvarianten gefunden. Die Häufigkeit dieser Keimbahnveränderungen geht damit über den Anteil mit familiärer Aggregation hinaus [59]. Durch genomweite Assoziationsstudien konnten 25 Genloci mit Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single nucleotide polymorphism „SNP“) identifiziert werden, die mit erhöhtem Risiko für diffuse Gliome einhergehen und daher als Risiko-Loci

bezeichnet werden [60-65]. Hiervon waren elf spezifisch für GB. Diese bisher bekannten Risiko-Loci können das familiäre Risiko für eine GB-Erkrankung bis zu einem Anteil von 27 % erklären [64]. Dennoch steht die Erforschung der biologischen Bedeutung dieser Loci und ihrer Rolle in der Tumorgenese noch aus [4]. Von der WHO definierte Subklassen von Gliomen (s. 2.1.2) mit molekularen Charakteristika (wie IDH-Mutation und 1p/19q-Kodeletion) sind mit einigen dieser Loci bzw. Keimbahnveränderungen assoziiert [66, 67]. Anhand dessen könnten ausgehend von den Keimbahnveränderungen verschiedene Pfade in der Tumorgenese hypothetisiert werden [67].

### 2.1.2 WHO-Klassifikation – histomorphologische und klinische Kennzeichen

Glioblastome sind eine Tumorentität aus der Kategorie der Gliome, die vermutlich einen glialen Ursprung haben und vom Pathologen Rudolf Virchow im Jahr 1865 erstmals beschrieben wurden [68, 69]. Sie zählen aufgrund ihres diffus infiltrativen Wachstumsverhaltens zu den diffusen Gliomen und ihre Nomenklatur wie Klassifizierung folgen der WHO -Klassifikation von Tumoren des ZNS. In ihr werden diffuse Gliome in die Malignitätsgrade II, III und IV eingeteilt. GB werden histologisch als Grad IV-Tumor klassifiziert und nehmen demnach den höchsten Malignitätsgrad ein. Die klassischen und zugleich pathognomonischen histologischen Kennzeichen von GB beinhalten markante Zell- und Kernpleomorphie und -atypie, eine hohe Mitoserate, Nekrosen mit umgebender pseudopalisadischer Zellausrichtung und mikrovaskuläre Hyperplasie oder Neovaskularisation, und zeigen unter diesen Merkmalen polymorphe Erscheinungsbilder [19, 70, 71]. Sie imponieren als diffus infiltrierender Tumor mit astroglialem Erscheinungsbild (angulierte Kerne und unregelmäßiges Chromatin) [4]. Zur Veranschaulichung dient Abbildung 1.



**Abbildung 1: MRT- und immunhistochemische Darstellung eines GB**

Links (a) ist eine T1-gewichtete axiale MRT-Schädelaufnahme eines GB im rechten dorsalen Temporallappen dargestellt. Unter Gadoliniumgabe ist der zentrale nekrotische Tumorbereich von der Kontrastmittelaufnehmenden Randzone des Tumors abzugrenzen. Rechts (b) ist die immunhistochemische Färbung eines GB abgebildet, in der neben der Zell- und Zellkernpleomorphie das pathognomonische Areal aus Nekrose mit umgebender pseudopalisadischer Zellausrichtung zu erkennen ist. Quelle beider Bilder: [7].

Historisch basierte die Klassifikation von Hirntumoren und GB weitgehendst auf ihrem Phänotyp durch ihr histologisches Erscheinungsbild und entsprechend histologischer Ähnlichkeiten wurden sie kategorisiert [70]. In den vergangenen Jahrzehnten wurden zunehmend molekulare Biomarker identifiziert, die eine wesentliche Rolle in der Tumorgenese und eine signifikante Bedeutung für Prognose und Behandlung darstellen, weshalb sie zunehmend Einzug in die Diagnostik von GB fanden [72]. Die WHO-Klassifikation für ZNS-Tumore aus dem Jahr 2016 integriert daher (als Paradigmenwechsel) den Genotyp zusammen

mit dem Phänotyp in die Klassifikation von diffusen Gliomen allgemein und GB im Speziellen, womit die Objektivität in der Diagnosestellung erhöht und die Untersucherabhängigkeit vermindert wird. [73].

Bemerkenswerterweise korrespondiert die WHO-Klassifikation von 2016 für GB in außerordentlichem Maße mit der konventionellen klinischen Einteilung von GB. Nach Letzterer werden GB ihrer Entstehungsform nach in primäre und sekundäre GB unterschieden, wobei erstere etwa 90 % und letztere etwa 10 % der GB ausmachen [74-76]. Primäre Glioblastome entstehen de novo und treten bei einem Durchschnittsalter von 62 Jahren auf, wohingegen sich sekundäre Glioblastome aus niedergradigen (WHO-Grad II o. III) Astrozytomen durch Tumorprogress entwickeln und in einem früheren Lebensalter mit durchschnittlich 45 Jahren auftreten [77]. Diese klinische Einteilung deckt sich sehr markant mit der GB-Klassifikation der WHO von 2016. Nach ihr werden GB entsprechend ihres Isocitratdehydrogenase (IDH)-Genstatus in drei Kategorien eingeteilt. GB mit IDH-Wildtyp bilden die erste Kategorie und entsprechen den primären GB, die wiederum nur selten IDH1- und IDH2-Mutationen aufweisen [74]. GB mit Mutation im IDH1/2-Gen stellen die zweite Kategorie dar und entsprechen zum Großteil den sekundären GB. Kann der IDH-Status nicht erhoben werden, zählen sie zu dritten Kategorien der nicht näher spezifizierten GB (NOS, engl. „not otherwise specified“) [70].

Obwohl primäre und sekundäre GB histologisch ähnliche Merkmale aufweisen, unterscheiden sie sich resümierend in vielen Charakteristika. Sie entwickeln sich in Patienten unterschiedlicher Altersgruppen, sind in verschiedenen Hirnregionen lokalisiert und besitzen divergente genetische Profile (s. 2.3), mit allen voran unterschiedlichem IDH-Status [78]. Ferner haben sie eine signifikant ungleiche Prognose (s. 2.1.3) und weisen differente Genexpressionsprofile auf. Diese Aspekte sprechen dafür, dass primäre und sekundäre GB unterschiedliche Tumorentitäten sind, die aus unterschiedlichen Ursprungszellen entstehen. [78].

### 2.1.3 Klinischer Verlauf und Prognose

Glioblastome können in unterschiedlichen Hirnregionen lokalisiert sein und unterscheiden sich demnach in ihrem klinischen Bild. Symptomatisch werden sie durch ihr schnelles verdrängendes Wachstum oder infiltrative Zerstörung von eloquenten Hirnbereichen [4]. In Abhängigkeit von ihrer Lage, Größe und dem Vorhandensein eines perifokalen Ödems führen GB zu einer Erhöhung des intrakraniellen Drucks und damit zu assoziierten Symptomen wie Nausea, Emesis, progrediente Kopfschmerzen und Bewusstseinsstörungen (wie Verwirrtheit) [79, 80]. Weitere häufige Symptome sind neu aufgetretene epileptische Anfälle, Wesensveränderungen und kognitive Defizite [81, 82]. Durch Kompression des Hirnparenchyms können fokale-neurologische Defizite auftreten, wobei GB auch die Mittellinie des Hirn überschreiten und kontralateral gelegenes Parenchym infiltrieren oder komprimieren können [20]. Die fokale-neurologische Symptomatik beinhaltet in absteigender Häufigkeit motorische, visuelle und sprachliche Defizite [83].

Der Goldstandard in der GB-Diagnostik ist die zerebrale Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) unter Applikation von Kontrastmittel (Gadolinium). Durch die Permeabilität der unreifen Tumorgefäße akkumuliert das Kontrastmittel im Extravasalraum und imponiert daher als hyperintenses Signal [19]. GB präsentieren sich charakteristisch als vielgestaltige (hyperintense) kontrastmittelanreichende Masse mit nekrotischem Kern und hypointensem, unregelmäßig geformtem Saum aus perifokalem Ödem [4, 19]. Ebenso kann sich ein hämorrhagisch-zystisches Tumorbild zeigen [84]. Wächst das GB über die Mittellinie bzw. den Corpus Callosum hinaus in die kontralaterale Hirnhälfte kann häufig eine sog. Schmetterlingsform betrachtet werden [85]. Lokalisiert ist das GB am häufigsten supratentoriell (in 85 % der Fälle), während es infratentoriell eher selten und spinal in den wenigsten Fällen auftritt [22, 86]. Sowohl unter den Tumoren, die im Frontallappen auftreten als auch unter den Tumoren, die sich auf zwei oder mehr Lappen erstrecken haben GB die höchste Inzidenz, berichteten Chakrabarti et al. (2005) [87]. Die finale Diagnose wird über die histologische Aufbereitung und Untersuchung des Tumorgewebes gestellt, das entweder durch die

operative Tumorresektion oder bei Inoperabilität durch stereotaktische Biopsie gewonnen wird [88, 89].

GB weisen als ZNS-Tumore mit der höchsten Aggressivität und Malignität eine äußerst schlechte Prognose auf. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt durchschnittlich nur bei 5 – 7 % (kann in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter jedoch variieren von 1 – 19 %), typischerweise versterben die Patienten innerhalb von etwa 15 Monaten nach Diagnosestellung [18-20]. Die mittlere Überlebenszeit liegt ohne Behandlung bei etwa 3 - 5 Monaten, bei kombinierter Radiochemotherapie nach maximalreduktiver Operation bei etwa 14,6 Monaten [21, 22].

Prognostisch bedeutsam ist zum einen der IDH-Genstatus. Es ist weithin bekannt und in multiplen klinischen Studien beschrieben, dass (sekundäre) GB mit IDH1/2-Mutationen eine signifikant bessere Prognose hinsichtlich mittlerer Überlebenszeit aufweisen als (primäre) GB mit IDH-Wildtyp [74, 90]. Während Erstere eine durchschnittliche Überlebenszeit von 31 Monaten nach multimodaler Therapie (aus operativer Resektion und postoperativer Radiochemotherapie) aufweisen, besitzen Patienten mit Letzterem etwa 15 Monate Überlebenszeit nach Diagnosestellung [74, 78].

Zum anderen ist der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase(MGMT)-Genstatus ein weiterer wichtiger prognostischer Faktor (s. 2.4.2.3.1). Dabei korreliert ein positiver MGMT-Methylierungsstatus mit signifikant höherer progressionsfreier und Gesamt-Überlebenszeit im Vergleich zu GB mit nichtmethyliertem MGMT-Promotor [91, 92]. Das Ausmaß dieses Überlebensvorteils wird in verschiedenen klinischen Studien unterschiedlich erhoben, variiert zwischen 30 und 80 % längerer durchschnittlicher Überlebenszeit und beträgt im Mittel 50 % [92-95]. In Kontrast hierzu wurde das Gesamtüberleben bei Patienten mit negativem MGMT-Methylierungsstatus durch Behandlung mit TMZ kaum verlängert [92]. Prognostisch ungünstig kann womöglich eine TERT-Promotormutation sein, jedoch ist nicht definitiv geklärt, wie signifikant ihr Einfluss ist [96-98]. Weiterhin ist die Studienlage zur prognostischen Bedeutung von EGFR-Amplifikationen und TP53-Mutationen nicht eindeutig [22].

## 2.2 Aktueller Therapiestandard für Glioblastome

### 2.2.1 Chirurgische Therapie

Die vorrangige Therapie der Wahl sieht eine maximalreduktive (maximal sichere), operative Entfernung von GB vor, sodass makroskopisch kein Tumorgewebe *in situ* bleibt. Hierdurch können die Diagnose gesichert, Symptome durch intrakranielle Hypertension gelindert und der Bedarf an Kortikosteroiden verringert werden [20]. Primär dient sie der Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (progression-free survival; PFS) und der gesamten Überlebenszeit (overall survival; OS). Li et al. (2017) zeigten in ihrer Metaanalyse über klinische Studien mit unterschiedlichen operativen Regimen (aus totaler Resektion, inkompletter Resektion und Biopsie), dass die totale bzw. maximalreduktive Resektion vorteilhaft für das PFS und OS ist [99]. Um die Genauigkeit dieser zu erhöhen und zugleich das eloquente Hirngewebe zu schonen, können Operationstechniken verwendet werden, die dem intraoperativen Monitoring und der intraoperativen Orientierung dienen, wie beispielsweise funktionales Neuromonitoring, intraoperative MRT oder (5-ALA-) fluoreszenzgesteuerte Resektion [100-102]. Einschränkend für die operative Therapie respektive für ihren Vorteil sind ein schlechter Allgemeinzustand der Patienten (Karnofsky-Index kleiner 60), eine kritische Tumorlokalisation und große Tumormasse [103, 104]. Bei Inoperabilität wird eine stereotaktische Biopsieentnahme zur Diagnosesicherung durchgeführt [89]. Limitierend für den langfristigen Erfolg der operativen Therapie bei GB sind ihre Rezidivfähigkeit und -bildung in nahezu allen Fällen, wobei das Rezidiv meist in geringer Entfernung zum Resektionsrand auftritt (aufgrund der prätherapeutischen Infiltration des Nachbargewebes) [105].

Eine adjuvante Therapie schließt sich an, die hauptsächlich aus Strahlentherapie (RT) sowie simultaner und adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid (und Lomustin) besteht. Die

folgende Abbildung bietet eine Übersicht über die adjuvanten Therapiemodalitäten bei unterschiedlichen Ausgangsbedingungen:

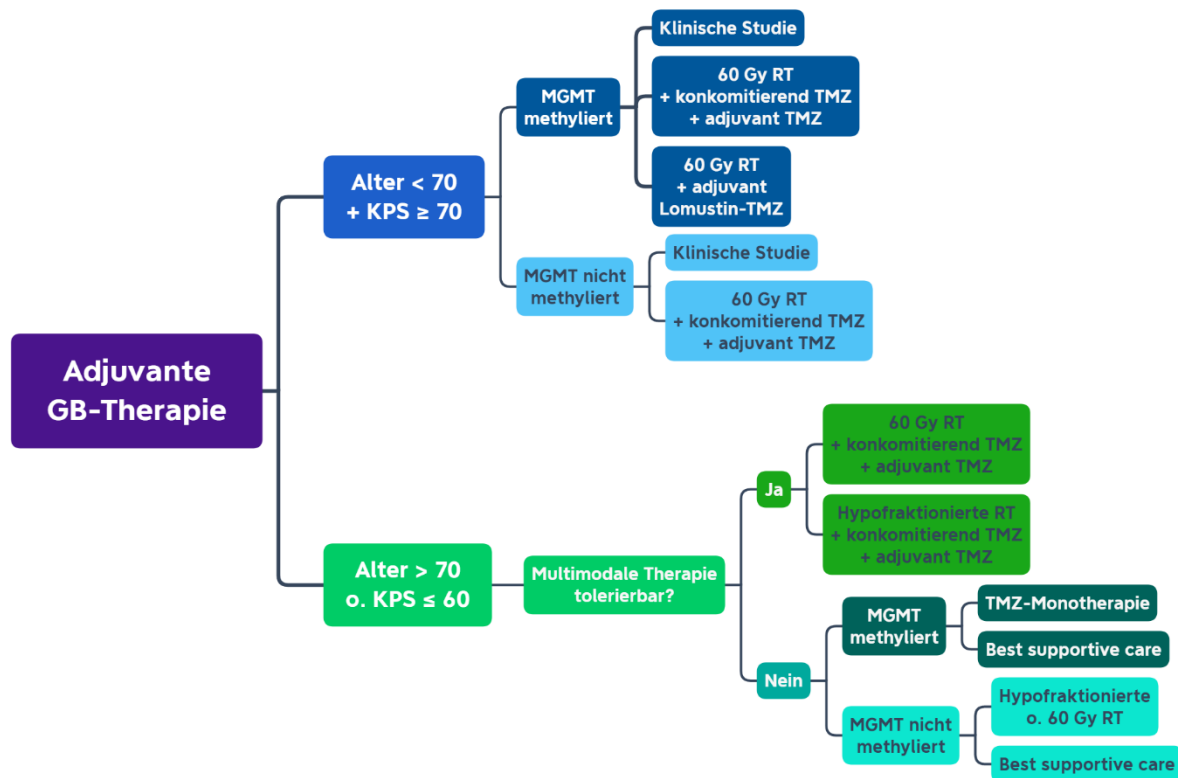


Abbildung 2: Algorithmus der Standardtherapie neu diagnostizierter Glioblastome

Die primäre Therapie bei neu diagnostizierten GB sieht bei Operabilität eine maximal sichere Resektion vor. Daran schließt sich eine adjuvante Radiochemotherapie an, deren Modalität vom Alter und Allgemeinzustand abhängt. Letzter kann durch den Karnofsky-Index (KPS) evaluiert werden, die angegebenen Werte dienen als Orientierung. Während die Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) vom Methylierungsstatus des MGMT-Promotors abhängen kann, kann das Schema der Strahlentherapie (RT) variieren (in die Standard-RT mit 60 Gy als Gesamtdosis und hypofraktionierte Bestrahlungen mit einer geringeren Gesamtdosis). Wenn keine adjuvante Therapie gewünscht oder toleriert wird, wird die „Best supportive care“ angewandt durch Behandlungsmaßnahmen, die Symptome lindern und die Lebensqualität erhöhen. Quelle: Eigene Darstellung, in Anlehnung an [4].

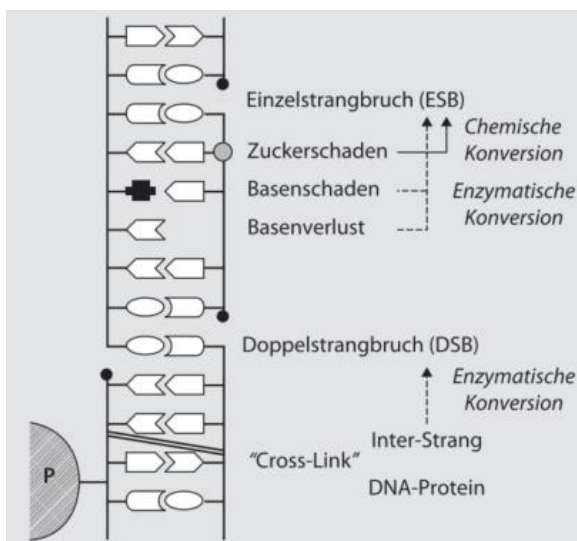
## 2.2.2 Strahlentherapie

### 2.2.2.1 Wirkmechanismus ionisierender Strahlung

Als fest etablierter Bestandteil der Therapie bei GB gilt die Strahlentherapie mittels ionisierender Strahlung. Die hierbei am häufigsten eingesetzte Strahlenart stellt die elektromagnetische Photonenstrahlung (als sog. ultraharte Röntgenstrahlung) dar [106, 107]. Der biologische Effekt und zugleich das Ziel ionisierender Strahlen(-therapie), der am schwerwiegendsten wiegt, ist die Verhinderung von Zellproliferation durch permanente Blockierung ihrer Teilungskapazität und -fähigkeit (als sog. reproduktiver Zelltod) [14]. Darüber hinaus können ionisierende Strahlen den Zelltod durch Apoptose gar direkt induzieren. Diese biologischen Effekte und Endpunkte werden durch die Wechselwirkung der elektromagnetischen Photonenstrahlung mit dem atomaren Bestandteil des absorbierenden Tumorgewebes erreicht [14]. Die Photonen setzen im ersten Schritt aus den Atomen des Gewebes Elektronen frei, die als Sekundärteilchen bezeichnet werden. Diese vollziehen im zweiten Schritt viele Stöße mit ihrer unmittelbaren Nachbarschaft aus Biomolekülen. Während dieser Stöße kommt es zu Energieübertragungsprozessen von den Elektronen auf die Biomoleküle, sodass Letztere angeregt und ionisiert werden [14, 108]. Entscheidend sind Wassermoleküle als Ziel dieser Energieübertragungsprozesse. Sie werden dabei durch sog. Wasserradiolyse angeregt und homolytisch in Wasserstoff- und Hydroxylradikalen gespalten oder ionisiert und heterolytisch in Wasserstoff- und Hydroniumionen gespalten. Diese Zwischenprodukte ergeben durch weitere chemische Reaktionen u.a. radikalische

Sekundärprodukte, zu denen reaktive oxidative Spezies (ROS) (als Verursacher oxidativen Stresses) wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das erwähnte Hydroxylradikal ( $HO\cdot$ ) gehören [14].

Diese reaktiven, radikalischen Produkte bilden den essentiellen Bestandteil der Strahlenwirkung. Sie wechselwirken mit unmittelbar benachbarten biologischen Makromolekülen und verändern und schädigen diese. Zu ihnen gehört neben Proteinen und Membranlipiden die DNA als biologisch relevanteste Zielstruktur, über deren Schädigung ionisierende Strahlung ihr zytotoxisches Potenzial entfaltet [14]. Diese Art der sog. radiolytischen Veränderung zellulärer integraler Strukturen wird als indirekte Strahlenwirkung bezeichnet und macht 30 bis 40 % aller Läsionen aus [109]. Erfolgt sie durch sofortige Wechselwirkung der Photonenstrahlung mit diesen Makromolekülen wird sie direkte Strahlenwirkung genannt, die den Großteil der verursachten DNA-Schäden ausmacht [14, 109]. Die radiolytischen Veränderungen an der DNA sind vielfältig und umfassen Basenschäden, Strangbrüche und -vernetzungen [14], wie in Abbildung 3 dargestellt ist. Die häufigsten Basenschäden bilden 8-Oxoguanin, Thyminglycol und Formamidopyrimidin [110]. Die Strangbrüche bestehen aus Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Während Erstere eine einzigartige Signatur an den Strangenden aufweisen, resultieren Letztere aus multiplen Läsionen beider DNA-Stränge in unmittelbarer Nähe [109]. Sie stellen eine besonders wichtige DNA-Läsion im Rahmen der Strahlentherapie dar, da sie im Vergleich zu Einzelstrangbrüchen schwieriger von der (Tumor-)Zelle zu reparieren sind und häufiger zum Zelltod führen [109, 111]. Weiterhin können Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung beobachtet werden, die zwischen Chromosomen oder innerhalb eines Chromosoms auftreten können und Folge von nicht oder falsch reparierten Doppelstrangbrüchen (DSB) sind. Manche von ihnen (sog. asymmetrische Chromosomenveränderungen) verhindern die Weitergabe des kompletten Chromosomensatzes an Tochterzellen und repräsentieren damit eine Teilungsunfähigkeit und einen mitotischen Stillstand dieser Zellen (sog. mitotische Katastrophe) [14].



**Abbildung 3: Einteilung strahleninduzierter DNA-Schäden**

Durch direkte oder indirekte Strahlenwirkung können ionisierende Strahlen multiple DNA-Schäden bewirken. Zu ihnen gehörten Basenschäden und -verlust, Einzelstrang- sowie Doppelstrangbrüche, die besonders zytotoxisch sind. Vernetzungen können intern zwischen DNA-Strängen („DNA-DNA-Crosslinks“) oder extern mit DNA-Proteinen („DNA-Protein-Crosslinks“) induziert werden. Einige dieser Veränderungen können enzymatisch in andere Schäden konvertiert werden. Quelle: [14]

Hervorzuheben ist der gewichtige Einfluss von Sauerstoff auf die Effektivität der ionisierenden Strahlung und die Radiosensibilität des Tumorgewebes. Beim Vorhandensein von Sauerstoff (Normoxie) wird die Ausbeute an reaktiven oxidativen Spezies durch die Wasserradiolyse stark erhöht, sodass der resultierende oxidative Stress mitsamt induzierter Zell- bzw. DNA-Schäden verstärkt wird [14]. Im Gegenzug zeigt die Bestrahlung bei Sauerstoffmangel

(Hypoxie) drastisch erniedrigte Effekte beim Eliminieren der Zellen sowie strahleninduzierten Zellschäden, sodass die Sauerstoffversorgung eines Tumorgewebes ein wichtiger Indikator für die Radiosensitivität bzw. -resistenz ist. [14]. Weiterhin ist die Radiosensitivität von der Verteilung des Zellzyklus im Tumorgewebe zum Zeitpunkt der Bestrahlung abhängig [14]. So sind Zellen kurz vor und während der Mitose(M)-Phase besonders anfällig für strahleninduzierte Schäden, während die späte Synthese(S)-Phase von Radioresistenz gekennzeichnet ist [14].

Zu den Abwehrmechanismen der Zellen gehört die Aktivierung von DNA-Reparaturprozessen, die die DNA-Reparatur im engeren Sinne von Einzelstrangschäden beinhalten und die Reparatur von Doppelstrangbrüchen über weitere enzymatische Systeme (sog. nicht-homologes End-joining und homologe Rekombination) [14]. Darüber hinaus können radikalische (oxidative) Produkte und ihre Wirkung nichtenzymatisch über Antioxidantien (wie Glutathion) oder enzymatisch (wie die Superoxiddismutase) detoxifiziert werden [14]. Durch spezifische Sensoren wird der strahleninduzierte DNA-Schaden von den Tumorzellen registriert. Über verschiedene Signaltransduktoren wird ein Zellzyklusarrest ausgelöst über Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints und zugleich obige DNA-Reparaturmechanismen aktiviert. Der Arrest des Zellzyklus bedingt eine erniedrigte Proliferationsrate der Tumorzellen [14]. Bei Erschöpfung der Reparaturkapazität der Zellen oder nicht reparierbaren (DNA-)Schäden verliert die Tumorzelle entweder ihre mitotische Teilungsfähigkeit oder es wird alternativ der apoptotische programmierte Zelltod eingeleitet [14]. Dieser wird durch dieselben (und weitere) Signalwege ausgelöst, die für den Zellzyklus-Arrest ursächlich sind.

### 2.2.2.2 Bestrahlungsregime

GB sind (initial) strahlensensitive Tumore, sodass in der Regel immer eine Tumorbestrahlung erfolgt. Allerdings ist trotz des Ansprechens auf die Strahlentherapie signifikanter Überlebenszeitverlängerung bisher keine langfristige Tumorkontrolle möglich und eine mittelfristige Rezidivbildung ist vorauszusehen [14]. Die Strahlentherapie erfolgt entweder adjuvant oder primär bei Inoperabilität des Tumors. Sie wird bildgebungsgestützt durchgeführt, um gesundes Hirngewebe möglichst zu schonen (sog. konformale Strahlentherapie) [112]. Für die Bestimmung des Bestrahlungsschemas (und das der Chemotherapie) sind das Alter des Patienten und sein Allgemeinzustand (sog. Performance-Status) entscheidend, wobei Letzteres hauptsächlich durch den Karnofsky-Index (KPS) evaluiert wird [113, 114]. Die RT hat sich als fester Therapiebestandteil etabliert, nachdem in mehreren randomisierten kontrollierten Studien ein signifikanter Vorteil im OS gegenüber der ausschließlich symptomatischen Behandlung festgestellt wurde (von 8,4 – 10,8 Monate OS mit RT vs. 5 – 5,5 Monate OS ohne RT); eine Metaanalyse bezifferte das relative Risiko für die 1-Jahres-Mortalität für Patienten mit RT gegenüber welchen ohne RT mit 0,81 (mit einem Konfidenzintervall von 0,74 – 0,88) [115-118].

Für Patienten im guten Allgemeinzustand (KPS > 70) und im Lebensalter unter 70 Jahren sieht die Erstlinientherapie eine adjuvante RT über sechs Wochen mit einer Gesamtdosis von 60 Gy vor, wobei die Einzeldosis in 2,0 Gy oder 1,8 Gy fraktioniert wird [115]. Eine weitere RT über diese Gesamtdosis hinaus ergab keinen zusätzlichen Vorteil, jedoch steigen unerwünschte Nebenwirkungen mit der Höhe der Gesamtdosis an [115]. Für Patienten über 70 Jahre und KPS über 70 kann (bei Patientenwunsch) selbiges RT-Schema angewandt werden oder eine hypofraktionierte RT mit einer Gesamtdosis von 40 Gy (über drei Wochen) erfolgen [113, 119, 120]. Beträgt der KPS weniger als 60 Punkte und ist damit der Allgemeinzustand des Patienten als ungünstig zu bewerten, muss individuell eine Therapiemodalität entschieden werden; eine obig erwähnte hypofraktionierte RT kann erfolgen [121, 122].

## 2.2.3 Chemotherapie

### 2.2.3.1 Wirkmechanismus von Temozolomid

Temozolomid (TMZ) ist ein alkylierendes Zytostatikum aus der Gruppe der Imidazo-Tetrazin-Derivate [123]. Es ist der Freiname für die chemische Verbindung 3-Methyl-4-oxoimidazo[5,1-

d][1,2,3,5]tetrazin-8-carboxamid (nach IUPAC) mit der Molekülformel C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, die eine geringe Molekularmasse (mit 194 Da) aufweist [124]. TMZ ist aufgrund seiner Lipophilie in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke in ausreichend hoher Konzentration zu überwinden, um bei Hirntumoren therapeutisch aktiv zu sein [125]. Das säurestabile Alkylans wird oral aufgenommen, hiernach adäquat aufgenommen und fungiert als Prodrug [126]. Es ist in saurem pH-Milieu stabil, in basischem Milieu (wie im Blutplasma) wird es spontan umgewandelt und damit in sein reaktives Metabolit überführt, wie in Abbildung 4 dargestellt. TMZ wird spontan (d.h. nichtenzymatisch) hydrolytisch zu MTIC (5-(3-N-methyltriazen-1-yl)-imidazol-4-carboxamid) gespalten. MTIC zerfällt wiederum in das inaktive AIC (5-Aminoimidazole-4-carboxamid) und das alkylierende Methanediazonium, das DNA-Basen methylieren kann [124, 127]. Da Hirntumorgewebe stärker basisch sind als gesundes Hirngewebe, wird diese Aktivierung dort begünstigt und verstärkt [5]. Die TMZ-Konzentration erreicht im hirnumgebenden Liquor cerebrospinalis etwa 30 – 40 % seiner Plasmakonzentration [128].

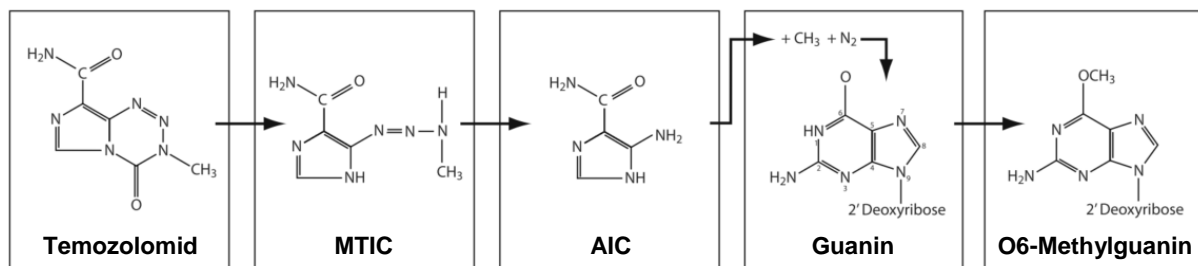


Abbildung 4: Chemische Umwandlung und Reaktion von TMZ bei physiologischem pH

Die chemische Umwandlung der Prodrug Temozolomid (TMZ) erfolgt pH-abhängig. Im sauren pH-Milieu ist sie stabil, im basischen (physiologischen) pH-Milieu wird es spontan zu MTIC (5-(3-N-methyltriazen-1-yl)-imidazol-4-carboxamid) hydrolysiert. Dieses zerfällt spontan in AIC (5-Aminoimidazole-4-carboxamid) und das alkylierende, reaktive Methanediazonium. Letzteres greift u.a. die DNA-Base Guanin am Sauerstoffatom in Position 6 an und überträgt eine Methylgruppe. Das entstehende DNA-Addukt ist demnach O6-Methylguanin. Quelle: Modifiziert nach [8]

Der exakte Wirkmechanismus von TMZ ist bisher nicht abschließend erforscht. Entscheidend für seine Zytotoxizität ist jedoch die Methylierung der DNA. Sein aktives Metabolit Methanediazonium reagiert mit den DNA-Purinbasen Adenin und Guanin unter Addierung von kovalent gebundenen Methylgruppen an Stickstoff- (z.B. N7) und/oder Sauerstoffatomen (z.B. O6). Die dabei gebildeten DNA-Addukte umfassen in absteigender Häufigkeit N7-Methylguanin (65 - 80 %), N3-Methyladenin (9 %) und O6-Methylguanin (O6-meG) (5 - 8 %) [127, 129-131]. Obwohl O6-meG nur einen kleinen Anteil an den TMZ-induzierten DNA-Methyladdukten darstellt, ist die Läsion hauptursächlich für die toxische und mutagene Wirkung von TMZ [131, 132]. Der Grund liegt einerseits darin, dass N7-Methylguanin- und N3-Methyladeninläsionen, die zytotoxisches Potenzial besitzen, gewöhnlich durch die Basen-Exzisionsreparatur (BER) erkannt und beseitigt werden; diese BER ist in GB meist intakt und funktionsfähig [133, 134].

Andererseits bewirkt O6-meG aufgrund veränderter Wasserstoffbrückenbindungen eine Fehlpaarung mit der DNA-Base Thymin (O6-meG:T) anstelle von Cytosin (O6me-G:C) bei der ersten Zellteilung. Durch Weitergabe dieser Fehlpaarung (in Form von Thymin) wird bei der zweiten DNA-Replikation bzw. Zellteilung in einer der Tochterzellen die Paarung der DNA-Base Adenin mit jenem Thymin bewirkt und damit (mutagen) eine Punktmutation von Thymin-Adenin anstelle von Guanin-Cytosin erzeugt [135]. Die zytotoxische Wirkung entfaltet sich, wenn DNA-Reparatursysteme, konkret die DNA-Mismatch-Repair (MMR), die DNA-Läsion und -Fehlpaarung in O6-meG:C und O6-meG:T erkennen. Die MMR dient dem Erkennen und Reparieren von fehlgepaarten DNA-Basenpaaren, die v.a. während der DNA-Replikation entstanden sind und während dieser nicht erkannt wurden [136]. Wenn die MMR-Proteinkomplexe die TMZ-induzierten DNA-Läsionen O6-meG:C und O6-meG:T registrieren, dann können sie ausschließlich am neu synthetisierten Tochterstrang andocken und wirken (da sie als Replikationskontrolle für den neu gebildeten Tochterstrang fungieren). Sie

katalysieren daher die Exzision der Cytosin- bzw. Thymin-Base aus dem Tochterstrang und die Insertion derselben Basen gegenüber O6-meG des Mutterstrangs. Die Läsion wird damit jedoch nicht behoben, sodass wiederholt derselbe vergebliche Reparaturprozess stattfindet, während O6-meG als ursächliche DNA-Läsion persistiert [137].

Die Folge dieser wiederholten und ineffizienten Reparaturversuche ist die Entstehung von Lücken im neu gebildeten Tochterstrang, die die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen bewirken [135, 137-139]. Es werden Signalkaskaden aktiviert, die einen Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase auslösen, der vom Zelltod über Apoptose oder Autophagie gefolgt wird [139-141]. Resümierend sind intakte MMR-Mechanismen notwendig, damit die zytotoxische Wirkung von TMZ entfaltet wird.

Daneben hat TMZ über sein aktives Metabolit Methanediazonium das Potenzial, andere Makromoleküle wie mitochondriale DNA, RNA und zelluläre Proteine zu methylieren [142-144]. Die Methylierung solcher Moleküle ist gewöhnlich wichtiger Bestandteil ihrer Regulation und ihrer Konformationsänderung in vielen zellulären Prozessen. Ihre TMZ-induzierte Methylierung ist bisher jedoch nicht ausreichend erforscht und die Implikationen dieser Alkylierung verbleiben bis dato unklar [144].

### 2.2.3.2 Schema der Chemotherapie

Die Evidenz zur Etablierung von Temozolomid als systemische Therapie von Glioblastomen durch Stupp et al. (2005) stellte einen Durchbruch in der GB-Therapie dar, insbesondere da bis zum heutigen Stand keine andere, medikamentöse Therapie den Nutzen von TMZ übersteigt [21]. TMZ ist ein alkylierendes Zytostatikum, das die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und der systemischen Therapie von diffusen Gliomen dient [125]. Es entfaltet seine zytotoxische Wirkung durch die Methylierung von DNA-Guaninbasen, wodurch mutagene und toxische DNA-Schäden entstehen, die zum apoptotischen oder autophagischen (Tumor-)Zelltod führen [131].

In ihrer großen randomisierten EORTC-NCIC-Studie lieferten Stupp et al. die Evidenz zur signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit durch die Kombinationstherapie aus RT und TMZ (mit 14,6 Monate) im Vergleich zur RT-Therapie allein (mit 12,1 Monate) [21, 114]. Die prognostische Verbesserung gegenüber alleiniger RT-Therapie beinhaltete ebenso die PFS (6,9 Monate vs. 5 Monate), die 2-Jahres-Überlebensrate (26,5 % vs. 10,4 %) und die 5-Jahres-Überlebensrate (10 % vs. 2 %) [21, 114]. Die hiermit etablierte Erstlinientherapie sieht für Patienten unter 70 Jahren in gutem Allgemeinzustand eine zur RT konkomitierende TMZ-Gabe vor. Ihr folgt einen Monat nach der RT eine adjuvante (alleinige) TMZ-Gabe. Die konkomitierende TMZ-Dosis beträgt 75 mg/m<sup>2</sup> und erfolgt täglich. Die adjuvante TMZ-Gabe besitzt eine Dosis von jeweils 150-200 mg/m<sup>2</sup> pro Tag und umfasst sechs Zyklen, in denen jeweils in einem Monat die TMZ-Gabe an 5 aufeinanderfolgenden Tagen erfolgt (sog. Stupp-Protokoll) [21, 114]. Gilbert et al. (2013) (und andere) konnten in einer Phase-III-Studie keinen signifikanten Vorteil einer intensivierten TMZ-Behandlung (über sechs Zyklen hinaus) auf das Gesamtüberleben nachweisen [95]. Trotz der prädiktiven Funktion des MGMT-Status für das Therapieansprechen mit TMZ (s. 2.1.3) wird die Chemotherapie bei obiger Patientengruppe ungeachtet des MGMT-Status durchgeführt (aus bisherigem Mangel an Alternativen) [20].

Bei Patienten über 70 Jahren ist die Kombination von konkomitierender und adjuvanter TMZ-Therapie zum jeweiligen Bestrahlungsschema aus Standard-RT oder hypofraktionierter RT anzustreben, wenn dies der Allgemeinzustand des Patienten zulässt [20, 145]. Hier kann in Abhängigkeit vom MGMT-Status alternativ verfahren werden, wenn eine kombinierte Radiochemotherapie kontraindiziert ist. Bei methyliertem MGMT-Promotorstatus kann abweichend die alleinige Chemotherapie mit TMZ durchgeführt werden, bei unmethyliertem MGMT-Promotorstatus kann eine Standard- oder hypofraktionierte RT erfolgen [146-148].

Als ergänzende Chemotherapie kann bei methyliertem MGMT-Promotorstatus die Gabe von Lomustin dienen, einem weiteren alkylierenden Zytostatikum. Durch die Kombination von Lomustin mit der Standard-Radiochemotherapie mit TMZ zeigten Herrlinger et al. (2019) einen signifikanten Unterschied in der medianen Gesamtüberlebenszeit der Patienten auf, mit 48,1

Monaten gegenüber 31,4 Monaten bei Patienten ohne Lomustin-Zugabe. Zu beachten ist die kleine Größe des Patientenkollektivs dieser Studie [149].

## 2.3 Molekulare Kennzeichen von Glioblastoma

### 2.3.1 Genetische Aberrationen

Die frühere Bezeichnung „Glioblastoma multiforme (GBM)“ als Terminus für GB deutete auf die Variabilität von GB hinsichtlich Pathologie und klinischem Verlauf, inklusive der Unterschiede im Therapieansprechen und der Lebenserwartung. Der Zusatz „multiforme“ wird in der WHO-Klassifikation von 2016 nicht mehr verwendet [70]. Berücksichtigt werden damit die Erkenntnisse aus voranschreitender Erforschung der molekularen Grundlagen von GB. Mit ihnen wächst die Erkenntnis, dass der Begriff GBM eine sehr heterogene Gruppe an unterschiedlichen Tumorentitäten umfasst, die sich aufgrund von molekularen Charakteristika in Ätiologie und Tumorigenese und damit Therapieansprechen und -resistenz unterscheiden [150]. Diesem Wissenszuwachs wird gewiss in der nächsten WHO-Klassifikation Rechnung getragen, durch die größere Integration und Definition von diffusen Gliomen und GB auf Grundlage von molekularen Kriterien [151].

Indes ist die (in unterschiedlichem Maße) ausgeprägte Heterogenität von GB untereinander (intertumoral) wie auch eines individuellen GB (intratumoral) zu beachten. Diese Heterogenität erstreckt sich auf histologische wie genetische und epigenetische Merkmale, sodass innerhalb eines GB unterschiedliche Subpopulationen bestehen können [152-154].

GB werden in zwei übergeordnete Kategorien eingeteilt: GB mit IDH1/2-Mutationen und GB mit IDH-Wildtyp (s. 2.1.2). Diese entsprechen und korrespondieren mit der klinischen Einteilung in primäre und sekundäre Glioblastome, da 85 % der sekundären GB eine solche Mutation aufweisen, während sie in primären GB selten ist (5 %) [74, 155]. Sie können auf molekularer Ebene durch charakteristische genetische Aberrationen, Mutationen und epigenetische Besonderheiten unterschieden werden.

Die IDH-Mutation betrifft in 90 % der Fälle das IDH1-Gen, dessen Enzym zytoplasmatisch ist und liegt hier typischerweise als Punktmutation im Codon 132 vor [74, 156]. Seltener ist das IDH2-Gen betroffen, dessen Enzym in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist [157]. Die IDH-Enzyme katalysieren im Citrat-Zyklus die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat und sind damit wichtiger Teil der Zellmechanismen gegen oxidativen Stress [158]. IDH-Mutationen stellen ein frühes Ereignis in der Gliomagenese dar. Ihr Beitrag in der Gliomagenese und Tumorprogression zum sekundären GB ist bisher nur in Teilen verstanden [156]. Jedoch führen sie als Gain-of-function-Mutationen zur vermehrten Bildung von 2-Hydroxylglutarat [159, 160]. Hohe Konzentrationen von 2-Hydroxyglutarat liegen demnach vor, und sind vermutlich ursächlich für die auffällige DNA-Hypermethylierung vieler Genloci dieser Zellen [161-163]. Ferner bewirkt 2-Hydroxylglutarat eine veränderte Hypoxiesensorik und eine veränderte Basalmembranstabilität in diesen Zellen [164, 165].

Die übergeordneten Kategorien von GB aus IDH-Wildtyp und IDH1/2-Mutationen sind divergierend mit jeweils einer Gruppe an genetischen Aberrationen aus Gen-Amplifikationen, Mutationen und chromosomalen Veränderungen assoziiert, die als charakteristische Merkmale dienen. Primäre GB mit IDH-Wildtyp sind charakterisiert durch Mutationen im TERT(Telomerase reverse Transkriptase)-Promotor, PTEN(Phosphatase and Tensin homolog)-Genmutation (oder -deletion), Deletion des p16-(CDK-Inhibitor 2A) Gens, Gewinn an Chromosom 7, Verlust des Chromosoms 10 sowie hochgradige Genamplifikation vom EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)-Gen [77, 166-168].

Im Kontrast dazu zeigen GB mit IDH1/2-Mutationen eine Antikorrelation zum Auftreten von EGFR-Genamplifikationen und PTEN-Genmutationen [74]. Stattdessen sind sie mit TP53- und ATRX (Alpha-Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked)-Mutationen assoziiert und zeigen häufig in ihrem DNA-Methylierungsmuster einen CpG-Insel-Methylator-Phänotyp

(CIMP) [94, 163, 169-171]. Partieller Verlust von Chromosom 10q tritt auf, ohne Verlust von 10p, im Gegensatz zu GB mit IDH-Wildtyp [172].

Diese molekularen Aberrationen sind an drei großen Prozessen der Tumorbilogie beteiligt. Sie ermöglichen replikative Immortalität, kontinuierliches Zellwachstum und die Umgehung zellulärer Seneszenz [4]. Im Folgenden werden sie eingehend beschrieben, Abbildung 5 dient als Übersicht.

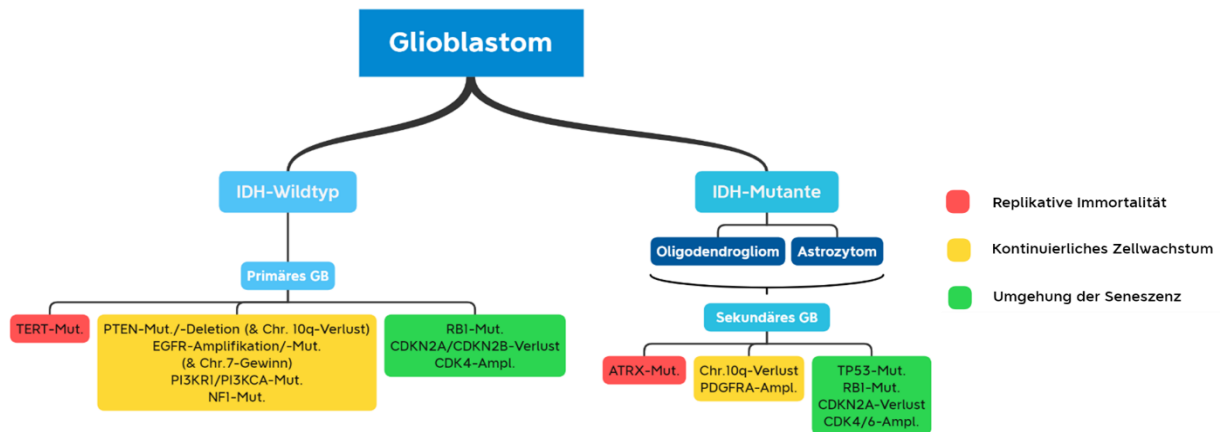


Abbildung 5: Glioblastom-Klassifikation

Die Einteilung von Glioblastomen (GB) erfolgt anhand ihres IDH-Status, wodurch der klinischen Einteilung in primäre und sekundäre GB entsprochen wird, wobei sich Letztere aus niedergradigen Gliomen entwickeln. Sie weisen charakteristische genetische Alterationen auf, die verschiedenen pathophysiologischen Prozessen der Tumorbilogie dienen. Darstellung: Eigene Darstellung, in Anlehnung an [2-4].

Der replikativen Immortalität dienen Mutationen im TERT-Promotor, die in 58 - 95 % der GB mit IDH-Wildtyp vorkommen [70, 97, 168]. Sie erzeugen eine neue Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren und daher eine starke Erhöhung der TERT-Transkriptionsrate [173, 174]. Da das TERT-Gen für die katalytische Untereinheit der Telomerase codiert, steigt damit die Telomerase-Aktivität [175]. Sie bewirkt die ständige Verlängerung der Telomeren der Tumorzell-DNA nach Zellteilung und wirkt damit ihrer Verkürzung und der Einleitung von Apoptose und Zelltod entgegen [176]. Jener unbegrenzten Zellteilungsfähigkeit dienen in GB mit IDH1/2-Mutationen ATRX-Genmutationen. Sie kommen in 57 bis 71 % dieser GB vor [70, 78, 170]. Die Konsequenz dieser trunkierenden Mutationen ist die mangelnde Funktionsfähigkeit des ATRX-Proteins [150]. Dieses ist physiologisch an der Chromatin-Remodellierung im Telomer-Bereich beteiligt [177]. Sein Ausfall ermöglicht „alternative lengthening of telomeres (ALT)“, ein Prozess, der mit homologer Rekombination assoziiert ist und eine Aufrechterhaltung der Telomerlängen (und damit die Vermeidung von Zelltod) ermöglicht [178].

In der Tumorbilogie spielt kontinuierliches und dereguliertes Zellwachstum eine wesentliche Rolle. Dies wird in vielen Tumorentitäten durch die Aktivierung von Onkogenen und Inhibierung von Tumorsuppressorgenen erreicht. Das molekulare Pendant bilden in GB u. a. Mutationen in PTEN-, NF1(Neurofibromin 1)-, PDGFRA (Platelet derived growth factor alpha)- und Abnormalitäten den EGFR-Gens. Das EGFR-Gen stellt als Rezeptor-Tyrosinkinase-codierendes Gen ein potenzielles Onkogen vieler Tumore dar. Seine genetischen Abnormalitäten beinhalten in GB zum einen die Amplifikation des EGFR-Gens (auf Chromosom 7), die in etwa 40 bis 63 % der GB mit IDH-Wildtyp vorhanden ist, und damit die übermäßige EGFR-Expression [94, 179-182]. Zum anderen weisen 50 - 70 % dieser GB (mit EGFR-Amplifikation) eine Mutation im EGFR-Gen vor, wobei EGFRvIII hier die häufigste Mutation bildet [182-184]. Konsequenz dieser Mutationen ist ein konstitutiv aktives EGFR-Gen mit dauerhafter Expression. Die resultierenden hohen EGFR-Konzentrationen tragen zum Tumorwachstum bei, und führen (im Falle der EGFRvIII-Mutation) zu einer dauerhaften Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege aus PI3K-AKT-mTOR und RAS-Raf-MAPK, die

die Zellproliferation und das Tumorwachstum verstärken und den apoptotischen Zelltod verhindern [185-188].

Dieselben Signalwege aktivieren weitere Abnormalitäten in den beteiligten Proteinstrukturen. Mutationen in den PI3K-Gendomänen sowie Amplifikation des PDGFRA-Gens wirken aktivierend auf den PI3K-AKT-mTOR- respektive Ras-Raf-MAPK-Signalweg, während Mutationen im PTEN-Gen PTEN als Tumorsuppressor inaktivieren und damit die Inhibierung des PI3K-AKT-mTOR-Wegs unterbinden [2, 189, 190]. In primären GB kommen Mutationen in den PI3K-Gendomänen (der katalytischen oder regulatorischen Subeinheit) zu etwa 15 %, PDGFRA-Genamplifikationen (auf Chromosom 4) zu 4,5 % und PTEN-Genmutationen zu 32 % vor [72, 94, 156, 191, 192]. Eine ähnliche Konsequenz (für den PI3K-AKT-mTOR-Weg) wie die inhibierende PTEN-Mutation hat ein chromosomaler Verlust vom Chromosom 10q zur Folge, auf dem das PTEN-Gen lokalisiert ist. Dieser 10q-Verlust kommt in etwa 60 – 70 % in GB mit IDH-Wildtyp als auch IDH1/2-Mutationen vor [76, 77]. Eine weitere inhibierende Mutation stellen Mutationen im NF1-Gen dar. Da NF1 als Antagonist zu Ras fungiert, bewirken inhibierende Mutationen oder Gendeletionen eine fehlende Hemmung des Ras-Signalweges und damit verstärkte Zellproliferation und -wachstum [193]. Solche inaktivierenden NF1-Genaberrationen erscheinen in 15 – 18 % der primären GB [156, 191].

Der Umgehung der zellulären Seneszenz und Apoptose dienen in GB verschiedene molekulare Veränderungen. In ihrem Zentrum stehen die Signalwege des TP53- und Rb(Retinoblastom)-Proteins (pRB). Das pRB dient physiologisch als Tumorsuppressor, indem es bei genotoxischen Stress bzw. DNA-Schäden den Übergang des Zellzyklus von der G1- zur S-Phase und die DNA-Transkription unterbindet, und letztendlich auch apoptotischen Zelltod einleiten kann [194, 195]. Zur Umgehung dessen ist der pRB-Signalweg in bis zu 78 % aller GB durch unterschiedliche Abnormalitäten unterbrochen [191]. In bis zu 10 % der GB liegen (inaktivierende) Mutationen im RB1-Gen vor [94]. Vor allem in primären GB (bis zu 45 %) liegt ein homozygoter Verlust der CDKN2A/CDKN2B(Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A/2B)-Genregionen vor, die für pRB- und TP53-aktivierende Proteine codieren [74, 196-199]. Weiterhin kommt in etwa 15 % aller GB eine Amplifikation der CDK4/6(Cyclin Dependent Kinase 4/6)-Gene vor (auf den Chromosomen 12 und 7), die pRB inhibieren [94, 200, 201]. Resümierend werden damit die Expression und Aktivität des pRB und damit seine Funktion als Tumorsuppressor unterbunden. Selbiges gilt für den TP53-Signalweg. Als wichtigster Tumorsuppressor dient TP53 bei beschädigter DNA dem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase sowie der Einleitung von DNA-Reparaturmechanismen sowie bei Fehlschlagen dieser der Einleitung des apoptotischen Zelltodes [202]. Durch den obig genannten Verlust der CDKN2A/CDKN2B-Genregionen bleibt die Aktivierung und Stabilisierung von TP53 durch ihre Genprodukte aus. Mutationen im TP53-Gen sind charakteristisch für sekundäre GB mit IDH1/2-Mutationen, da sie bei etwa 81 % dieser GB vorkommen, wohingegen nur etwa 20 % der primären GB mit IDH-Wildtyp solche Mutationen aufweisen [74].

### 2.3.2 Epigenetische Merkmale

Epigenetische Mechanismen nehmen physiologisch eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von Zellen durch Regulierung der Gentranskription und Remodellierung der DNA-Struktur ein. Sie umfassen u. a. Mechanismen der DNA-Methylierung, Histonmodifikation, Chromatin-Remodellierung und Interaktion mit nichtcodierender RNA [10]. In GB sind diese Kontrollmechanismen dereguliert und offenbaren Abnormalitäten, und dienen auf diese Weise der malignen Zelltransformation in GB. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die epigenetischen Alterationen in Glioblastomen wie Glioblastom-Stammzellen zusammen im Kapitel 2.5.6 erörtert.

### 2.3.3 Bedeutende molekulare Subtypen in GB

Parallel zur klinischen und WHO-Einteilung werden GB auch anhand ihres Genexpressionsprofils kategorisiert. Basierend auf den Untersuchungen durch das TCGA (The Cancer Genome Atlas), in welchen wesentliche Aberrationen im Genom und Expressionsmuster von GB aufgezeigt wurden, konnten anhand von mRNA-

Expressionsprofilen verschiedene Muster der Genexpression entdeckt werden [203]. Hierauf beruhend teilten Phillips et al. (2006) GB in die drei Kategorien proneural, mesenchymal und proliferativ ein [204].

Der proneurale Subtyp erhielt seine Bezeichnung aufgrund der Expression von Genen, die Marker von sich entwickelnden Neuronen sind, wie z. B. OLIG2, DCX und DLL3 [204]. Dabei wies er durch die Assoziation mit IDH1-, TP53-Mutationen und PDGFRA-Abnormalitäten die Charakteristika von sekundären GB auf [72, 204]. Die signifikant bessere Prognose bedingt der proneurale Subtyp daher wahrscheinlich aufgrund der Tatsache, dass die meisten sekundären GB proneural sind [2, 72].

Der mesenchymale Subtyp wies durch die Expression von Markern für glatte Muskel- und Endothelzellen (z.B. PECAM1) eine Ähnlichkeit mit Geweben mesenchymalen Ursprungs auf, ebenso wie die Expression von Angiogenese-Markern wie VEGF [204]. Er wies eine schlechtere Prognose auf, die vermutlich durch verbessertes Überleben der GB-Zellen durch Neovaskularisierung bedingt ist [204]. Veranschaulicht wird dies durch die histologische Klassifizierung aller mesenchymalen GB als WHO-Grad IV, während der proneurale Subtyp auch WHO Grad III-Tumore umfasst. Interessanterweise konnten diese beiden signifikant unterschieden Tumortypen nicht durch histologische Untersuchungen unterschieden werden, was die Bedeutsamkeit der molekularen Klassifizierung verdeutlicht [204]. Weiterhin wies der mesenchymale Subtyp auf genetischer Ebene einen Gewinn an Chromosom 7, einen Verlust an Chromosom 10 und am PTEN-Gen sowie eine Amplifikation des EGFR-Gens auf, welche allesamt Charakteristika von primären GB darstellen (s. 2.3.1) [204].

Zuletzt vermuteten Phillips et al. in einem proliferativen Subtyp eine weitere GB-Untergruppe, da sich diese GB durch eine Überexpression von Proliferationsmarkern wie PCNA und TOP2A und eine höhere Proliferationsrate auszeichneten [204]. Dagegen beschrieben Verhaak et al. (2010) neben den erwähnten proneuralen und mesenchymalen GB einen dritten „klassischen“ Subtyp, welcher durch die häufigsten genetischen Aberrationen von GB gekennzeichnet ist, wie Amplifikationen von Chromosom 7, Verlust an Chromosom 10 und EGFR-Amplifikationen, sowie durch die Expression des neuralen Stammzellmarkers Nestin [72].

Als vierten Subtyp beschrieben Verhaak et al. einen neuralen Subtyp. Jedoch konnte dieser nachfolgend nicht bestätigt werden. Es wurden umfassende Längsschnittanalysen von GB-Transkriptomen durchgeführt nach vorangehender Trennung zwischen tumorspezifischer mRNA und mRNA nichtmaligner Zellen [205]. Den Subtypen proneural, klassisch und mesenchymal konnten assoziierte mRNA-Expressionsprofile zugeordnet werden, dem neuralen Subtyp hingegen nicht [205, 206]. Als Ursache wurde vermutet, dass die Proben der ursprünglichen Klassifikation aus [72] mit normalen (nichtmalignen) Neuronen kontaminiert waren, sodass der beschriebene Neural-Subtyp keine GB-Untergruppe darstellte, sondern nichtmaligne Neurone in der Tumor-Mikroumgebung beschrieb [206, 207].

Erwähnenswert lassen sich Glioblastom-Stammzellen (GSC) (s. 2.5.2) anhand ihrer Genexpressionsprofile ebenso in die genannten molekularen Subtypen proneural, mesenchymal und klassisch einordnen [208].

## 2.4 Therapieresistenz

### 2.4.1 Rezidivfähigkeit und Rezidivtherapie bei GB

Ungeachtet des initialen Therapieerfolges tritt bei Glioblastomen nahezu immer ein Tumorrezidiv auf. Dieses ist mit einer medianen Überlebenszeit von 2-10 Monaten und einer PFS von 1,5-6 Monaten verbunden [209-212]. Der zeitliche Abstand zwischen initialer Diagnose und der Wiedervorstellung aufgrund der Tumorprogression beträgt etwa 10 Monate [209]. Die Diagnosestellung für das Tumorrezidiv erfolgt mittels MRT-bildmorphologischer Kriterien sowie klinischem Erscheinungsbild [213]. Der Großteil der Rezidive (80 – 90 %) ist

dabei in unmittelbarer Nähe (bis zu 2 cm Entfernung) zur Lokalisation des Primärtumors bzw. des Resektionsrandes gelegen [214-216].

Zur Behandlung von rekurrenten GB (rGB) gibt es keine einheitliche Therapieempfehlung, da sie eine ausgeprägte Resistenz gegenüber multiplen therapeutischen Modalitäten aufweisen. Während alle bis dato verfügbaren Möglichkeiten zur Zweitlinientherapie eine ungenügende Verbesserung der Prognose bieten, wird ein Einschluss in klinische Studien empfohlen. Die Therapiewahl erfolgt individuell in Abhängigkeit von dem Patientenzustand, dem Befund und der Vortherapie [20, 211]. Eine zweite operative Resektion kann bei operablen (lokalen) Rezidiven und Patienten in gutem Allgemeinzustand als Option dienen, mit einer Verlängerung der medianen Überlebenszeit von etwa 4,9 Monaten bei ausgewählten Patienten [217]. Eine Re-Bestrahlung kann für ausgewählte Patienten erwogen werden, Entscheidungskriterien sind hierbei u. a. die bisher erhaltene RT-Dosis und der zeitliche Abstand zur Vorbestrahlung (der häufig als ein Jahr definiert wird) [218]. Die Gesamtdosis der Bestrahlung(en) sollte unterhalb von 100 Gy liegen, auch wenn bisher kein standardisiertes Schema zur Re-Bestrahlung existiert [218, 219]. Zu den medikamentösen Möglichkeiten zählt eine erneute TMZ-Therapie, wenn ein methylierter MGMT-Status und eine zeitliche Diskrepanz zur TMZ-Ersttherapie vorliegen [220, 221]. Auch kann bei diesem Patientenkollektiv eine Therapie mittels Nitrosoharnstoffen erfolgen (wie bspw. Lomustin) [223]. Mit Bevacizumab steht weiterhin ein monoklonaler VEGF-Antikörper zur Verfügung, der als Salvagetherapie eingesetzt werden kann, obgleich der klinische Nutzen umstritten ist, in Kombination mit Nitrosoharnstoffen und/oder Regorafenib, einem Tyrosinkinaseinhibitor [222-224]. Insgesamt verbleiben die Therapiemöglichkeiten stark limitiert und die Prognose sehr schlecht.

### 2.4.2 Mechanismen der GB-Therapieresistenz

Die nahezu immer eintretende Rezidivbildung von GB ist Konsequenz zugrundeliegender, unterschiedlicher Resistenzmechanismen gegen die adjuvante Erstlinientherapie aus Strahlentherapie und Chemotherapie mittels TMZ. Diese Resistenzentwicklung gegen beide Therapiemodalitäten umfasst Aspekte der inhärenten und der erworbenen Resistenz. Die erworbene Resistenz ist durch genetische, epigenetische und weitere pathophysiologische Veränderungen und Anpassungen des Tumors gekennzeichnet, die de novo nach der Radiochemotherapie entstehen und erworben werden. Dagegen ist die inhärente Resistenz Ausdruck einer ureigenen, präexistierenden Unempfindlichkeit von Tumor(sub-)populationen gegenüber der Tumortherapie durch tumorpathophysiologische Besonderheiten inmitten eines heterogenen Tumors [225]. Sie umfasst die genetische Instabilität von GB, aus der sich markante Alterationen in der Genexpression ergeben, sowie ihre epigenetische dynamische Genregulation. Aus diesen Faktoren resultiert weiterhin eine übergroße Vielfalt an (alternativen) extra- und intrazellulären Signalwegen, sodass ein alteriertes (erweitertes) Signalnetzwerk entsteht [25]. Es verleiht dem GB Flexibilität in seinen Signalwegen und die Unabhängigkeit von einzelnen (Signal-)Molekülen, die therapeutisch als Zielstruktur markiert werden können. Dies betrifft auch die erweiterte Kapazität zur Reparatur der therapieinduzierten DNA-Schäden, die in GB übermäßig aktiviert ist und zur Therapieresistenz beiträgt.

In GB existieren innerhalb eines einzelnen Tumors mehrere, genetisch und phänotypisch voneinander divergente Populationen. Sie unterscheiden sich in ihrer genetischen Ausstattung und ihrer Kapazität zur Therapieresistenz. Durch die Tumortherapie wirkt sich ein großer Selektionsdruck aus, sodass ein evolutionärer Selektionsprozess ausgelöst wird. Hierbei werden therapieresistente Tumorzellklone positiv selektiert und sind imstande, einen aggressiveren und resistenten Rezidivtumor zu bilden [5]. Diese in GB ausgeprägte Heterogenität eines individuellen Tumors wird in 2.5.1 als Unterkapitel der TMZ-Resistenz erläutert, betrifft aber in ihrem gewichtigen Beitrag zur Therapieresistenz gleichermaßen die Radio- wie die TMZ-Therapie.

Inmitten dieser Heterogenität wirken als essentielle Subpopulation in GB sog. Glioblastom-Stammzellen an der Spitze der Tumorphierarchie. Sie stellen GB-Zellen dar, die mit einem markanten Repertoire zur Selbsterneuerung, Proliferation und Therapieresistenz ausgestattet

sind, sodass sie federführend für die Widerstandsfähigkeit von GB und in der Rezidivbildung fungieren. Sie stehen daher in der Erforschung von Mechanismen zur Radio- und Chemoresistenz von GB im Fokus und werden in 2.5 beschrieben.

Übergeordnet betrachtet sind weitere Faktoren der GB-Pathophysiologie integraler Bestandteil ihrer allgemeinen Resistenz gegen eine, wie auch immer geartete systemische Therapie. Hierzu gehören die Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke sowie die Tumormikroumgebung, die als exogene Resistenzmechanismen bezeichnet werden, da sie außerhalb der Tumorzelle stattfinden [225]. Die Blut-Hirn-Schranke weist in GB eine erhöhte Permeabilität für tumorfördernde Stoffe auf und gleichzeitig eine verstärkte Barriere gegenüber antitumoralen Substanzen. Dies erreichen GB über die Herabregulierung der Tight Junctions-Proteine und Hochregulierung von ATP-Binding-Cassette(ABC)-Transportern (wie das Multidrug-Resistance-Protein 1), die den aktiven Efflux von therapeutischen Substanzen aus dem Hirn- bzw. Tumorgewebe vermitteln [29, 226].

Weiterhin sind die Integration der GB in ihre Umgebung und ihre Kommunikation mit dieser als Tumormikroumgebung (sog. Tumormicroenvironment) für den Tumormetabolismus, -progress und für die Therapieresistenz von hoher Bedeutung [227]. GB-Zellen bilden über vielfältige Interaktionen untereinander und mit neuronalen, glialen und endothelialen Zellen ein funktionelles Netzwerk, das optimale Bedingungen für das Tumorgewebe schafft [30]. Innerhalb dieses Netzwerkes können verschiedene Nischen identifiziert werden. Durch hochkomplexe Wechselwirkungen von (heterogenen) GB-Populationen dieser Nischen untereinander und mit nichtmalignen Elementen wird die Tumorerogenität bewahrt, bestimmte genetische Programme gefördert und der Phänotyp verändert, sodass die Therapieresistenz potenziert oder gar erst durch das Microenvironment geschaffen wird [227].

Im Folgenden werden die endogenen, die Tumorzelle betreffenden Resistenzmechanismen gegen eine Therapie mit ionisierender Strahlung und TMZ ausführlich erläutert. Sie werden ihrer biochemischen Bedeutung und ihrer Wesensart (inhärent/ erworben) nach klassifiziert. Resistenzmechanismen durch die intratumorale Heterogenität, die Glioblastom-Stammzellen und das Tumormicroenvironment werden separat in den darauffolgenden Kapiteln dargestellt.

### 2.4.2.1 Modelle der GB-Rezidivbildung

Die Heterogenität von GB hat eine kritische Bedeutung in der endogenen Therapieresistenz von diesen inne. Die parallele Existenz von molekular unterschiedlichen Tumorphpopulationen (als intratumorale Heterogenität) und Selektion der therapieresistenten Klonen unter ihnen machen einen gewichtigen Teil der inhärenten Resistenz aus [225]. Jedoch entsteht umfeld- und therapiebedingt ein selektiver Druck auf GB, der zu Veränderungen in der genetischen Landschaft (durch Mutationen), der epigenetischen Mechanismen und der Regulation von Signalwegen (über ihre Hoch- und Herabregulierung) führt [228]. Erfährt die Tumorzelle durch diese Veränderungen einen Wachstumsvorteil im Vergleich zu den benachbarten Tumorzellen, wird diese (epi-)genetische Veränderung positiv selektiert, gemäß dem Modell der klonalen Evolution von Tumoren [229]. Die Tumorzelle expandiert über die positive, klonale Selektion und bildet identische Zellklone, die dieselbe genetische bzw. klonale Architektur besitzen. Sie kann einen Rezidivtumor initiieren, der über obig genannte Veränderungen und Mechanismen eine Resistenz gegen die Therapie entwickelt [228].

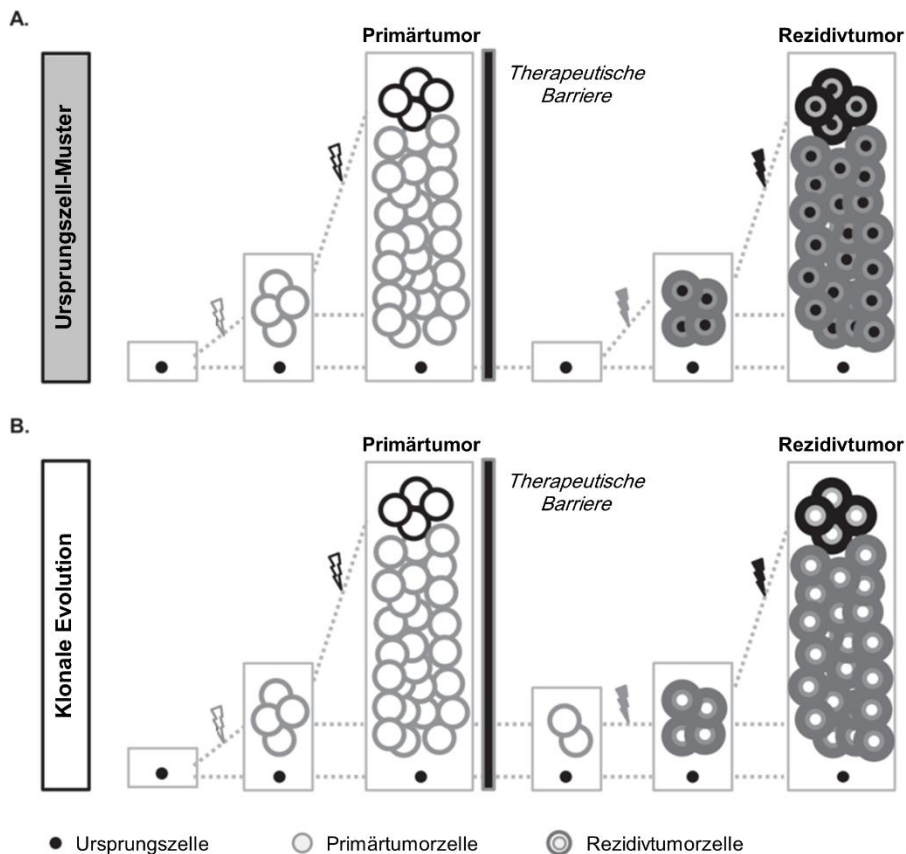
Um die genetischen Veränderungen und ihre therapieinduzierten Selektionen zu ermitteln, wird zum einen die sog. Mutationsretentionsrate ermittelt. Diese beschreibt den Anteil der Mutationen, die im initialen nGB detektiert wurden und im rGB zu finden sind und damit unverändert blieben [15]. Zum anderen werden Mutationen anhand ihrer Tumorzellfraktion beurteilt, d. h. dem Anteil der Tumorzellen, die diese (bestimmte) Mutation aufweisen. Damit wird die Häufigkeit einer gegebenen Mutation im nGB und rGB untersucht und miteinander verglichen [228]. Ferner wird die Mutationslast bestimmt, die die durchschnittliche Häufigkeit von Mutationen (pro Genabschnitt) im gesamten Genom beschreibt. Anhand dieser Kennzahlen können die genomische Divergenz von GB vor und nach der Therapie (mit TMZ) quantifiziert und die klonale Architektur untersucht werden [15]. Die klonale Architektur lässt

sich durch die Tumorzellfraktion charakterisieren. Klonale Mutationen ereignen sich zu einem frühen Zeitpunkt der Malignisierung bzw. Gliomagenese und sind daher in (nahezu) allen Tumorzellen vorhanden, während subklonale Mutationen zu einem späteren Zeitpunkt der Tumorprogression (z.B. therapieinduziert) entstehen und damit nur in einer Teilmenge des GB nachzuweisen sind [6].

GB weisen signifikante Veränderungen über eine longitudinale Evolution auf [30]. Nach einigen Studien nimmt die Gesamtmutationslast von rGB im Vergleich mit nGB zu und betrifft 70 % der rGB [228]. Körbel et al. wiesen dagegen eine ähnlich große Mutationslast in nGB und rGB nach [230]. Die Quantifizierung der Mutationsretentionsrate variiert stark in verschiedenen Studien. Johnson et al. (2014) bezifferten sie bei etwa der Hälfte der rGB mit weniger als 50 %, während Kim et al. (2015) zwei verschiedene Cluster von rGB ausmachten, mit ungefähr 30 % und 80 % an erhaltenen Mutationen [15, 24]. Die spezielle Mutationslast in Drivergenen (Onko- und Tumorsuppressorgenen) bleibt dagegen erhalten und nimmt nicht zu, übereinstimmend hierzu liegt die Mutationsretentionsrate dieser Onkogene im hohen Bereich (durchschnittlich 80 %), mit Neuauftreten von MSH6-Mutationen (s. 2.4.2.3.1) [6, 15, 228, 231-233]. In einer anderen Studie wurden in rGB (bei ähnlicher Mutationslast) auch neue Drivermutationen detektiert, im Vergleich zu nGB [230]. Ferner konnten detektierte Mutationen im paarweisen Vergleich in klonal und subklonal unterteilt werden. Mutationen in den Genen von TP53 und PIK3CA/PIK3R1 erwiesen sich zu 90% als klonal und damit führend für die Entstehung von GB [6]. Sowohl klonal wie subklonal zeigten sich Mutationen und Alterationen in den Genen der Rezeptortyrosinkinasen EGFR, PDGFRA, AKT und PTEN [6, 234]. Dennoch können auch einige Alterationen (bspw. in TP53, PDGFRA und EGFR) in rGB nicht vorhanden sein [29, 233, 234]. Dies signalisiert, dass trotz der hohen Mutationsretentionsrate in Drivergenen Unterschiede zwischen individuellen Genen bestehen [235]. Während TERT-Promotormutationen zu 90 % konserviert werden betrifft dies EGFR-Mutationen nur in etwa 50 % der Fälle [228, 235, 236]. Bemerkenswerterweise kann die Expression von einigen Tyrosinkinasen wie PDGFRB und FGFR2 in rGB sowohl hoch-, herab- als auch gleichreguliert sein [234].

Resümierend kann konstatiert werden, dass sich die klonale Architektur von rGB im Allgemeinen von der klonalen Architektur der nGB ableitet und erhalten bleibt und bei bestehender genomischer Instabilität beider Tumorarten der Tumorprogress dynamisch und variabel bleibt [228]. Weiterhin bestehen teils widersprüchliche Angaben, die die genomische Divergenz von rGB beschreiben. Dies kann man womöglich durch beschriebene Modelle der GB-Evolution und der Tumorprogression nach der Therapie erklären und vereinbaren.

Als Erklärung für die unterschiedlich ausgeprägte genomische Divergenz (und Mutationsretentionsraten) unter rGB schlugen Kim, H. et al. (2015) zwei Muster vor, nach denen sich ein rGB entwickelt [6]. Demnach können sich rGB einerseits nach dem „Ursprungszellmuster“ aus solchen Ursprungszellen entwickeln, die für die Entstehung des Primärtumors (nGB) ursächlich waren. Während die dominanten Zellklone des Primärtumors durch die Radiochemotherapie eliminiert werden, überleben diese therapieresistenten Ursprungszellen. Sie bilden durch Proliferation unter Erwerb neuer Mutationen und genetischer Alterationen das rGB (ebd.). Damit kann die (im Vergleich zu anderen) große genomische Divergenz mancher rGB von ihren nGB erklärt werden, da die gemeinsamen Mutationen von der Ursprungszelle stammen und sich aus ihr zwei divergente Tumoren entwickelt haben (ebd.). Andererseits erklärt das Muster der „klonalen Evolution“ die große Ähnlichkeit und Übereinstimmung von jenen rGB mit ihren nGB, die eine ähnliche klonale Architektur besitzen (ebd.). Nach diesem Modell werden durch die Radiochemotherapie ein Großteil der Primärtumorzellen eliminiert, einige Klone überleben und bilden durch Proliferation das rGB. Dies stellt einen evolutionären Prozess dar, in dem diese Klone zu den bestehenden Mutationen zusätzliche erwerben (ebd.). Daher können in einigen rGB zusätzliche Mutationen nachgewiesen werden, während sie eine hohe Mutationsretentionsrate und alle (Driver-) Mutationen der nGB aufweisen (ebd.). Diese beiden Muster des Tumorprogresses werden in folgender Abbildung veranschaulicht:

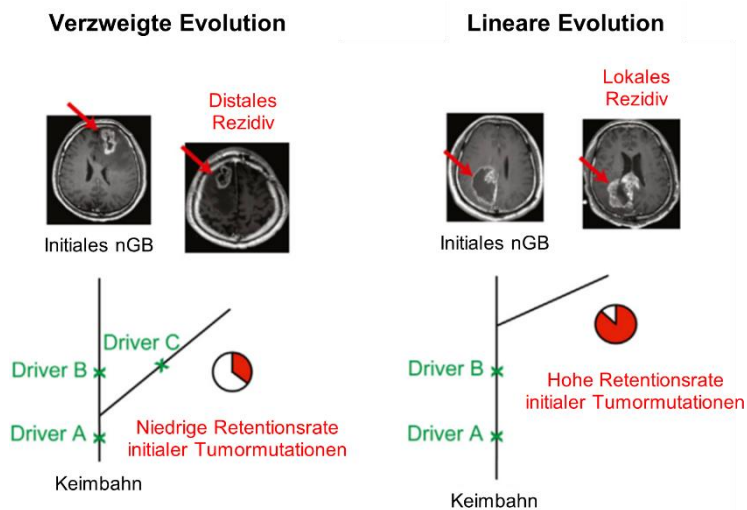


**Abbildung 6: Modell der GB-Rezidentwicklung**

Nach dem Modell von Kim, H. et al. (2015) können sich rGB gemäß zwei Mustern bilden. Nach (A) entwickelt sich der Primärtumor (nGB) aus einem gemeinsamen Ursprung bzw. Ursprungszelle. Diese ist therapieresistent und überlebt daher die Therapie, während die Zellklone des Primärtumors eliminiert werden. Aus dieser Ursprungszelle entwickelt sich in einem evolutionären Prozess (unter Akkumulation neuer Mutationen) der Rezidivtumor, der deshalb genetisch divergent vom Primärtumor ist [6]. Nach dem Muster der klonalen Evolution (B) überleben einige Zellklone des Primärtumors, die unter Erwerb neuer genetischer Alterationen proliferieren und einen Rezidivtumor bilden. Dieser weist daher alle Mutationen des Primärtumors auf und geht klonal bzw. linear aus diesem hervor. Quelle: Modifiziert nach [6]

Das alternative Modell von Kim, J. et al (2015) kann als Erweiterung des obigen Modells betrachtet werden, das zudem eine gemeinsame Schnittmenge aufweist und in Abbildung 7 dargestellt ist [15]. Diesem zweiten Modell nach unterscheidet sich die Mutationsretentionsrate und damit genomische Divergenz von rGB im Vergleich zu nGB stark in Abhängigkeit von der Lokalisation des Rezidivs [15]. Obwohl GB selten extrakraniell metastasieren, sind sie hochinvasiv und infiltrieren das (umliegende) Hirnparenchym [15]. Sie rezidivieren daher meist in unmittelbarer Nähe zur Lokalisation des Primärtumors bzw. des Resektionsrandes; rGB können aber ebenso distal an verschiedenen Hirnregionen (inklusive kontralateraler Hirnhemisphäre) entstehen [15]. Im paarweisen Vergleich von nGB und rGB in Studien werden rGB häufig nicht anhand ihrer Lokalisation in distal und lokal unterteilt. Im Rahmen ihrer Studie lieferten Kim, J. et al. (2015) die Evidenz, dass die GB-Evolution vom nGB zum rGB zwei Mustern folgt, für die die Rezidivlokalisierung entscheidend ist [15]. Bei lokalem Rezidiv weisen die rGB eine hohe Mutationsretentionsrate mit durchschnittlich 70 % auf [15]. Sie teilen daher den Großteil der initialen Tumormutationen der nGB, was eine lineare Evolution darstellt und als komplementär zum Muster der „klonalen Evolution“ im Modell von Kim, H. et al. (2015) gesehen werden kann [15]. Im Kontrast dazu haben rGB bei distalem Rezidiv nur eine Minderheit der initialen Tumormutationen mit nGB gemeinsam und weisen eine geringe Mutationsretentionsrate auf mit durchschnittlich 25 % [15]. Dieser niedrige Grad an weitergegebenen Mutationen ist ein Indikator für eine divergente, verzweigte Evolution, in welcher durch klonale Selektion ein heterogener Rezidivtumor mit großer genomischer Divergenz entsteht [15]. Dementsprechend weisen distale Rezidivtumoren eine größere

Divergenz in den Alterationen von Drivern (wie TP53 und PTEN) auf als lokale [15]. Die Autoren hypothesierten, dass in einer frühen Phase der GB-Entwicklung Tumorzellklone das Hirnparenchym diffus infiltrieren und in einem Ruhezustand verharren, aus dem sie reaktiviert werden und Rezidivtumore an distalen Lokalisationen bilden [15].



**Abbildung 7: Lineare und verzweigte Evolution rekurrenter GB**

Der Rezidivtumor von GB kann sich sowohl lokal als auch distal entwickeln. Lokale rGB weisen eine hohe Mutationsretentionsrate im Vergleich zum initialen nGB auf und besitzen daher dieselben Drivermutationen. Sie folgen daher dem Muster der linearen Evolution. Distale rGB sind in Kontrast dazu durch eine niedrige Retentionsrate von initialen Tumormutationen gekennzeichnet und erwerben daher früh alternative Drivermutationen. Die resultierende genomische Divergenz ist das Resultat dieser verzweigten Evolution. Quelle: Modifiziert nach [15]

Weiterhin ist bei der Interpretation der Ergebnisse von Relevanz, dass eine intratumorale Heterogenität (so wie in nGB) in rGB gegeben ist. So sind die transkriptomischen Muster von Tumorgewebe aus unterschiedlichen Lokalisationen desselben rGB breit gestreut [237]. Dies zeigt, dass die räumliche transkriptomische Divergenz ein übliches Merkmal von rGB ist [237]. Ebenso liegt eine deutliche intratumorale Heterogenität in der genetischen Architektur vor (s. 2.5.1). Diese bedeutenden Faktoren sind bei der Untersuchung der longitudinalen Evolution von GB zu berücksichtigen.

### 2.4.2.2 GB-Radioresistenz

#### 2.4.2.2.1 Hypoxie und metabolische Anpassungen

Hypoxische Konditionen beschreiben einen Sauerstoffmangel im betroffenen Gewebe und werden daher physiologisch mit erschwerten Wachstumsbedingungen für Zellen und deren Tod assoziiert [238]. In GB-Tumorgeweben bildet Hypoxie dagegen ein Charakteristikum, sodass hypoxische und infolge nekrotische Areale pathognomisch für GB und wichtiger Bestandteil ihrer Tumorphysiologie und Therapieresistenz sind (s. 2.1.2). Ursächlich für die Entstehung von hypoxischen Tumorebenen sind zum einen das überschießende Wachstum von GB-Zellen und die konsekutive Mangelversorgung dieser. Zum anderen führt die abnormale Neovaskularisation dieser Tumore zu einem aberranten, hochgradig durchlässigen wie instabilen Aufbau dieser Blutgefäße mit zugleich verdickten Basalmembranen (s. 2.4.2) [109, 239, 240]. Infolgedessen treten in GB gehäuft mikrovaskuläre Thrombosen und Gefäßverschlüsse und damit eine Minderversorgung des Tumorgewebes auf, sodass eine heterogene Tumoroxygenierung in den verschiedenen Tumorebenen vorliegt [109, 241].

Wie in 2.2.2.1 eingeleitet, ist die Effektivität der Radiotherapie wesentlich vom herrschenden Sauerstoffpartialdruck in Tumorgewebe abhängig. Unter hypoxischen Zuständen ist die Bildung von ROS wesentlich vermindert und folglich gleichermaßen der induzierte Zellschaden

und -tod. Weiterhin ist die sauerstoffvermittelte Stabilisierung und Fixierung der strahleninduzierten DNA-Strangbrüche hypoxiebedingt reduziert, sodass die GB-Zellen in jenen hypoxischen Tumorarealen bzw. -nischen (s. 2.5.4) eine Radioresistenz entwickeln [109]. Unabhängig von dieser physikochemischen Beschränkung des biologischen und therapeutischen Effekts von ionisierender Strahlung vermittelt die Hypoxie weiterhin Radioresistenz über Beeinflussung verschiedener zellulärer Prozesse wie Signalwege, Zellzyklus, Redoxsysteme und Stammzellkapazität [109].

Im Wesentlichen erfolgt die zelluläre Antwort auf Hypoxie und die damit assoziierte Radioresistenz über die Transkriptionsfaktoren Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF)-1 und -2, die durch die hypoxische Zellumgebung stabilisiert und damit aktiviert werden [109, 242]. Sie binden an bestimmte DNA-Sequenzen, sog. Hypoxia Response Elemente (HRE), inmitten der Promotoren ihrer Zielgene, deren Expression sie fördern [109, 243]. Die hypoxische Zellantwort wird somit über die Hochregulierung hunderter Gene vermittelt, die in Prozessen der Angiogenese, Glykolyse, Autophagie, Tumorstadium sowie Chemo- und Radioresistenz beteiligt sind [109, 238, 244]. Insbesondere HIF-1 spielt hierbei die dominante Rolle. Er fungiert als Schnittpunkt verschiedener Signalwege und ist zumal sowohl in GB-Zellen mit Stammzeleigenschaften als auch ohne diesen hochreguliert in einer hypoxischen Umgebung, im Gegensatz zu HIF-2, dessen Aktivität ausschließlich in Glioblastom-Stammzellen erhöht zu sein scheint [245, 246].

Die Hypoxie-vermittelte Radioresistenz von GB wird über vielfältige, nur in Teilen verstandene Mechanismen vermittelt. Sie kann beispielweise im Rahmen einer erweiterten DNA-Reparaturkapazität fungieren, indem die Reparatur von DSB über das nichthomologe End-joining entscheidend gefördert wird [245, 247]. Fernerhin zählen zu den transkriptionalen Zielen der HIF eine Vielzahl von Glykolyse-fördernden Genen, sodass durch ihre Hochregulierung eine metabolische Verschiebung hin zur Glykolyse stattfindet [109]. Damit wird ein Phänotyp von GB verstärkt ausgebildet, den der sog. Warburg-Effekt beschreibt. Diesem nach zeigen Tumorzellen in ihrer metabolischen Energiegewinnung eine Beschränkung auf den Prozess der Glykolyse und eine Vermeidung der oxidativen Phosphorylierung des anfallenden Pyruvats, trotz gegebener Sauerstoffversorgung [248]. Der Grund hierfür ist die Einschleusung der Glykolyse-Metabolite in alternative Stoffwechselwege, wie die Produktion von Aminosäurevorstufen und von NADPH, welches als wesentliches Reduktionsmittel und Elektronendonator für die meisten antioxidativen Systeme der Zelle dient, die einen Schutz gegen ROS bieten [27, 30, 249]. Die HIF-induzierte Verstärkung der Glykolyse fördert damit die Redox-Regulation der GB-Zellen und korreliert daher mit einer erhöhten Radioresistenz [27].

### 2.4.2.2.2 Alterierte Signalwege

In Glioblastomen sind physiologische Signalwege alteriert und dereguliert und tragen entscheidend zur Proliferation und Invasivität des Tumors, aber auch zu seiner Radioresistenz und Rezidivbildung bei [26]. In der Radioresistenzforschung steht dabei der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg im Fokus. Er ist ein entscheidender Regulator vieler wichtiger Zellfunktionen, inklusive Zellwachstum, Proliferation, Langlebigkeit, sowie Metabolismus und Apoptose von insbesondere neuronalen Stammzellen [27, 245]. Da zu den nachgeschalteten Zielmolekülen NFκB, GSK3, mTOR, MDM2, BAD und Caspase 9 gehören, die in der Regulation von Überleben und Apoptose von (Tumor-)Zellen ihre Relevanz entfalten, steuert die Alteration ihrer Expression zur Radioresistenz von GB-Zellen bei [245, 250]. In diesen ist der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg sehr häufig hochreguliert, und ist dabei mit Radioresistenz, Rezidivität und geringem Überleben assoziiert [245]. Ferner verstärkt die Aktivierung von AKT über nichthomologes End-joining und homologe Rekombination die DNA-Reparatur (insbesondere von DSB) und wirkt damit radioinduzierten DNA-Schäden entgegen [27, 28]. Weiterhin werden wie oben beschrieben die metabolische Reprogrammierung und HIF1-gesteuerte Reaktion der Tumorzelle über diesen Signalweg mitgesteuert. Verschiedene genetische Aberrationen sind in GB für die pathophysiologische Hochregulierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs verantwortlich, die zum Teil in 2.3 erläutert werden. Sie umfassen die übermäßige EGFR-Expression aufgrund einer Genamplifikation sowie inaktivierende Mutationen oder den

chromosomalen Verlust des PTEN-Gens als Tumorsuppressorgen. Mutationen in den PI3K-Gendomenen können aktivierend sein und zur Hochregulierung des nachgeschalteten Signalweges beitragen (s. 2.3). Diese deregulierenden genetischen Abnormalitäten und weitere kommen geschätzt in etwa 88 % aller GB vor [26]. Der AKT-Signalweg ist damit integraler Bestandteil der inhärenten Radioresistenz von vielen GB.

Durch den AKT-Signalweg aktiviert wird der Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg, der mit zunehmender Hochregulierung in Glioblastomen vermehrte Invasivität und Radioresistenz vermittelt [27]. So wiesen radioresistente GB-Zellen nach Bestrahlung eine hohe Expression von bestimmten Wnt-Signalgenen auf; eine Inhibition des Wnt-Signalwegs förderte dagegen die Radiosensitivität [251]. Ferner ist der Notch-Signalweg radioresistenz-assoziiert, der über verschiedene Notch-Rezeptoren die Kommunikation benachbarter Zellen fördert und von Bedeutung in der Neurogenese wie neuronalen Differenzierung ist [245]. Bekannt ist seine Aktivierung des oben genannten AKT-Signalwegs nach erfolgter Bestrahlung [245]. Seine weitere Bedeutung für die GB-Radioresistenz bleibt zur Zeit noch unklar, eine Inhibition des Notch-Signalwegs ist jedoch mit einer vermehrten Radiosensitivität verbunden [245].

Darüber hinaus sind weitere Signalwege, die für die DNA-Reparatur (bspw. ATM-Chk2-p53) oder Neurogenese (wie Notch und Sonic Hedgehog) verantwortlich sind, in Glioblastom-Stammzellen hochreguliert und an ihrer selektiven (erhöhten) Radioresistenz beteiligt (s. 2.5.8.1)

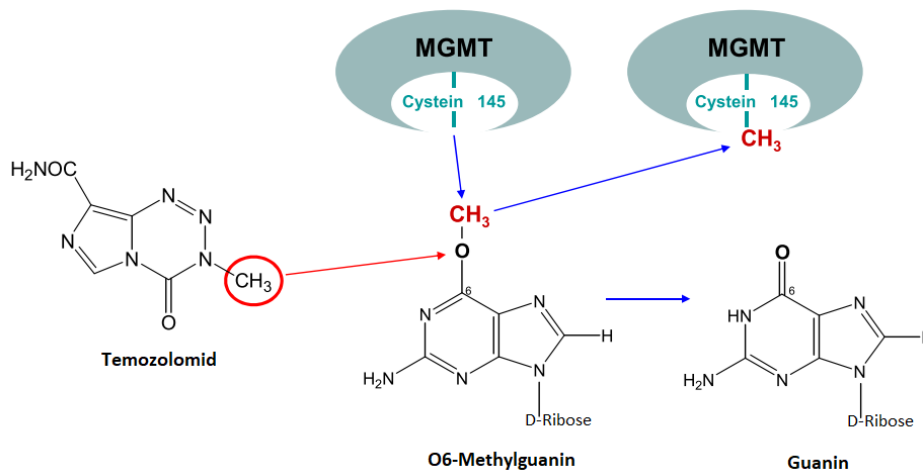
### 2.4.2.3 Temozolomidresistenz

#### 2.4.2.3.1 DNA-Reparatursysteme

Die DNA-Reparatursysteme, die für die Sensitivität und Resistenz von GB gegenüber der Chemotherapie mit TMZ die größte Relevanz besitzen, umfassen die MGMT, MMR und BER.

MGMT ist ein kleines enzymähnliches DNA-Reparaturprotein, das im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert ist [135]. Seine Funktion liegt darin, Alkylierungen der DNA an Guanin-Basen (an der Position O6) zu erkennen und zu entfernen, da diese Transitionsmutationen bewirken und zytotoxische Effekte haben (s. 2.2.3.1) [135, 252]. Hierzu überträgt MGMT den Alkylrest vom O6-Alkylguanin auf eine eigene Proteindomäne durch kovalente Bindung mit einem Cystein-Aminosäurerest des MGMT-Proteins, wie in Abbildung 8 dargestellt. Unter Wiederherstellung der strukturellen Integrität der DNA-Base wird das MGMT-Protein durch diesen Prozess selbst inaktiviert und abgebaut und wird deshalb als „Selbstmord-Protein“ bezeichnet [253, 254]. Demnach wirkt MGMT der zytotoxischen Methylierung von O6-Guanin durch TMZ entgegen. Es repariert die induzierte, für den zytotoxischen Effekt federführende DNA-Läsion und vermittelt daher eine wichtige inhärente Resistenz gegen TMZ.

Anhand dieses Wirkmechanismus wird ersichtlich, weshalb der MGMT-Genstatus ein wichtiger prognostischer Faktor ist. Bei methyliertem MGMT-Promotor werden konsekutiv die Genexpression und MGMT-Enzymaktivität herabreguliert, sodass der Wirkung von alkylierenden Agenzien weniger stark entgegengewirkt werden kann, somit bleibt der MGMT-Resistenzmechanismus aus. Damit wird die Chemosensitivität des GB gegenüber der alkylierenden TMZ-Therapie erhöht [255]. Daher korreliert ein positiver MGMT-Methylierungsstatus mit signifikant höherer progressionsfreier und Gesamt-Überlebenszeit im Vergleich zu GB mit nichtmethyliertem MGMT-Promotor [91, 92].



**Abbildung 8: Reparaturmechanismus von MGMT**

MGMT fungiert als DNA-Reparaturprotein für alkylierte Guaninbasen. Durch TMZ wird durch Methylierung die Bildung von O6-Methylguanin induziert. Diese DNA-Läsion erkennt MGMT und katalysiert die Wiederherstellung von Guanin durch die kovalente Bindung des  $\text{CH}_3$ -Methylrestes an den eigenen Cystein-Aminosäurerest an Position 145. Hierdurch wird MGMT inaktiviert und folglich abgebaut. Quelle: Modifiziert nach [5]

Auch wenn der MGMT-Bildungsgrad bei GB ein wichtiger Faktor für Therapieansprechen, Prognose (s. 2.1.3) und Resistenzfähigkeit von rGB ist, besitzt er dennoch eine limitierte Bedeutung in der Resistenzentwicklung. Zum einen liegt die MGMT-vermittelte inhärente Resistenz lediglich in etwa 50 – 60 % aller Fälle vor, denn in diesem Anteil an GB ist die Genregion des MGMT-Promotors nicht methyliert, während in 40 – 50 % der GB diese Methylierung vorliegt (s. 2.3.2). Da die Promotormethylierung des MGMT-Gens entscheidend zur Herabregulation der MGMT-Bildung ist, entfällt in der zweiten GB-Gruppe die protektive Funktion von MGMT, das hier nicht zur Therapieresistenz beiträgt (und diese GB rezidivieren dennoch) [256]. Zum anderen bleibt der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors weitgehend unbeeinflusst von der Radiochemotherapie. In etwa 75 – 90 % der GB ist er konstant und nach der Therapie so wie vorher [257, 258]. Dies deutet daraufhin, dass die TMZ-Resistenzentwicklung nicht primär mit dem Methylierungsstatus des MGMT-Promotors zusammenhängt [253]. Die Rolle von MGMT in der TMZ-Resistenz von rGB wird durch die Beobachtung gestärkt, dass die MGMT-Aktivität sowohl in Gliom-Zelllinien und GB-Xenografts als auch in rGB (in Patienten) nach der Behandlung bzw. Standardtherapie mit TMZ erhöht war [5]. Dies lässt sich entweder durch die TMZ-bedingte Induktion bzw. Hochregulierung von MGMT erklären oder durch die positive Selektion von MGMT-exprimierenden Zellen [5]. Resümierend ist MGMT in der Erklärung der inhärenten Resistenz von Wichtigkeit, allerdings nur von begrenztem Einfluss, zumal in GB mit methyliertem MGMT-Promotor und damit keiner oder geringfügiger MGMT-Expression die MMR eine größere Relevanz zu besitzen scheint [259].

Wie in 2.2.3.1 beschrieben ist eine intakte und funktionsfähige MMR maßgeblich für den zytotoxischen Effekt von TMZ, da sie einen G2-Phasenarrest einleitet und Signalkaskaden zur Apoptose oder Autophagie aktiviert. Sie bestehen aus einem Multiproteinkomplex, der u. a. aus den Reparaturproteinen MSH2, MSH6 und MLH1 besteht [260]. In Tumorzellen mit fehlerhafter MMR (durch bspw. Mutationen in vorherig genannten Reparaturproteingenen) hingegen werden die TMZ-induzierten DNA-Methylierungen bzw. Transitionsmutationen nicht erkannt [261-263]. Stattdessen werden sie toleriert, der Zellzyklus und das Zellwachstum werden nicht behindert. Das Resultat ist eine erworbene TMZ-Resistenz durch eine erworbene MMR-Funktionseinschränkung [5, 261].

Bei überwiegend konstantem Methylierungsstatus der MMR-Gene in GB bzw. rGB (im prä- und posttherapeutischem Vergleich) wird diese erworbene MMR-Defizienz im Wesentlichen durch inaktivierende Mutationen nach TMZ-Behandlung in MMR-Genen (u.a. MSH2, MSH6, MLH1) verursacht [258]. Solche Mutationen wurden in Gliom-Zelllinien, GB-Xenografts und rGB nachgewiesen [5, 264-267]. Diese MMR-Genmutationen sind selten in GB vor TMZ-

Therapie vorhanden, sodass diese Gene vulnerabel für TMZ-induzierte Mutationen sind [268]. Eine aus solchen Mutationen resultierende MMR-Defizienz vermittelt Resistenz gegenüber TMZ und kann zur Bildung eines sog. Hypermutationsphänotyp in rGB führen. Bei anhaltender TMZ-Exposition wirkt dessen mutagener Effekt fort, sodass (bei defektem MMR-Reparaturmechanismus) dies zur beschleunigten Mutagenese und Tumorprogress beiträgt [269]. Komplementär dazu ist ein solcher Hypermutationsphänotyp häufiger in GB mit MGMT-Promotormethylierung (mit 23 %) als ohne diese (mit 5,6 %) zu finden [203, 270]. Da der Selektionsdruck bei Ersteren (durch die Chemosensibilität gegenüber TMZ) größer ist, werden daher TMZ-induzierte und TMZ-resistenzvermittelnde MMR-Genmutationen eher selektiert [5].

Unter den erwähnten MMR-Genmutationen spielt das MSH6-Gen die größte Relevanz. Dies kann sowohl durch eine Genmutation inaktiviert werden als auch durch Herabregulierung seiner Expression [269, 271]. Während in GB ohne TMZ-Therapie (unbehandelte und bestrahlte GB) keine Aberrationen in der MSH6-Expression und im MSH6-Genstatus zu finden sind, finden sich solche MSH6-Mutationen und Herabregulierung der MSH6-Expression in etwa 26 % der (posttherapeutischen) rGB [203, 266, 271]. Dies ist Ausdruck der positiven Selektion von MSH6-Mutationen, die zur erworbenen Resistenz gegenüber TMZ beitragen [5].

Zuletzt sei die BER erwähnt, die führend bei der Reparatur der TMZ-induzierten N7-Methylguanin- und N3-Methyladeninläsionen ist (s. 2.2.3.1). Insbesondere Letztere stellen einen potentiell letalen DNA-Schaden dar [268]. Diese DNA-Veränderungen spielen im zytotoxischen und therapeutischen Effekt von TMZ eine untergeordnete Rolle, da die BER im überwiegenden Anteil der GB intakt ist und diese Läsionen behebt [133, 134]. Sie zählt daher zur inhärenten Resistenz, spielt jedoch im Vergleich zu MGMT und zur MMR eine untergeordnete Rolle [268].

### 2.4.2.3.2 Longitudinale Evolution

Einen weiteren bedeutenden Mechanismus der erworbenen Resistenz stellt die longitudinale Evolution dar, sprich die (durch und nach der Therapie) de novo erworbenen genetischen Alterationen [225]. Diese therapiebedingte molekulare Evolution wird durch den (molekularen) Vergleich von neu diagnostizierten GB (nGB) mit rGB offenkundig [237]. Nichtsdestotrotz verbleibt die Notwendigkeit nach weiteren paarweisen Vergleichen und systematischer Charakterisierung von rGB, angesichts der geringen Häufigkeit bisheriger Vergleiche und der Gewinnung von rekurrentem GB-Tumorgewebe allgemein, bei überwiegender Inoperabilität der Patienten mit diesem Befund [237].

Einige Studien berichteten über eine transkriptomische Divergenz, die longitudinal zwischen nGB und rGB auftritt. Bei Untersuchung der Genexpressionsprofile (s. 2.1.2) von rGB ist demnach eine Verschiebung festzustellen. Diese ereignet sich vom proneuralen bis zum mesenchymalen Subtyp [204]. Eine solche, für diese Subtypen präferierende Selektion konnten andere Studien nicht bestätigen, in denen keine Korrelation zwischen einem bestimmten Subtyp und dem Tumorstadium (nGB oder rGB) und kein signifikanter zeitlicher Wechsel im Subtyp festgestellt werden konnte [237, 272, 273]. Die in manchen Studien festgestellte Verschiebung kann Ausdruck der räumlichen Variation der Genexpression (als transkriptomische Divergenz) sein, da lediglich einzelne Tumorproben (pro rGB) zur Analyse verwendet wurden [204, 237].

In einer Untergruppe von rGB konnte ein TMZ-assoziiertes, erworbener Hypermutionsphänotyp nachgewiesen werden. Diese rGB wiesen eine Reihe an Mutationen auf, die nicht in ihren Primärtumoren nachzuweisen waren. Auf der einen Seite kann eine TMZ-induzierte Hypermution zur Chemoresistenz beitragen [274]. Auf der anderen Seite ist ihre Häufigkeit und damit ihr Einfluss begrenzt. Sie ist in Rezidivtumoren von primären GB mit IDH-Wildtyp nur in 16 % nachzuweisen und ist in Rezidivtumoren sekundärer GB mit IDH1/2-Mutationen signifikant häufiger mit 25 – 47 % [228, 233]. Diese große Differenz in der Häufigkeit eines Hypermutionsphänotyps lässt sich womöglich durch die Auswirkung von IDH1/2-Mutationen erklären. Wie in 2.3 beschrieben führt der Großteil dieser Mutationen zur Hypermethylierung vieler Genloci, zu denen der MGMT-Promotor gehört. Durch die induzierte

Herabregulierung der MGMT-Bildung kann der TMZ-vermittelten Alkylierung und Mutagenese nicht entgegengewirkt werden (s. 2.4.2.3.1). Des Weiteren können MMR-Gene von diesen Mutationen betroffen sein, wodurch die MMR inaktiviert und die Mutagenese beschleunigt wird (s. 2.4.2.3.1). In der Zusammenschau kommt ein solcher Hypermuationstyp deshalb zum einen häufiger in sekundären GB mit IDH1/2-Mutationen und zum anderen auch häufiger in GB mit MGMT-Promotormethylierung vor (s. 2.4.2.3.1). Komplementär weisen sekundäre GB häufiger eine MGMT-Promotormethylierung vor als primäre GB (s. 2.3.2). Resümierend lässt sich nach TMZ-Therapie ein Hypermuationstyp in einem Teil der rGB finden, der zur Chemoresistenz beitragen kann. Er ist stärker mit sekundären GB mit IDH1/2-Mutationen assoziiert, die nur eine Minderheit unter den GB darstellen (s. 2.1.1 und 2.1.2), während der Großteil der rGB ihn nicht aufweist. Daher ist die Bedeutung dieses Hypermuationstyp für die Resistenzentwicklung unter GB nur von untergeordneter Bedeutung. Hiermit konform geht die Beobachtung, dass ein Hypermuationstyp keinen nachteiligen Effekt auf das Überleben der Patienten hatte; die klinische Bedeutung bleibt daher ungewiss [228, 233, 269, 275].

TMZ-induzierte Mutationen können auch Alterationen in Signalwegen verursachen. So führen sie zu einer Dysregulation des RB-Signalweges, aktivieren den AKT-mTOR-Signalweg und fördern dadurch Tumorwachstum und -progression [23, 24]. Weiterhin persistieren (unabhängig von TMZ-induzierten Mutationen) essentielle tumorigene (alterierte) Signalwege in rGB, die in ihren nGB vorhanden waren. Diese betreffen neben dem erwähnten PI3K-AKT-mTOR-Signalweg die DNA-Reparatur, Kras- und Wnt-Signalwege [272, 276]. Dies impliziert, dass keine signifikanten therapieinduzierten Effekte auf diese essentiellen Signalwege stattfanden [231, 272]. Einen hohen Grad an Konkordanz weisen rGB und nGB auch in anderen Signalwegen hinsichtlich ihrer Herab- oder Hochregulierung auf [237]. Konkordant hochreguliert waren in einer Studie mehrere gliomafördernde Signalwege wie TGF $\beta$ , PAK, JNK, JAK-STAT und der MGMT-Signalweg, wie auch in 2.4.2.3.1 beschrieben [237]. Über die Persistenz dieser Signalweg-Dysregulationen hinaus lässt sich in rGB beobachten, dass sie typischerweise umfangreichere Alterationen in den wichtigen onkogenen Signalwegen aufweisen als ihre nGB [15]. Dies betrifft die Signalwege RTK-MAPK (zu 86 %), RTK-PI3K (zu 91 %), INK4-RB (zu 77 %) und ARF-p53 (zu 86 %), genauso wie die Zunahme von kombinierten Alterationen in allen vier Signalwegen [15].

Zusammenfassend lässt sich hier und aus 2.4.2.1 konstatieren, dass rGB zum überwiegenden Teil die klonale Struktur und Architektur ihrer Primärtumoren beibehalten, unter Berücksichtigung der individuellen Wege der posttherapeutischen Gliomaevolution [228]. Während rGB-spezifische Mutationen als Hypermuationstyp auftreten können, die eine verringerte TMZ-Sensitivität vermitteln, weist die Mehrheit der rGB (ohne diesen Phänotyp) keine Häufung bestimmter somatischer Mutationen auf, sodass die Rezidiventwicklung nicht primär durch bestimmte Sets an Mutationen geleitet zu sein scheint [228]. Auffällig ist die Variabilität, in der Signalwege und mögliche therapeutische Zielstrukturen (häufiger) alteriert sein können. Da die Empfehlungen für die Therapiewahl von rGB häufig auf dem Status des Primärtumors (für diese Zielstrukturen und Markern) basieren, müssen diese und weitere longitudinalen Veränderungen bei der Therapiewahl berücksichtigt werden, um das Therapieansprechen möglichst genau prädiktiv zu bestimmen [237]. Diese Veränderungen machen u. U. eine Re-Biopsie bei Rezidivtumoren zur Evaluierung ihres genetischen Status notwendig [15]. Als weiterer wichtiger Faktor imponiert die breite intratumorale Heterogenität, die wie in nGB auch in rGB vorhanden ist.

## 2.5 Intratumorale Heterogenität und Glioblastomstammzellen

### 2.5.1 Intratumorale Heterogenität

Für viele Jahrzehnte dominierte die Theorie der klonalen Krebsentstehung die Onkologie, die Tumore als homogene Tumormasse darstellte und daher Therapien entwickelt wurden, die die Tumorzellen gleichermaßen eliminieren sollten [30]. Durch die fortschreitenden

biotechnologischen Möglichkeiten wuchsen die Erkenntnis und Evidenz über die Präsenz von multiplen Tumorzellklonen innerhalb desselben Tumors [6, 30]. Diese unterscheiden sich in ihrer genetischen Ausstattung, welche zudem über epigenetische Modifikationen noch weiter divergieren kann, wobei Letzteres auch genetisch identische Tumorzellen betreffen kann [30]. Die Präsenz von verschiedenen Tumorzellklonen und ihrer Expansion in verschiedene Subpopulationen innerhalb desselben Tumors wird als evolutionärer Prozess verstanden, in dem verschiedene Klone (mit genetischer Diversität) um limitierte Ressourcen konkurrieren und eine positive Selektion der am besten angepassten Tumorzellklone stattfindet [6, 277].

Besonders in GB liegt eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität vor, wie der ursprüngliche Namenszusatz „multiforme“ vermittelte. Wie ausführlich in 2.1.2, 2.3, 2.3.2 und 2.4.2.1 dargelegt, umfasst diese Heterogenität multiple Ebenen aus Morphologie, genetischer Architektur, epigenetischer Regulation, Genexpressionsprofilen und alterierten Signalwegen, in denen sich Populationen des einzelnen GB (an räumlich verschiedenen Stellen) unterscheiden, und ihr tumorigenes Potenzial noch weiter vergrößern [30]. Diese komplexe Vielfalt ist zumeist in nGB untersucht und rekapituliert sich ebenso in rGB (s. 2.4.2.1) [235]. Diese intratumorale Heterogenität ist als wesentliche inhärente Resistenz mit Therapie- und TMZ-Resistenz assoziiert. Sie stellt eine beträchtliche und womöglich die größte Barriere für Therapieregime mit einzelnen Substanzen dar [29]. Sie ist die Ursache, weshalb einzelne Wirkstoffe nicht alle Tumorphysionpopulationen von GB effektiv erreicht werden können, sodass einige (Sub-)Populationen persistieren [30]. Gleichermaßen bedeutsam und noch weitreichender ist die Fähigkeit von (neu diagnostizierten wie rekurrenten) GB durch diese inhärente Heterogenität auf den selektiven Druck zu antworten, der durch die Primär- bzw. Rezidivtherapie erzeugt wird [6, 277]. Dies vollzieht sich über oben genannten evolutionären Prozess, sodass resistenter Tumorklone bzw. -populationen positiv selektiert werden und expandieren [6, 277].

Innerhalb des hoch heterogenen Glioblastoms und als essentieller Bestandteil seiner Heterogenität existiert eine spezifische Subgruppe, die stammzellähnliche Charakteristiken besitzt, wie eine umfangreiche Kapazität zur Selbsterneuerung und multipotenten Differenzierung [278]. Diese sog. Glioblastom-Stammzellen (GSC) sind Gegenstand aktueller Forschung und werden weitgehend als entscheidend und verantwortlich für die Rezidiv- und Resistenzfähigkeit von GB angesehen, gemäß dem Ursprungszellmuster in Abbildung 6, da sie eine ausgeprägte Widerstandsfähigkeit gegen Radio- und Chemotherapie aufweisen [279]. GSC stellen selbst eine heterogene Population dar und sind die primäre Quelle für die hochgradige intratumorale Heterogenität von GB, die aus jenen GSC-Populationen resultiert und durch sie aufrechterhalten wird [29, 31, 32].

### 2.5.2 Konzept der Krebsstammzellen

Die physiologische Entwicklung von Organen wird durch genetische Programme gesteuert, durch welche die dynamischen Faktoren aus Zellproliferation, -tod, -migration und -differenzierung reguliert werden. Diese Programme sind im Allgemeinen in Stammzellen erhalten, die damit essentiell für die Organhämostase sind und an der Spitze der zellulären Hierarchien stehen [280]. Sie stellen sich selbst erneuernde Zellen dar, die sich durch asymmetrische Zellteilung auszeichnen. Bei dieser Art der Zellteilung entsteht sowohl eine neue (identische) Stammzelle als auch eine Tochterzelle, die sich differenziert. Zum einen wird durch die Aufrechterhaltung des Stammzellpools die Proliferationskapazität und -fähigkeit beibehalten [37]. Zum anderen sind Stammzellen damit multipotent, d. h. sie können verschiedene Zelltypen hervorbringen, die sich in ihrem Genotyp, ihrem Phänotyp und ihrer Funktion unterscheiden. Sie generieren daher unterschiedliche linienbeschränkte Nachkommen, die sich schließlich zu den terminal differenzierten Effektorzellen entwickeln; dieser Prozess beschränkt die Zellentwicklung auf einen bestimmten Zelltyp und ist unidirektional [280].

Analog zur physiologischen Sonderstellung von Stammzellen wurden vor mehr als einem Jahrhundert stammzellähnliche Tumorzellen für Tumorgewebe postuliert, die wesentlich zum Tumorzellwachstum, zur -formation und -resistenz beitragen [281]. Tatsächlich gelang erst im

Jahre 1997 die Isolierung einer stammzellähnlichen Population aus Leukämien und nachfolgend aus einer Reihe weiterer Tumore [282]. Insbesondere die Entdeckung von sich selbst erneuernden und tumorinitiierenden Tumorstammzellen in GB begründete ein neues intensives Forschungsfeld [283-285]. Diese sog. Glioblastom-Stammzellen (GSC) machen nur einen kleinen Teil des Tumors aus und weisen viele gemeinsame Eigenschaften mit physiologischen Neuralstammzellen auf [35]. Sie sind charakterisiert durch ihre unbegrenzte Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch asymmetrische Zellteilungen, wodurch neue tumorigene GSC und gleichzeitig verschiedene, differenzierte Tumorzellen entstehen [35]. Sie sind daher multipotent und tragen somit in großem Maße zur zellulären (intratumoralen) Heterogenität von GB bei und halten diese aufrecht [29, 31, 32, 35].

Damit GB-abgeleitete Tumorpopulationen diese definierenden Anforderungen erfüllen und experimentell als GSC definiert werden, müssen sie zum einen die Kapazität zur Selbsterneuerung aufweisen. Dies zeigt sich durch die Fähigkeit, in serumfreien Zellkulturen in Anwesenheit geeigneter Wachstumsfaktoren (aus Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Epidermal Growth Factor (EGF)) neurosphären-ähnliche Strukturen als sog. Tumorsphären zu bilden [35, 133]. Bei Kultivierung in diesem Stammzellmedium bewahren GSC den Geno- und Phänotyp des ursprünglichen Tumors [133, 286]. Zum anderen müssen sie in der Lage sein, sich nach sekundärer, intrakranieller Transplantation (in immunsupprimierte Mäuse) zu vermehren und einen Tumor zu erzeugen, der die zelluläre Heterogenität und Komplexität des ursprünglichen Tumors rekapituliert (durch die Bildung verschiedener differenzierter Tochterzellen) [35, 37, 280]. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die letztgenannte funktionale Nachweismethode die verlässliche ist. Sie ist als in vivo-Technik der ersten Methode überlegen, da diese zwar ein in vitro-Wachstum anzeigt, aber eher kein adäquates Ersatzmaß für die Selbsterneuerungskapazität von GSC darstellt [35, 237].

Beachtenswert ist, dass die Theorie über GSC bzw. Tumorstammzellen allgemein nicht aussagt, dass (physiologische) Stammzellen den Ursprung von GB respektive Tumorgewebe darstellen und Tumorstammzellen daher nicht alle Eigenschaften von physiologischen Stammzellen teilen müssen [280]. Tatsächlich besteht über den Ursprung der GSC selbst noch Unklarheit, wobei zwei Hypothesen diskutiert werden. Physiologische Stammzellen werden als Vorläuferzellen betrachtet, die durch mutagene Ereignisse eine maligne Transformation durchlaufen und sich zu GSC entwickeln. Jene Umwandlung konnte experimentell durch die onkogene Stimulation von physiologischen Neuralstammzellen induziert werden [287]. Diese Hypothese schlägt daher eine strikt hierarchische, unidirektionale Entwicklung vor [35, 37]. Die andere Hypothese postuliert die Entwicklung von GSC aus reifen, differenzierten GB-Zellen ohne Stammzeleigenschaften, die durch Dedifferenzierung (zu unreifen Vorgänger-/Stammzellen) selbsterneuernde und mesenchymale Eigenschaften erwerben. Während die meisten transgenen Tiermodelle die erste Hypothese unterstützen, konnte die Fähigkeit zur Reprogrammierung differenzierter Tumorzellen entsprechend der zweiten Hypothese experimentell nachgewiesen werden [37, 288, 289].

### 2.5.3 Modelle des Glioblastom-Netzwerks

GSC stellen eine kleine Subpopulation innerhalb von GB dar, die sich stark von den restlichen, stark proliferierenden Zellen der Tumormasse unterscheidet [35]. Sie werden als verantwortlich für die GB-Bildung, -Erhaltung, -Invasivität und -Rezidivierfähigkeit betrachtet [33-35]. Insbesondere ihre Kapazität zur Aufrechterhaltung des Tumorwachstums und ihr Beitrag zur Resistenz gegenüber klinischer Therapie sind grundlegende Eigenschaften von GSC [225]. Durch vielfältige Mechanismen besitzen sie eine inhärente Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie (inklusive TMZ) und verleihen diese dem Tumor, sodass er in eine aggressivere Form übergeht und GSC die Tumorprogression trotz Therapie induzieren [34, 225, 290, 291]. Gewöhnlich werden GSC als ruhende (englisch quiescent) Zellen modelliert, die ein niedriges, aber konstantes Niveau unbegrenzter Proliferation aufrechterhalten. Dieser Ruhezustand würde einen Schutz vor therapeutischen Regimen darstellen, die Zellen mit hoher mitotischer Aktivität attackieren, und daher einen der Resistenzmechanismen darstellen [37]. Auch wenn sie unbegrenzt proliferieren können, behalten GSC (in vivo und in vitro) dennoch ihre Fähigkeit zur Rekapitulation der Heterogenität des ursprünglichen Tumors bei,

auch nach Behandlung mit zytotoxischen Substanzen wie TMZ, sodass diese intratumorale Heterogenität in ihnen fest verdrahtet zu sein scheint [292-294].

Glioblastome sind komplexe Systeme, die einen hohen Grad an Plastizität und dynamischer Regulation in den verschiedenen Tumorstadien aufweisen [295]. GSC nehmen hierin als an der Spitze der Tumorarchitektur sitzend eine zentrale Rolle ein. Die Beschreibung und Modellierung dieser Tumorarchitektur weist eine stetige Weiterentwicklung und Erweiterung auf, sodass den stets komplexeren Einblicken in die Tumorphysiologie entgegen anfänglicher Komplexitätsreduktion Folge geleistet wird [280].

Das klassische hierarchische Konzept über Tumorstammzellen (bzw. GSC) postuliert eine kategoriale Definition und Einteilung der GB-Zellen in GSC und Nicht-GSC mit jeweils diskreter molekularer Ausstattung [133, 292]. Demnach könnten nur GSC den Tumor erzeugen bzw. regenerieren, da aus ihnen der Großteil der Tumormasse entsteht, die aus proliferierenden, terminal differenzierten Effektorzellen ohne GSC-Eigenschaften besteht [133, 296]. GSC stehen damit an der Spitze und differenzierte Zellen am Ende einer strikt hierarchischen Ordnung und eines Entwicklungspfad, der demnach unidirektional abläuft [37]. Dieses Modell wird durch mehrere Erkenntnisse unterstützt. Zum einen kann das tumorigenierende und -formende Potenzial von GSC durch Manipulation dieses Entwicklungspfad verändert werden. Die Auslösung der Differenzierung von GSC reduziert dieses Potenzial, während es auch durch die Reprogrammierung von GSC zu induzierten pluripotenten Stammzellen alteriert wird [297-299]. Zum anderen können wie oben erwähnt tumorigene GSC aus nichttumorigenen differenzierten Gliomzellen durch die Überexpression bestimmter Transkriptionsfaktoren erzeugt werden [299, 300]. Trotz dieser unterstützenden Evidenz weist das klassische Modell in seiner starren Einteilung augenfällige Defizite auf. So sind die definierten Eigenschaften von GSC aus Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Tumorbildung Merkmale vieler Tumorzellen, sodass die Trennlinie zwischen GSC und malignen Zellen unscharf verläuft [299]. Hinzu kommt, dass der Nachweis dieser Eigenschaften üblicherweise im Tiermodell erfolgt, dessen Übertragungskraft auf das menschliche Tumormilieu zu hinterfragen ist [299]. Ferner liegt den Methoden zur Isolierung von GSC keine einheitliche Grundlage zugrunde, sodass die nachfolgenden Charakterisierungen unterschiedliche Gruppen betreffen können. So werden zur Identifizierung von GSC unterschiedliche Oberflächenmarker verwendet (s. 2.5.5), die zum einen nicht absolut sind und zum anderen nicht zwangsläufig eine diskrete Gruppe definieren, sondern möglicherweise mehrere Untergruppen in verschiedenen zellulären Zuständen, sodass die gewonnenen Erkenntnisse sich auf unterschiedliche Zellpopulationen beziehen können [299]. Deutlich wird diese Unschärfe anhand unterschiedlicher Nomenklatur dieser Studien (von „Tumorstammzelle“ über „tumorigenierende Zelle“ zu „tumorerweiternde Zelle“) [280]. Ebenso ist die binäre Einteilung in „GSC“ und „Nicht-GSC“ zu vereinfachend, da Letztere wahrscheinlich ebenso eine Vielzahl an unterschiedlichen zellulären Zuständen enthalten [299]. Zuletzt könnten GSC stärker proliferativ sein als angenommen (bei postuliertem Ruhezustand), was dem klassischen Modell entgegengesetzt ist [280, 301].

Aufgrund dieser offenkundigen Limitierungen des klassischen Modells ist eine Erweiterung hin zu einem dynamischen und plastischen Konzept über GSC und der Architektur von GB nötig gewesen, um die dynamischen Interkonversionen von GSC zwischen verschiedenen Zellzuständen sowie das vorherrschende Kontinuum zwischen diesen Zuständen zu berücksichtigen [237, 299]. Diese neuen Erkenntnisse speisen sich insbesondere aus jüngsten Einzelzell-RNA-Sequenzierungen (engl. single cell RNA sequencing (scRNA-Seq)) von GB, die durch transkriptomische Charakterisierung tausender individueller Tumorzellen Aufschluss über die komplexe und dynamische genomische Landschaft von Tumoren geben [299, 302].

Insbesondere standen dabei GB im Fokus, an denen in mehreren Studien scRNA-Seq durchgeführt wurden, die Auftrieb zu einem neuen Modell gaben, das obige Limitationen und Besonderheiten berücksichtigt [303-306]. Demzufolge wird der Stammzellstatus nicht (mehr) als statisch definiert, vielmehr können GSC in Abhängigkeit multipler Faktoren dynamisch verschiedene zelluläre Zustände zu verschiedenen Zeitpunkten besetzen. Die

Interkonversionen zwischen diesen Zuständen erfolgen dabei dynamisch und werden durch externe Faktoren wie das Microenvironment, Hypoxie, Bestrahlung und weitere beeinflusst; die interne Regulation dieses dynamischen Potenzials erfolgt über die genetische und epigenetische Ausstattung [36, 301]. Dabei weisen die Zustände verschiedene genetische Regulationen und daher Genexpression und Transkriptome in der scRNA-Seq auf, aber auch Unterschiede im Phänotyp und im Wachstumsverhalten [301]. Diese Dynamik trifft dabei nicht nur auf GSC zu, sondern auch auf die restlichen GB-Tumorzellen. Bemerkenswerterweise nehmen sie zelluläre Zustände in einem kontinuierlichen Spektrum auf dem Stammzell-Differenzierungs-Pfad ein [301, 307]. Die klassisch-binäre Einteilung in GSC und Nicht-GSC verliert damit an Bedeutung, während fließende Übergänge zwischen den Pools der GSC und anderen Tumorzellen bestehen. In diesem dynamischen Netzwerk nehmen GSC die zentrale Rolle ein, die durch transkriptionelle Fluktuationen verschiedene Mikrozustände besetzen [36]. Durch diesen ständigen dynamischen Fluss wirkt sich die Multipotenz von GSC aus, da sie den verschiedenen Zuständen entsprechende Tochterzellen entwickeln, die sich differenzieren [36]. Diese behalten ein dynamisches Potenzial bei, was jedoch eingeschränkt ist, da ihr Transkriptionsprofil diskreter wird und weniger Gene exprimiert [36, 308]. Überdies kann dieses Modell das Verständnis von der ausgeprägten intratumoralen Heterogenität von GB und GSC erweitern, da Phänotyp und Genexpression entsprechend den beschriebenen (Mikro-)Zuständen variieren und diese Heterogenität durch ständigen dynamischen Wechsel aufrechterhalten wird [36, 309, 310].

Als konkrete Anwendung dieses Modells konnten Suvà et al. (2020) (basierend auf scRNA-Seq-Daten) für GB mit IDH-Wildtyp vier verschiedene zelluläre Zustände definieren, die bestimmten Entwicklungsstufen im Stammzell-Differenzierungs-Pfad zugeordnet werden können. Diese beschreiben einen Zellzustand, der mesenchymal, stammzell-, oligodendrozyt- oder astrozytähnlich ist [299]. Bis auf den letztgenannten konnten Zellen aller Zustände Tumore erzeugen, was ein wichtiges GSC-Kriterium ist [299]. Weiterhin wiesen GB-Zellen aller Zellzustände ein hohes Maß an Plastizität auf, indem der nach sekundärer Transplantation erzeugte Tumor die verschiedenen zellulären Zustände des ursprünglichen Tumors aufwies, was das oben genannte Konzept der dynamischen Interkonversionen bekräftigt [299]. Häufig zur Isolierung von GSC verwendete Oberflächenmoleküle zeigten eine starke Affinität zu einem dieser vier Zellzustände, sodass verschiedene GSC-Marker am ehesten verschiedene GSC-Populationen bzw. -Zellzustände identifizieren (s. 2.5.5) [299].

Resümierend deuten jüngste Erkenntnisse im Hinblick auf die Komplexität von GB im Allgemeinen und der Funktion von GSC im Speziellen auf die Notwendigkeit, sich von vereinfachenden, starren Modellen hin zu komplexeren Modellen zu bewegen, die die Dynamik und Plastizität von GSC berücksichtigen, um ein akkurateres Verständnis von diesen zu erreichen. GSC nutzen das beschriebene dynamische Netzwerk um auf Störungen, wie therapeutischen Eingriffen, zu reagieren, wobei womöglich eben jene Mechanismen therapeutisch nutzbar gemacht werden können [36, 299]. Wichtig anzumerken ist der Einfluss der Wechselwirkung zwischen Tumormilieu und GSC auf ihre Funktion und ihren Zellzustand.

### 2.5.4 Tumormicroenvironment und Tumornischen

Das Tumormilieu, das sog. Tumormicroenvironment (TME), ist sowohl für Glioblastome allgemein (s. 2.4.2) als auch für GSC als Subpopulation von entscheidender Bedeutung für das Tumorstadium, die -pathophysiologie und die Therapieresistenz. Es bildet mit den Tumorzellen ein komplexes, funktionelles Netzwerk und besteht aus den nichtmalignen Elementen, die in GB auf zellulärer Ebene glioma-assoziierte Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen, Astrozyten und Perizyten der Endothelien ausmachen, und weitere Faktoren wie hypoxische und nährstoffarme Konditionen umfasst [37, 311].

Innerhalb des TME lassen sich Nischen ausmachen, die die höchste Dichte an GSC aufweisen und parallel in GB existieren [37]. Sie werden als perivaskuläre, hypoxische und invasive Nischen bezeichnet [312]. Jede dieser Nischen bildet eine verzweigte und vielfältige Wechselwirkung mit den zugehörigen GSC aus. Hierdurch werden über Beeinflussung des molekularen und phänotypischen Profils und über Signalwege und -moleküle bestimmte

zelluläre Programme und Zustände in GSC aktiviert und gefördert, sodass die Heterogenität und Stammzeleigenschaften dieser aufrechterhalten werden und wodurch das TME selbst remodelliert wird [36, 37, 222]. Durch die komplexen Wechselwirkungen dieser funktionellen Einheiten aus TME/Nischen und GSC bzw. GB-Zellen allgemein und die Interaktion dieser Einheiten miteinander wird die Therapieresistenz potenziert.

Perivaskuläre Nischen entwickeln sich entlang des Blutgefäßsystems, wo GSCs in direktem Kontakt mit den Endothelzellen stehen [37]. Über die Endothelzellen werden embryologische Signalwege wie Notch und Sonic Hedgehog aktiviert, die für das Wachstum und die Expansion der GSC intrinsisch sind und ihren stammzellähnlichen Phänotyp fördern, wobei Letzterer auch durch den Signalweg von TGF $\beta$  aufrechterhalten wird [30, 36]. Das perivaskuläre Wachstum von GSC resultiert wiederum in verstärkter Angiogenese, da GSC hohe Konzentrationen an angiogenesefördernden Signalmolekülen wie VEGF exprimieren und damit die endotheliale Proliferation, Migration und Permeabilität fördern [36, 37]. Das Ungleichgewicht zwischen dem schnelleren Wachstum des GB und dem der Blutgefäße führt zu nekrotischen Arealen, die histologisch von perinekrotischen Pseudopalisaden umgeben sind [37]. In dieser perinekrotischen Umgebung erwachsen hypoxische Nischen, in denen GSC so moduliert werden, dass sie die Hypoxie nicht nur tolerieren, sondern gar durch sie in ihrem Überleben, Wachstum und ihrer Therapieresistenz begünstigt werden [37, 313]. Aus diesem Grund sind hypoxische und nekrotische Areale pathognomonisch für GB (s. 2.1.2). Durch die Adaption an den hypoxischen Stress können jene GSC unter nährstoffarmen Konditionen überleben und werden womöglich in einen Ruhezustand versetzt, der zu ihrer Therapieresistenz beiträgt [36, 314]. Das Selbsterneuerungs- und Stammzellpotenzial der GSC wird aufrechterhalten und sie werden zu einem invasiven Wachstum animiert [315, 316]. Im Wesentlichen werden die Effekte der Hypoxie über HIF-1 und HIF-2 vermittelt, die ferner zu einer verstärkten VEGF-Bildung führen und durch Angiogenese die perivaskuläre Nische regenerieren [36, 317].

In der invasiven Nische (als dritte Nische) werden solche Signalwege in GSC hochreguliert, die die Invasivität verstärken und diffus infiltrierendes Wachstum fördern, wie z. B. L1Cam und Ephrin-B2 [36]. Durch das gesteigerte invasive Potenzial dieser GSC führen sie trotz maximal sicherer Resektion nahezu immer zu einem Rezidivtumor über die Resektionsgrenzen hinweg [36, 318]. Dabei wandern diese GSC anhand von Cadherinen und Integrinen entlang den Blutgefäßen und den Bahnen der weißen Substanz und bahnen sich ihren Weg durch die extrazelluläre Matrix mit Hilfe von Matrix-Metalloproteasen [36]. Dieser invasive Phänotyp wird durch Signalübertragungen aus den hypoxischen und perivaskulären Nischen gefördert, was veranschaulicht, wie Unterschiede im TME und zellulärem Zustand die dynamische Heterogenität von GSC erhalten und verstärken [36]. Durch die Diversität der GSC-Subpopulationen steigt die Wahrscheinlichkeit, dass eine beliebige Subpopulation eine (wie auch immer geartete) Therapie überleben wird und die anderen Subpopulationen regeneriert [36, 309]. Zugleich verhindert die oben beschriebene Restitution von Tumornischen durch die anderen die vollständige therapeutische Eliminierung eines bestimmten Nischentyps [3]. Somit kann lediglich eine Verschiebung hin zu einer bestimmten Tumornische erreicht werden (wie der hypoxischen, die durch die Radiochemotherapie verstärkt wird), die wiederum die anderen regeneriert [312].

### **2.5.5 Phänotypische GSC-Marker**

Entsprechend des klassisch-hierarchischen Modells und der binären Einteilung von Glioblastomzellen in GSC und Nicht-GSC wurde intensiv nach GSC-differenzierenden Merkmalen gesucht, die methodisch zugänglich waren, um diese Lebendpopulation zu isolieren und charakterisieren zu können [280]. Zur Orientierung dienten dabei essentielle GSC-Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Tumorinitiation, um damit assoziierte Marker zu identifizieren [280]. Die zur Identifizierung von GSC verwendeten Marker wurden von physiologischen Neuralstammzellen übernommen und basieren daher auf dem Verständnis der normalen Stammzellbiologie, auch wenn die Verknüpfung umstritten bleibt [35, 280]. Daher markieren viele Transkriptionsfaktoren und Strukturproteine beide Zelltypen, wie SOX2, OLIG2, MYC, BMI1 und Nestin [280, 284, 319-321]. Tatsächlich standen jedoch

Oberflächenmoleküle bzw. -marker im Fokus, da diese methodisch zugänglicher sind, um Lebendzellen zu isolieren. Zu den Prominentesten gehören CD133, CD15, Integrin- $\alpha$ 6, A2B5 und CD44, die die Interaktion zwischen der (Tumor-)Zelle und dem Microenvironment vermitteln [280].

Der erste anerkannte GSC-Oberflächenmarker war CD133, ein Plasmamembran-Glykoprotein, das insbesondere in neuralen Stammzellen exprimiert wird [285]. CD133-positive GB-Zellen wiesen die Kapazität zur Selbsterneuerung über die Fähigkeit, Tumorsphären zu bilden, auf und waren dazu fähig, einen (neuen) Tumor zu erzeugen nach ihrer Sekundärtransplantation [284, 285]. Weiterhin nahm der Expressionsgrad von CD133 mit dem Grad der Zelldifferenzierung ab, sodass sich CD133 als wichtiger GSC-Marker etablierte [322].

Weiterhin wurde CD15 (SSEA1) als GSC-Oberflächenmarker untersucht. Gliomzellen mit CD15-Expression erfüllten die oben definierten GSC-Voraussetzungen durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und multipotenten Differenzierung sowie zur Tumorerzeugung [35]. Ferner zeigten CD133-positive GSC eine Co-Expression von CD15 [323]. Ähnliche Erkenntnisse zur Proliferationskapazität und zum tumorinitiierenden Potential konnten im Hinblick auf Integrin- $\alpha$ 6 und A2B5 als GSC-Marker gewonnen werden [324, 325].

Die Auswahl oben genannter und anderer (Oberflächen-)Marker zur Identifizierung von GSC bleibt jedoch trotz intensiver Forschung umstritten. So herrscht eine große Kontroverse über die Relevanz und Bedeutung von CD133, das zwar eine hohe Spezifität, aber eine geringe Sensitivität besitzt. So wiesen zum einen 40 % der GB-abgeleiteten Proben keine CD133-positiven Tumorzellen auf und zum anderen besaßen jene CD133-negativen Tumorzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Tumorerzeugung nach Sekundärtransplantation und bewiesen damit ihr tumorigenes und Stammzellpotenzial [35, 36, 324, 326]. Erschwerend kommt hinzu, dass die CD133-Expression durch den Zellzyklus und durch die Interaktion mit dem Microenvironment unterschiedlich reguliert werden kann [280, 327]. Diese Erkenntnisse zeigen, dass CD133 als GSC-Marker zum einen nicht universell ist und zum anderen eine Falsch-Negativrate aufweist [280]. Auch die anderen erwähnten Marker sind nicht exklusiv in einer spezifischen GB-Population exprimiert, sondern bergen eine hohe Falsch-Positivrate [35, 280].

Resümierend wird damit die Schwierigkeit offenkundig, binäre, spezifische wie sensitive GSC-Marker oder eine zielführende Kombination von ihnen ausfindig zu machen [36]. Möglicherweise kann zukünftig eine solche Kombination identifiziert werden, die GSC von Nicht-GSC zuverlässig differenzieren kann [36]. Das wahrscheinlichere Szenario ist, dass kein, für alle GSC universeller Marker existiert, sondern dass die Tumorstammzellbiologie von GSC entsprechend dem oben beschriebenen dynamischen Netzwerk-Modell verstanden werden muss [280]. Diesem entsprechend offenbaren GSC durch den reversiblen Übergang zwischen vielen Mikrozuständen (über transkriptionelle Fluktuationen) eine unterschiedliche Expression von Markern in Abhängigkeit von ihrem Microenvironment und bilden damit eine dynamische, aber heterogene Population [36]. Dies unterstützend konnten scRNA-Seq einen Gradienten für die Expression von Stammzellmarkern zwischen einzelnen Tumorzellen nachweisen [36, 307]. Bekräftigt wird dies durch die Analyse von scRNA-Seq-Daten durch Suvà et al. (2020), die eine starke Affinität von GSC-Markern zu definierten Zellzuständen zeigte (s. 2.5.3) [299]. So zeigten GB-Zellen im stammzellähnlichen Zustand eine besonders hohe Expression von CD24, während der oligodendrozytähnliche Zustand insbesondere eine CD133-Expression aufwies [299]. CD44 markierte vor allem den mesenchymalen Zellzustand und Nestin dominierte in astrozytähnlichen GB-Zellen [299]. Resümierend isolieren damit unterschiedliche GSC-Marker am ehesten bestimmte zelluläre (Mikro-)Zustände, sodass kein GSC-Marker universell alle Zustände markieren könnte [299].

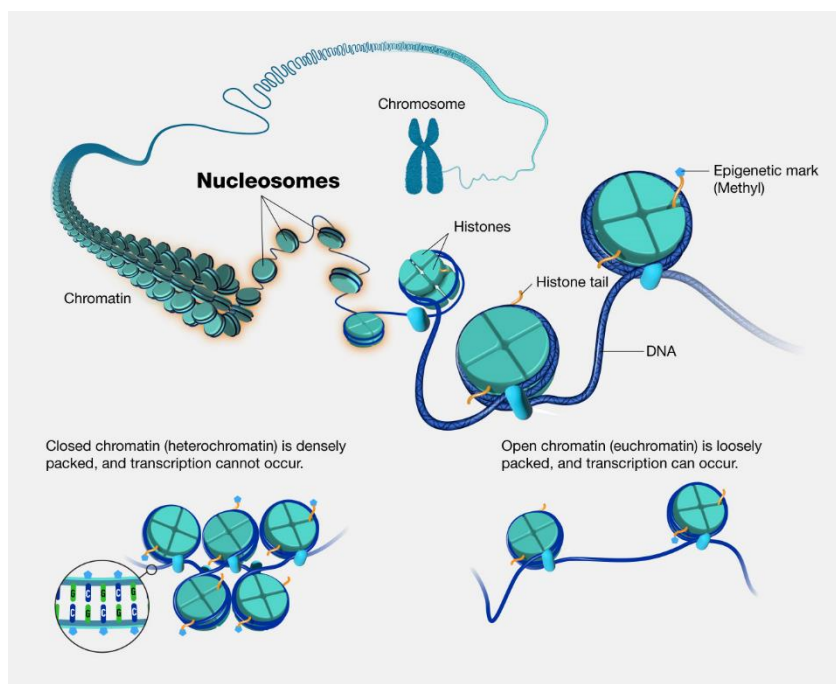
Bemerkenswert ist zunehmende Relevanz von ALDH1A3, das sich in jüngeren Studien zunehmend als GSC- wie prognostischer Biomarker etablierte. Es ist eine Isoform der Aldehyddehydrogenase (ALDH)-Enzymfamilie, die metabolische Funktionen in der Glykolyse wie Gluconeogenese übernimmt [208]. Sie ist signifikant hochreguliert im mesenchymalen

Subtyp der GSC, in dem sie die GSC-Stammzellkapazität fördert und erhält [208, 328, 329]. Diese mesenchymalen GSC sind üblicherweise CD133-negativ und weisen mit ALDH1A3 einen sensitiven wie spezifischen Biomarker auf, der zeitgleich eine prognostische Bedeutung hinsichtlich Tumorprogression und Therapieresistenz trägt [208, 328]. So weisen die ALDH1A3-Expression und die ALDH1A3-abgeleitete molekulare Signatur eine inverse Korrelation mit dem Gesamtüberleben der Patienten auf [328, 330]. Aufgrund dieser Merkmale etabliert sich ALDH1A3 zunehmend als diagnostischer wie prädiktiver Biomarker in der GSC-Forschung [328].

Als weiterer prognostischer wie diagnostischer und zugleich gut etablierter Biomarker dient der IDH-Status, der von höherer prognostischer Relevanz als der histologische Grad ist [331]. So weisen GB mit IDH-Wildtyp eine signifikant schlechtere Prognose hinsichtlich Gesamtüberleben auf als GB mit IDH1/2-Mutationen [331, 332]. Wie in 2.3.1 beschrieben, kommen in GB dabei insbesondere Punktmutationen im IDH1-Gen auf mit der Folge einer auffälligen DNA-Hypermethylierung vieler Genloci, die entscheidend an der Onkogenese dieser (sekundären) GB beteiligt ist.

### 2.5.6 Epigenetische Mechanismen in GB und GSC

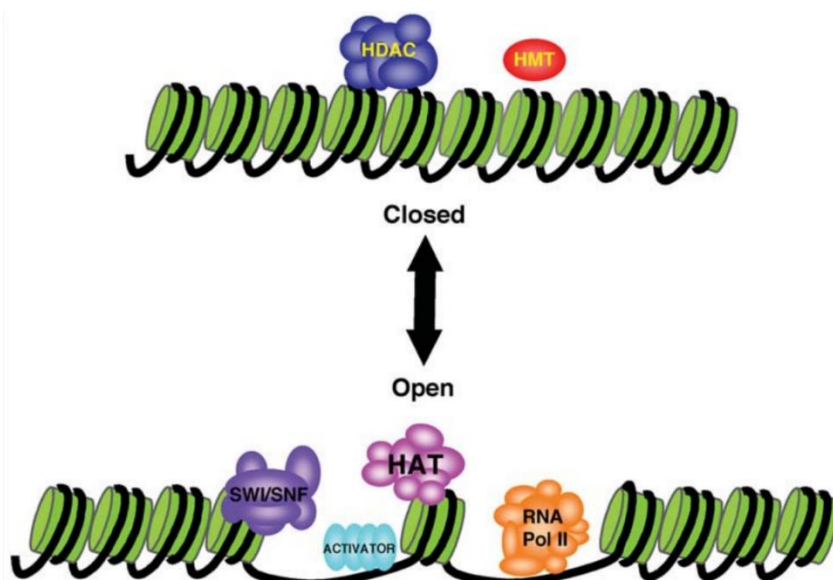
Die Transkriptionsrate von Genen hängt direkt von der Chromatinstruktur ab, die sich dynamisch verändert. Dabei entspricht das sogenannte "offene" Chromatin transkriptionell aktiven Regionen im Genom; hier weist die DNA einen geringeren Grad an Kondensation auf. Im Gegensatz dazu führt eine Verdichtung des Chromatins zu einer verringerten oder gehemmten Transkription. Die Lockerung oder Straffung des Chromatins ist ein hochgradig regulierter Prozess, der von einer komplexen Maschinerie genomverändernder Enzyme gesteuert wird, die auf DNA oder Histone abzielen und dadurch den Kondensationsgrad des Chromatins modulieren (Abbildung 9 zeigt schematisch die Struktur des Nucleosoms, Abbildung 10 zeigt die Auswirkungen von Histon- und DNA-Veränderungen auf die Struktur des Chromatins).



### Abbildung 9: Chromatin-Aufbau und Kondensationsgrad

Chromatin als Organisationsstruktur der DNA besteht in seinen Einheiten aus Nukleosomen, die einen Komplex aus DNA und DNA-bindenden Histonproteinen darstellen [10]. Sie dienen der Verdichtung der DNA, wobei der Grad der Verdichtung direkt mit dem Grad der Expression der jeweiligen DNA-Abschnitte korreliert. Während Euchromatin als „offenes“ Chromatin mit gelockelter Konformation eine Aktivierung der Genexpression ermöglicht, wird diese durch das dicht verpackte Heterochromatin herunterreguliert oder gehemmt [16]. Quelle der Abbildung: [17]

Als einer der wichtigsten epigenetischen Modifizierungen dient allgemein die Methylierung der DNA über DNA-Methyltransferasen (DNMT). Diese katalysieren die kovalente Bindung einer Methyl-Gruppe an die Cytosin-Base (an der C5-Position), hauptsächlich wenn auf diese eine Guanin-Base folgt (5'-Cytosin-phosphat-Guanin-3' (CpG)), sodass 5-Methylcytosin („5mC“) entsteht [333]. Die Häufung dieser Dinukleotid-Sequenz als sog. CpG-Inseln kommt typischerweise in oder nahe von Promotoren vor, die der Transkriptionsregulierung der ihnen nachgeschalteten Gene dienen [334]. Die meisten CpGs im Genom sind methyliert, jedoch innerhalb von CpG-Inseln physiologisch unmethyliert [335]. Durch diese DNA-Methylierung können Gene (durch Transkriptionshemmung) inaktiviert und genomische Stabilität gewahrt werden [336]. Die Gen-Inaktivierung erfolgt einerseits über die Torpedierung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an diese Regulationselemente der DNA (über die Methylgruppen), andererseits werden sog. Methyl-CpG-Bindeproteine rekrutiert (MBD) [337, 338]. Diese Proteine können spezifisch an die methylierte DNA binden und durch Interaktion mit weiteren Enzymen und Regulationsfaktoren eine Chromatin-Verdichtung und damit eine Repression von Genen bewirken [337, 338]. Die DNMT unterscheiden sich dabei in ihrem Wirkungsspektrum. Während DNMT3A und DNMT3B für die de-novo-Methylierung von Cytosinbasen verantwortlich sind, werden diese etablierten Methylierungsmuster durch DNMT1 aufrechterhalten [335]. Entsprechend hat eine Demethylierung von Promotorregionen eine Aktivierung der Expression von nachgeschalteten Genen zur Folge, ein Prozess, der entweder passiv in Abwesenheit von DNMT1 oder aktiv über sog. TET-(Ten-eleven translocation)-Enzyme erfolgt [339].



### Abbildung 10: Regulation der Chromatinstruktur

Veränderungen im Kondensationsgrad des Chromatins bedingen einen erleichterten oder erschwerten Zugang der Transkriptionsmaschinerie zur DNA. Sie unterliegen einer komplexen Regulation über genomverändernde Enzyme, die Modifikationen der DNA und der Histone vornehmen können [12]. Eine Deacetylierung von Histonen über Histon-Deacetylasen (HDAC) wie ihre Methylierung über Histon-Methyltransferasen (HMT) an spezifischen Stellen bedingen eine höhere Verdichtung und damit das „geschlossene“, inaktive Heterochromatin [12]. Das „offene“, transkriptionell aktive Euchromatin wird reguliert und ermöglicht über Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren (Activator), ATP-abhängigen Umbaukomplexen (SWI/SNF) und Histon-Acetyltransferasen (HAT), wodurch der RNA-Polymerase II (RNA Pol II) der Zugang zur DNA ermöglicht wird [12]. Quelle der Abbildung: [12]

Zur epigenetischen Regulation tragen neben (Methyl-)Modifizierungen der DNA auch kovalente Modifikationen von Histonen entscheidend bei. Diese sind als DNA-bindende Proteine Teil der Organisationsform des Chromatins, dessen Grundeinheit die Nukleosomen darstellen [10]. Diese bezeichnen einen Komplex aus je einem DNA-Strang der Länge von 147 Basenpaaren und einem Histonoktamer mit jeweils zwei der Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4, wobei die DNA an die Histone gebunden ist und zu einem unterschiedlichen Grad verdichtet werden kann (zu geschlossenem Heterochromatin oder offenem Euchromatin) [335]. Diese Histone weisen eine C-terminale Domäne sowie einen N-Terminus auf, die über Histon-modifizierende Enzyme kovalent verändert werden können [335]. Hierbei umfassen Histon-modifizierende Enzyme u. a. Histon-Methylasen, -Demethylasen, -Acetylasen und -Deacetylasen. Über die Katalysierung dieser posttranslationalen Modifikationen wird eine dynamische Regulation der Chromatinkonfiguration und Transkriptionsaktivität über die Modifikation von unterschiedlichen Histon-Aminosäuren ermöglicht, die unterschiedliche Effekte zur Folge haben [340]. Dabei korreliert die Acetylierung allgemein mit einer offenen, transkriptionell aktiven Chromatinkonfiguration (häufig in Form von H3K27ac vorkommend), während eine Deacetylierung zu einer zunehmenden Chromatinverdichtung führt [341]. Die Methylierung von Lysinresten kann dagegen unterschiedliche Wirkungen entfalten [335]. So ist eine Trimethylierung von Lysin 4 des Histon 3 (H3K4) mit aktiver Transkription verbunden, während die Trimethylierung von H3K9 und H3K27 (zu H3K9me3 und H3K27me3) charakteristisch für eine Genrepression ist [335].

Dabei stechen als wichtiger Effektor der Genrepression auf globalem Level die Proteinkomplexe der Polycombkörper (PcG)-Proteine hervor [341]. Diese stellen multimere Komplexe dar, die an bestimmte DNA-Regionen (sog. PcG-Response-Elemente) binden und hierdurch die posttranslationale Modifikation von Histonen steuern [335]. Diese korrelieren dabei mit geschlossenen und damit inaktiven Chromatinzuständen [335]. Sie bilden dabei verschiedene Multiproteinkomplexe, sog. Polycomb-repressive-Komplexe (PRC), die unterschiedliche Aufgaben übernehmen. PRC2 katalysiert dabei über ihre katalytisch aktive Komponente EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) die Initiierung von Histonmodifikationen, wie der Trimethylierung von H3K27, die PRC1 rekrutiert und durch dieses stabilisiert wird [335, 341].

Nicht direkt die Chromatinstruktur beeinflussend, aber dennoch von entscheidender Bedeutung für die epigenetische Genregulation sind darüber hinaus Chromatinumbaukomplexe (sog. Chromatin remodellers) [335]. Sie verfügen über eine katalytische ATPase, über die sie den Chromatinumbau katalysieren und bestehen aus mehreren Unterfamilien, u. a. den SWI/SNF-ATPasen [335]. Dieses Chromatin-Remodelling bzw. -Umbau umfasst dabei die Neupositionierung von Nukleosomen und dabei die Positionsveränderung von Histon-DNA-Interaktionen [342]. Hierdurch wird ein geordneter Zugang von Transkriptionsfaktoren zu bestimmten Genen ermöglicht und reguliert [342]

Bei Karzinomen ist die epigenetische Umprogrammierung einer der wichtigsten molekularen Mechanismen, die an der Etablierung von Genexpressionsmustern beteiligt ist, die mit malignem Wachstum einhergehen. Bei Gliomen sind epigenetische Alterationen der Chromatinstruktur seit Langem als wichtiger Faktor anerkannt, die mit dem Grad der Aggressivität und der Therapieresistenz zusammenhängen. Sie umfassen Alterationen der DNA-Methylierung, kovalente Modifikationen von Histonen, Mutationen des Genoms mit konsekutiver epigenetischer Dysregulation und Remodellierung der Chromatinstruktur. Sie führen zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Aktivierung von Onkogenen, Deregulierung von Zellwachstum, -proliferation und -tod und stellen frühe Meilensteine in der Gliomagenese dar [341, 343].

### 2.5.6.1 DNA-Methylierung in Glioblastomen

Der DNA-Methylierungsstatus von GB ist im Allgemeinen durch eine genomweite Hypomethylierung gekennzeichnet, die in 80 % der GB vorkommt [344]. Sie variiert in ihrem Ausmaß von nahezu normalem Methylierungsgrad bis hin zu einer 50-prozentigen Reduktion dieses [345]. Dabei korreliert das Ausmaß der Hypomethylierung positiv mit der

Proliferationsrate mit GB [345]. Diese globale Hypomethylierung ist assoziiert mit genomischer Instabilität sowie Aktivierung und Expression von multiplen Genen, vor allem von Onkogenen, wodurch die Tumorprogression verstärkt wird [255]. Beispielsweise zeigten Etcheverry et al. (2010) die Hypomethylierung der Genpromotoren von ZNF217 (encoding zinc finger protein 217) und FABP7 (brain fatty acid binding protein 7), wobei Ersteres als Onkogen der Immortalität und Letzteres als neuronaler Migrationsfaktor der Invasivität von GB dient [346]. Weitere, in GB hochregulierte Onkogene infolge einer Hypomethylierung stellen TP73 und GLI3 dar [347]. Diese Hypomethylierung betrifft auch den physiologisch hypermethylierten Promotor des TERT-Gens. Folglich führt die Hochregulierung dieses zur Erhaltung der Telomere und unlimitierter Proliferationskapazität von GB [347]. Ebenso kann eine Hypomethylierung von DNMT-Promotoren (z.B. von DNMT3B) vorliegen, sodass folglich eine verstärkte Genexpression und DNMT-Synthese stattfinden. Diese katalysieren wiederum die Methylierung und damit Inaktivierung von (Tumorsuppressor-)Genen und verstärken damit Zellwachstum und -proliferation [348]. Insgesamt bleiben die molekularen Konsequenzen dieser globalen Hypomethylierung in GB nicht gut verstanden, auch wenn sie im Mausmodell ausreichen, um eine Tumorigenese zu initiieren [345].

Neben der Hypomethylierung liegt in GB auch eine ortsspezifische de-novo-Hypermethylierung vor. Diese tritt insbesondere an CpG-Inseln in Promotorregionen auf, die für die Transkriptionsregulation von Genen dienen, die diverse Funktionen in der Tumorigenese und Tumorprogression übernehmen, inklusive Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur, Apoptose, Angiogenese und Invasion [345]. Durch die Hypermethylierung werden diese Gene folglich herabreguliert. Zu diesen gehören die Gene von TP53, pRB und PTEN, die wie in 2.3 ausgeführt als Tumorsuppressoren fungieren, und ihre Inaktivierung die Gliomagenese (insbesondere in sekundären GB, s. 2.3) fördert [349-352]. Neben dem PI3K- und p53-Signalweg kann die epigenetische Regulation weiterer Signalwege alteriert sein. So ist der radioresistenzvermittelnde Wnt-Signalweg epigenetisch hochreguliert über eine aberrante Promotormethylierung von negativen Regulatoren (wie bspw. WIF1 und DKK1), ebenso der Ras-Signalweg über ein Gen-Silencing von RASSF1A [353]. Auch für andere Signalwege, wie für den Notch- und Hedgehog-Signalweg, bestehen Hinweise für eine epigenetische Dysregulation über Hyper- und Hypomethylierung [354].

Weiterhin kann auch das CDKN2A-Gen betroffen sein, dessen Produkte wiederum vorherig genannte Tumorsuppressoren aktivieren [355]. Epigenetische Herabregulierung über Hypermethylierung kann ferner Gene betreffen, die in dem Apoptoseweg (wie Caspase 8 zu ca. 57 %), der Zellmigration, der Zelladhäsion und Signaltransduktion (wie CD81 in 46,1 %) sowie negativer Proliferationsregulation involviert sind [346, 356-358].

Die größte Relevanz unter den Methylierungsmarkern in GB besitzt der Methylierungsstatus des MGMT-Genpromotors. Die Methylierung des MGMT-Promotors und daraus resultierende Stilllegung des MGMT-Gens sind das am besten charakterisierte epigenetische Ereignis, das mit der GB-Resistenz gegen eine alkylierende Therapie in Verbindung steht. Eine solche Promotormethylierung ist in 40 – 50 % der GB zu finden [150, 254, 359]. Dabei kommt sie in sekundären GB mit IDH1/2-Mutationen häufiger vor (mit etwa 75 %) als in primären GB mit IDH-Wildtyp (31- 36 %) [359, 360]. Der Mechanismus der TMZ-Resistenz durch MGMT wird in 2.4.2.3.1 diskutiert.

Grundsätzlich unterscheiden sich Glioblastome mit IDH1/2-Mutationen hinsichtlich ihres Methylierungsmusters von primären GB mit IDH-Wildtyp. Ihre gain-of-function-Mutationen im IDH1/2-Gen führen zu einer vermehrten Bildung von 2-Hydroxylglutarat, das als Onkometabolit  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängige Demythylasen hemmt und in der Folge zu einer Akkumulation von DNA- und Histonmethylierungen führt [361, 362]. Von großer Bedeutung innerhalb der gehemmten Demythylasen sind die TET-Enzyme, deren Inhibition zu einer DNA-Hypermethylierung von CpG-Inseln nahe Promotoren führt und damit einen epigenetischen Phänotyp G-CIMP (Glioma CpG island methylator phenotyp) charakterisiert [362]. Hierdurch werden (u.a. oben erwähnte) multiple Tumorsuppressorgene gehemmt. Diese Methylierung von CpG-Inseln kann allerdings auch Nicht-Promotorregionen stattfinden, wodurch die

Chromatinstruktur und infolge die Genexpression modifiziert werden [362]. Auch Enhancer-assoziierte CpG-Inseln können in IDH-mutierten GB methyliert sein [362, 363].

Durch die Kombination von Transkriptom-, Methylierungs- und Genanalysen konnten sowohl verschiedene Cluster (unter GB) mit bestimmten Methylierungsmustern identifiziert werden als auch eine Überschneidung zwischen diesen und den anderen Einteilungen gefunden werden, die auf den mRNA-Expressionsprofilen (s. 2.1.2) oder dem IDH-Genstatus (s. 2.3) basieren. Brennan et al (2013) definierten sechs Methylierungscluster, M1 bis M6 [94]. Cluster M1 und M2 sind vor allem im Mesenchymal-Subtyp vertreten, während Cluster M3 und M4 dominierend im Klassisch-Subtyp vorkommen [94]. Cluster M5 ist durch G-CIMP gekennzeichnet. Dieser hypermethylierte Cluster M5 ist vor allem im Proneural-Subtyp vorhanden und weist (in Übereinstimmung zu diesem Subtyp) nahezu immer IDH1/2-Mutationen auf [94]. Im Kontrast dazu war Cluster M6 relativ hypomethyliert und beinhaltete überwiegend GB mit IDH-Wildtyp vom Proneural-Subtyp [94].

Werden Methylierungsanalysen von GB und GSC mit ihrem molekularen Subtyp (d.h. Genexpressionsprofil) verglichen, so lassen sich subtypspezifische Methylierungsmuster finden. Dabei teilen sich GSC und GB-Zellen eine bimodale Verteilung aus hypo- und hypermethylierten Gen-Loci, die jeweils charakteristisch für einen molekularen Subtyp war [364]. Der Mesenchymal-Subtyp präsentiert dabei - sowohl in GSC als auch in GB-Zellen - vor allem hypermethylierende Ereignisse, während der Proneural-Subtyp insbesondere eine Hypomethylierung aufzeigt [364]. Diese spezifischen Methylierungsalterationen können dabei entweder gleichermaßen in GSC wie GB-Zellen gefunden werden oder spezifisch für jede dieser Populationen sein [364].

### 2.5.6.2 Histon-Modifikationen und -Mutationen in GB

In Glioblastomen ist die epigenetische Regulation alteriert über eine aberrante Aktivität von Histon-modifizierenden Enzymen [345]. So zeigt sich die Aktivität von den Histondeacetylasen (HDAC) 1, 2, 3 und 7 in Glioblastomen hochreguliert, die Aktivität von HDAC der Klasse II und IV dagegen herunterreguliert im Vergleich zu niedriggradigen Gliomen und normalem Hirnparenchym [365, 366]. Diese Herabregulierung der meisten HDAC mit zunehmendem Malignitätsgrad bedingt folglich eine vermehrte Histonacetylierung und eine höhere Transkriptionsaktivität. Dies könnte zum einen ein Grund für die bekannte Hochregulierung von Protoonkogenen in GB und zum anderen für die vermehrte Acetylierung von Histon 3 sein [365]. Die in vitro-Ausschaltung von HDAC in Glioblastomzellen durch HDAC-Inhibitoren verringerte die Zellproliferation erheblich und führte zu vermehrter Apoptose [361, 366]. Auch die Histonmethylierung ist in GB spezifisch hochreguliert. So ist das EZH2-Protein als katalytische Untereinheit des PRC2 in GB hochreguliert und führt zu einer vermehrten H3K27me-Modifikation an Promotoregionen [361]. Die Folge ist eine Transkriptionshemmung bspw. des PTEN-Gens als Tumorsuppressor, weshalb eine erhöhte EZH2-Expression in GB mit der Tumorprogression, -invasion und Tumorresistenz gegenüber TMZ assoziiert ist [361, 367]. Das BMI-1-Protein als Untereinheit des PRC1 ist an der Regulation der H3K27-Methylierung beteiligt. Es finden sich häufige Alterationen der Genkopieanzahl des BMI-1-Proteins mit einer höheren Frequenz in ca. der Hälfte der GB, während eine Gen-Deletion selten ist, aber mit einer schlechteren Prognose einhergeht [368].

Die PcG-Proteine tragen ebenso zur Tumorphysiologie von GSC bei. Durch ihre Histon-Modifikation wie Rekrutierung von DNMT führen sie zur Inaktivierung von Genen, deren Repression zur Malignität und Immortalität der GSC und Aufrechterhaltung ihrer Stammzellkapazität beiträgt: Tumorsuppressoren (wie programmed cell death protein 4 (PDCD4)), Gene zur Proliferationshemmung und Differenzierung (z.B. bone morphogenetic protein receptor 1B (BMPR1B)) und Apoptose-assoziierte Gene (wie Caspase 8) werden inaktiviert [369-372]. Ferner spielen in der epigenetischen Regulation von GSC bivalente DNA-Domänen eine wichtige Rolle. Diese Promotoren sind gekennzeichnet durch das gleichzeitige Vorhandensein von aktiven wie inaktivierenden epigenetischen Markierungen (meist Methylierung von Histon 3 an zwei Stellen, H3K4me3 und H3K27me3); ihnen nachgeschaltete Gene werden deshalb zwischen Aktivierung und Inaktivierung balanciert und können je nach

Zellphysiologie und Stimuli reguliert werden [369]. GSC zeigen den Verlust dieser Bivalenz in bestimmten Promotoren, was zur übermäßigen Aktivierung von Protoonkogenen und Transkription und Hemmung der Zelladhäsion führt [373]. Außerdem gelingt über die Interaktion von PRC2 mit diesen bivalenten Promotorregionen die Bewahrung des Stammzellpotenzials von GSC und die Blockade ihrer Differenzierung [363]. Weiterhin sind GSC mit der Aktivierung von Enhancern (durch Methylierung und Acetylierung von Histon 3 zu H3K4me1 und H3K27ac) assoziiert, die die Transkription von Genen regulieren, die in DNA-Reparatursystemen, TP53-Signalweg und Angiogenese involviert sind [349].

Über alterierte Histonmodifikationen hinaus finden sich in GB auch Mutationen in vielen Genen, die an der epigenetischen Regulierung beteiligt sind, auch wenn ihre Rolle in der epigenetischen Regulation ungeklärt bleibt. Hiervon betroffen sind Gene für HDAC2, HDAC9, Histonmethyltransferasen SET7, SETD7, MLL und MLL4 wie Histondemethylasen JMJD1A und JMD1B [345]. Charakteristisch und redundant auftretend in kindlichen Glioblastomen sind die Punktmutation im Histon-3-Gen an Stelle 27 und 34, mit einem Austausch von Lysin zu Methionin (mit Entstehung von H3K27M) und Lysin zu Valin/Arginin (mit Entstehung von H3G34V/R) [362]. Glioblastome mit einer dieser Mutationen stellen einen unterscheidbaren Subtyp mit spezifischen Charakteristiken hinsichtlich der molekularen Ausstattung, des anatomischen Auftretens und der Altersgruppe dar [374]. Sie zeigen ein charakteristisches epigenetisches Profil auf: GB mit H3G34V/R zeigen eine Hypomethylierung von DNA-CpG-Inseln, während GB mit H3K27M eine ausgeprägt niedrige Konzentration an H3K27me zeigen, da der häufig modifizierte 27-Lysin-Rest durch die Punktmutation ausgetauscht wird [374]. Die Folge ist eine Hemmung des EZH2 bzw. PRC2 durch die H3K27-Mutation und hierdurch eine weitreichende epigenetische Dysregulation [353, 361].

Die genannten epigenomischen Merkmale untermauern die Wichtigkeit der epigenetischen Umprogrammierung in der Tumorigenese von Glioblastomen, die bis dato nur wenig verstanden ist und weiterer Erforschung wie Verfeinerung bedarf.

### 2.5.6.3 Chromatin-Accessibility in GB und GSC

Die in 2.5.7.2 genannten Methoden ermöglichen die Untersuchung der sog. Chromatin-Accessibility („Chromatin-Zugänglichkeit“). Hierbei wird der Kondensationsgrad der Chromatinstruktur nicht anhand indirekter Marker wie der DNA-Methylierung oder Histonmodifikation bestimmt, sondern unmittelbar locuspezifisch ermittelt. Dies ermöglicht die genomweite Identifizierung und Kartierung von offenen, hochregulierten („hyperaccessible“) wie geschlossenen, herabregulierten („hypoaccessible“) Genarealen gleichermaßen [375, 376]. Dabei korreliert die Chromatin-Accessibility (Chromatin-Zugänglichkeit) mit dem Expressionsgrad der Genregionen und ist daher ein wichtiges Werkzeug, um tumorspezifische Biomarker wie regulatorische Genregionen zu identifizieren [377]. Dies ist besonders dann der Fall, wenn der epigenetische Status eines Gens nicht die entsprechenden regulatorisch-kovalenten DNA-Modifikationen aufzeigt. So war bspw. der Promotor des MLH1-Gens in einer GB-Population nicht methyliert, dennoch lag ein MLH1-Gensilencing durch eine verminderte Chromatin-Accessibility vor, welches mit einer Resistenz gegenüber TMZ assoziiert war; dementsprechend können Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit auftreten ohne begleitende Veränderungen der DNA-Methylierung [375].

Die Chromatin-Accessibility von GSC unterscheidet sich signifikant von restlichen GB-Zellen [378]. Entsprechend ihrer einzigartigen epigenetischen Regulation weisen sie eine differente Signatur von unterschiedlichen Genregionen mit redundant offener Chromatinstruktur (sog. Chromatin-Peaks) auf. Die Untersuchung der Chromatin-Accessibility kann daher dazu dienen, GSC-Subpopulationen innerhalb von GB-Zellen zu identifizieren [378]. Zum einen besteht hierbei eine Überschneidung der Chromatin-Peaks von GSC mit denen von Neuralstammzellen für Genregionen, die in der Aufrechterhaltung der Stammzellkapazität und Proliferation involviert sind [379]. Zum anderen weisen GSC hier ebenso viele exklusive Chromatin-Peaks auf, die bspw. mit biologischen Prozessen der Zellmigration und -motilität assoziiert sind, als Ausdruck eines tumorspezifischen Chromatin-Zustandes [379]. Innerhalb

dieser Chromatin-Landschaft weisen GSC jedoch – gemäß der Heterogenität von GB - eine große intertumorale Heterogenität auf mit nur geringer Überschneidung der Chromatin-Peaks [378, 380]. Jedoch zeigen die anhand der Chromatin-Peaks erstellten epigenetischen Signaturen hier zum Teil eine Schnittmenge mit den zellulären GSC-Zuständen aus 2.5.3 und den molekularen Subtypen aus 2.3.3, als Hinweis, dass die Chromatin-Accessibility zur Identifizierung und Charakterisierung von GSC herangezogen werden kann [378]. Zuletzt können diese epigenetischen Signaturen als potenzielle prognostische Marker herangezogen werden, da ihr prädiktiver Charakter für das Gesamtüberleben von höherer Bedeutung als die TCGA-Klassifikation (anhand von Genexpressionsprofilen) war [380].

Ergänzend zur Signatur anhand von Chromatin-Peaks lassen sich GB-Zellen auch anhand ihrer Signatur von aktiven transkriptionell-regulatorischen Elementen, im Speziellen Enhancer, identifizieren [381]. Während hier eine große Übereinstimmung zum normalen Hirnparenchym herrscht, konnten tumorspezifische Enhancer für GB beschrieben werden [381]. Auch innerhalb dieser tumorspezifischen Signatur an regulatorischen Elementen bzw. Enhancern besteht eine große Heterogenität, mit einer stammzellassoziierten regulatorischen Subeinheit, die die GSC-Subpopulation in GB widerspiegelt und ihre Identität mitdefiniert [381, 382].

### 2.5.6.4 Longitudinale epigenomische Evolution von GB

Ungeachtet der multimodalen Therapie von Glioblastomen tritt ein Tumorrezidiv nahezu immer auf, das sich gegenüber etablierten Therapiemodalitäten weitgehendst resistent zeigt. Dieser Tumorprogress hin zu rekurrenten Glioblastomen, der unterschiedliche Resistenzmechanismen zur Folge hat, umfasst auch dynamische Veränderungen der Chromatinstruktur unter Einfluss der alkylierenden Therapie mit TMZ (wie Radiotherapie). Diese epigenetische Evolution von GB unter und ausgelöst durch die TMZ-Therapie ist ein wesentlicher Regulator ihres malignen Progresses und ihre Erforschung damit ein gewichtiger Bestandteil, die komplex gesteuerte Rezidivfähigkeit von GB zu verstehen [39]. Hierfür eignen sich insbesondere Längsschnittanalysen von abgestimmten Tumorproben (aus primären GB und rekurrenten GB nach der Erstlinientherapie), solche Kohorten sind jedoch selten und schwer zu erhalten. Studien, die molekulare und insbesondere epigenetische Profile von primären und rekurrenten GB vergleichen sind daher nur wenig zu finden [383, 384].

Rekurrente GB mit IDH-Wildtyp zeigen im Allgemeinen ein longitudinal stabiles Epigenom mit unverändert globaler Hypomethylierung auf [39]. Die intertumoral variierenden DNA-Methylierungsmuster bleiben weitgehend erhalten: Differenziell methylierte Genregionen in rGB im Vergleich zu nGB betragen weniger als 10 % [39, 383]. Hierbei scheint ein aggressiverer Phänotyp mit einer erhöhten epigenetischen Plastizität und vermehrter Änderung der DNA-Methylierung einherzugehen [383]. Unter diesen Genregionen mit Änderungen der DNA-Methylierung stechen bestimmte Promotorregionen hervor, deren Methylierungsänderung stark mit einer Tumorprogression assoziiert ist [383]. Sie zeigen dabei im Rahmen der Rezidivbildung einen Trend zum Gewinn oder Verlust der DNA-Methylierung auf, welcher zum Tumorprogress beiträgt und eine schlechtere Prognose bedingt [383]. Unter diesen Promotoren häufen sich solche mit Bindestellen für EZH2, das, wie in 2.5.6.2 angeführt, allgemein an der epigenetischen Dysregulation von GB und damit möglicherweise ebenso an der epigenetischen Evolution von GB beteiligt ist [383].

Promotoren mit veränderter DNA-Methylierung infolge des Progresses von GB zeigen einen Gewinn an Methylierung in Signalwegen, die in der neuralen Entwicklung und apoptotischen Prozessen involviert sind, als Hinweis für eine zunehmende Inaktivierung dieser Prozesse zur Erhaltung der Stammzell- wie Proliferationskapazität [383]. Hingegen zeigen sie einen Verlust an DNA-Methylierung im Wnt-Signalweg, dessen Hochregulierung folglich durch den Progress von GB verstärkt wird und damit seine Rolle hinsichtlich vermehrter Invasivität, Stammzellkapazität und Therapieresistenz [383]. Konkordant hierzu ist ein Methylierungsverlust an Wnt-Promotorregionen mit schlechterer Prognose verbunden [383]. Ferner untersuchten Garret et al. (2022) die Chromatin-Accessibility von abgestimmten GB-Tumorproben [385]. Sie wiesen nach, wie rekurrente GB nach der Erstlinientherapie eine deutlich und signifikant geringere Anzahl an Genregionen mit offener Chromatinstruktur

aufweisen als primäre GB [385]. Die Evolution von GB mit Zunahme an Malignität geht daher mit einer global zunehmenden geschlossenen Chromatin-Konfiguration einher als mutmaßliche Konsequenz der Erstlinientherapie [385].

Die bisherigen genspezifischen Untersuchungen der epigenomischen Evolution von GB beziehen sich auf die gut charakterisierte MGMT-Promotormethylierung. Hier zeigt sich bei ca. 62 bis 64 % der GB eine epigenetische Stabilität mit unverändertem Methylierungsstatus des MGMT-Gens auf [386-388]. Folglich weist ein relevanter Anteil von mehr als einem Drittel der GB einen neuen epigenetischen Status hinsichtlich des MGMT-Gens nach erfolgter Erstlinientherapie auf. Diese epigenetische Instabilität beinhaltet dabei sowohl den Gewinn einer MGMT-Promotormethylierung als auch den Verlust einer solchen. Mehrere Studien berichten hierbei übereinstimmend das häufigere Auftreten einer Demethylierung als den Gewinn einer Methylierung, sodass eine Tendenz zu einer therapieinduzierten Demethylierung des MGMT-Promotors besteht und folglich einer vermehrten Expression des MGMT-Gens [386-388]. Eine konkordante Höherregulierung der MGMT-Aktivität konnte tatsächlich in rekurrenten GB nachgewiesen werden, insbesondere nach erfolgter TMZ-Therapie, die konsekutiv in rekurrenten GB eine vermehrte Resistenz gegenüber TMZ vermittelt [388].

(Sekundäre) GB mit IDH1/2-Mutationen weisen dagegen eine differentielle epigenetische Evolution, die sich von GB mit IDH-Wildtyp unterscheidet. Bei initial hohem Level an DNA-Methylierung (im Vergleich zu primären GB) weist ein wesentlich höherer Anteil unter ihnen (bis zu 40%) einen therapieinduzierten globalen Verlust an DNA-Methylierung auf [39, 389]. Dieser Methylierungsverlust zeigt sich sukzessive progredient bis zu einem Niveau, das dem von GB mit IDH-Wildtyp ähnelt [39]. GB mit dem initialen epigenetischen Phänotyp G-CIMP mit hohem Anteil methylierter Promotorregionen weisen dabei einen progredienten Verlust dieser Promotormethylierungen auf, der einen zunehmend aggressiveren und mit ungünstiger Prognose verbundenen Phänotyp bedingt [39]. Dieser DNA-Methylierungsverlust ist durch einen zunehmenden Gewinn an H3K27ac in denselben Genregionen begleitet, was die epigenetische Aktivierung dieser Genregionen verdeutlicht, die eine zunehmende Expression von Onkogenen vermittelt [39]. Damit induziert die TMZ- und Radiotherapie durch progredienten Verlust an DNA-Methylierung eine epigenetische Evolution von GB mit IDH1/2-Mutationen hin zu einer globalen DNA-Hypomethylierung und einem Epigenom, das dem von GB mit IDH-Wildtyp ähnelt. Dies ist durch eine Zunahme an Malignität und Aggressivität verbunden, sodass sich ein IDH-Wildtyp-ähnlicher Phänotyp herausbildet [39].

Diese therapieinduzierten longitudinalen epigenetischen Veränderungen in GB verdeutlichen den Einfluss und die Wirkung der alkylierenden Therapie durch TMZ auf die Chromatinstruktur und die Entwicklung von rekurrenten GB mit unterschiedlichem epigenetischen Zustand. Dieser ist entscheidend für den Progress von GB und ihrer vermehrten Therapieresistenz und bedarf daher der weiteren und intensiven Erforschung. Angesichts der Schlüsselrolle, die GSC für den Progress von GB spielen, ist die spezifische Aufklärung der epigenetischen Mechanismen, die in GSC wirken, von besonderer Bedeutung für das Verständnis der Mechanismen der Therapieresistenz in GB.

### **2.5.7 Experimentelle Methoden zur Untersuchung von GSC**

#### **2.5.7.1 Immunphänotypisierung zur Erforschung des zellulären Status**

Die Immunphänotypisierung ist ein wichtiger Ansatz zur Charakterisierung der hierarchischen Position und/oder des zellulären Status von GB-Zellen, insbesondere von GSC. Der zugrundeliegende Gedanke ist, dass GSC eine inhärente phänotypische Plastizität besitzen, die eine grundlegende Eigenschaft aller Stammzellen ist. Die Fähigkeit von Stammzellen, zwischen verschiedenen zellulären Status zu wechseln, spiegelt sich normalerweise in der Veränderung des Immunphänotyps der Zellen wider, z. B. beim Übergang von einem weniger differenzierten zu einem stärker differenzierten Zustand. Die Expression von phänotypischen Markern neuraler Stamm- bzw. Progenitorzellen (Nestin, Vimentin, Sox2) ist ein gemeinsames phänotypisches Merkmal von GSC und ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit.

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunfluoreszenten Färbungen umfassen das oben genannte Protein Nestin. Es ist als Intermediärfilament Bestandteil des Zytoskeletts und verantwortlich für die mechanische Integrität von Zellen und ihrer Gewebsarchitektur und -regeneration [390, 391]. Es ist charakteristisch für neurale Stamm- und Progenitorzellen und wird wie oben beschrieben als Marker für GSC betrachtet [392]. Nestin-positive GSC bewiesen darüber hinaus eine höhere Proliferationskapazität [393].

Weiterhin wird das GFAP (Saures Gliafaserprotein, engl. glial fibrillary acidic protein) als astrozytärer und Differenzierungsmarker verwendet. Es ist das Haupt-Intermediärfilament im ZNS des Erwachsenen und damit ein charakteristischer Marker für reife Astrozyten [394]. Zudem wird es auch in neuronalen Stammzellen exprimiert [394, 395]. Seine allgemeine Aufgabe liegt als Intermediärfilament in der mechanischen Stabilisierung von Astrozyten und der Blut-Hirn-Schranke durch die strukturelle Organisation des Zellinneren, des intrazellulären (vesikulären) Transports und der zellulären Morphologie; Letzteres schließt die Motilität und Migration von Astrozyten ein [392, 394, 395]. Da GFAP insbesondere die ausgeprägten Verzweigungen von Astrozyten kennzeichnet, eignet es sich sehr zur Erforschung ihrer Morphologie [395]. Während der Differenzierung von Astrozyten werden die anfangs simultan exprimierten verschiedenen Intermediärfilamente größtenteils durch GFAP ersetzt [392]. GFAP-markierende immunfluoreszente Färbungen bilden daher Zellen mit einer sternförmigen Morphologie als differenzierte Astrozyten ab [394]. Bei pathologischen Prozessen kommt es im Rahmen einer reaktiven Gliose zu einer astrozytären Aktivierung, die sich vor allem durch eine Hochregulierung von GFAP auszeichnet [395]. Dagegen ist eine herabgesetzte GFAP-Expression mit der Bildung von Gliomen assoziiert und weiter verbreitet in hochmalignen Gliomen (wie Glioblastomen) und Astrozytomen, die höchstwahrscheinlich den dedifferenzierten Zustand dieser Zellen reflektiert [396].

Zuletzt fungiert Ki67 als Proliferationsmarker. Das Ki67-Antigen ist ein Nicht-Histonprotein, das im Nukleus vorkommt und an die DNA bindet [397]. Es wird in allen aktiven Zellzyklusphasen, aber nicht in der G<sub>0</sub>-Ruhephase exprimiert [398]. Daher dient es in immunfluoreszenten Färbungen als Proliferationsmarker, um die (aktive) Wachstumsfraktion einer Zellpopulation zu bestimmen [399]. Ermöglicht wird dies durch den Umstand, dass Ki67 sich während der Auflösung des Zellkerns in der Interphase an die Chromosomen anlagert [399]. Der Ki67-Index (als Anteil Ki67-positiver Tumorzellen) wird in einigen Tumorarten als prognostisches Werkzeug verwendet, während seine Rolle in Glioblastomen kontrovers diskutiert wird [398, 399]. Es bestehen Hinweise darauf, dass ein erhöhter Ki67-Index mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [397].

Die Immunphänotypisierung kann auf der Grundlage der Expression bestimmter Marker, die mit bestimmten zellulären Zuständen assoziiert sind, wichtige Erkenntnisse über den potenziellen Ursprung, die hierarchische Position oder den zellulären Zustand von GSCs liefern. Dieser Ansatz ist jedoch ungeeignet für die Bestimmung epigenetischer Veränderungen, die die Genexpressionsmuster verändern können, ohne den Phänotyp der Zellen zu verändern.

### 2.5.7.2 Experimentelle Methoden zur Charakterisierung von epigenetischen Zuständen

#### 2.5.7.2.1 Epigenetische Methoden für DNA-Methylierung

Zu den am besten charakterisiertesten epigenetischen Phänomenen zählen die DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und die Chromatinverdichtung, auch im Kontext der GB-Forschung. Diese Prozesse regulieren die Genaktivität dynamisch, ohne die zugrundeliegende DNA-Sequenz zu verändern [400]. In Anerkennung ihrer zunehmend verstandenen, zentralen Rolle in pathophysiologischen Prozessen und insbesondere genetischen Dysregulation von Tumoren wurden viele molekularbiologische Methoden entwickelt, um den epigenetischen Zustand von Zellen zu definieren.

Als Goldstandard, um den DNA-Methylierungsstatus zu ermitteln, dient die Bisulfit-Sequenzierung, aus der unterschiedliche Modifikationen erwachsen sind [401]. Da 5mC die häufigste Form der DNA-Methylierung darstellt, wird der Methylierungsstatus anhand der

Unterscheidung von methyliertem und unmethyliertem Cytosin bestimmt [401, 402]. Hierzu erfolgt die Behandlung genomischer DNA mit Natriumbisulfit. In dieser Bisulfit-Reaktion werden unmethylierte Cytosine zu Uracil desaminiert, während 5mC intakt bleibt [402]. In der nachfolgenden PCR-Amplifikation und DNA-Sequenzierung wird das zu Uracil konvertierte unmethylierte Cytosin als Thymin erkannt und daher mit Adenin gepaart, während das methylierte Cytosin als solches erkannt und regulär mit Guanin gepaart wird [401]. Durch den nachfolgenden Vergleich der DNA-Sequenz von behandelten und unbehandelten DNA-Proben können anhand dieser Cytosin-Thymin-Transition methylierte DNA-Regionen (mit 5mC) identifiziert werden [401, 402]. Durch eine anschließende Exom-Sequenzierung (sog. Whole-genome bisulfite sequencing) ist die Erforschung genomweiter Methylierungsmuster hiermit möglich [403].

Die Bisulfit-Sequenzierung eignet sich aber auch, um eine spezifische Methylierung eines Genlocus bzw. einer regulatorischen Region zu untersuchen. Nachfolgend kommen dabei verschiedene Analysemethoden zur Anwendung, die den Methylierungsstatus von ausgewählten CpG-Stellen bestimmen können. Hier kann eine sog. direkte Sequenzierung angewandt werden [401]. Hierbei wird die bisulfitbehandelte DNA über eine PCR-Amplifikation vervielfältigt, die Primer verwendet, die die CpG-Insel von Interesse eingrenzen [401]. Die amplifizierten DNA-Fragmente enthalten demnach methylierte wie unmethylierte DNA-Regionen und werden nachfolgend einer Sanger-Sequenzierung unterzogen, anhand derer (über die C-zu-T-Transition) un-/methylierte DNA-Stellen identifiziert werden können [404]. Als Alternative dient die sog. methylation-specific PCR (MSP), die im Rahmen der GB-Forschung zur Bestimmung der Promotermethylierung des MGMT-Gens häufig angewandt wird [405]. Hier werden (im Kontrast zur Methode der direkten Sequenzierung) zur PCR-Amplifikation spezifische Primerpaare verwendet. Diese sind entweder spezifisch für methylierte DNA (und binden nur hier) oder für unmethylierte DNA, sodass im Fall einer erfolgreichen Amplifikation je nach Primerpaar der Methylierungsstatus bestimmt werden kann [401, 406]. Vorteile dieser Methode sind insbesondere eine sehr hohe Sensitivität (bis zu 0,1% der methylierten Allele einer CpG-Insel) wie der Verzicht auf eine Sequenzierung [406]. Als weitere Alternativmethode kann eine Pyrosequenzierung an die Bisulfit-Behandlung und PCR-Amplifikation angeschlossen werden, die eine quantitative Bestimmung der DNA-Methylierung darstellt [401]. Durch die Signalintensitäten der hier eingebauten dGTP und dATP kann (durch den Vergleich von behandelter und unbehaltener DNA) der Cytosin- und Thymin-Gehalt bestimmt und damit der Methylierungsgrad für jede CpG-Stelle innerhalb der sequenzierten Region geschätzt werden [401]. Sie eignet sich gut für bspw. heterogene Tumorproben, wo nur ein geringer Zellanteil eine unterschiedlich methylierte Genregion aufweist [401].

### 2.5.7.2.2 Epigenetische Methoden für Chromatinmodifikationen und Chromatinstruktur

Modifikationen des Chromatins über Histon-Modifikationen oder chromatinbindenden Faktoren wie Transkriptionsfaktoren werden insbesondere an solchen Genregionen vollzogen, die regulatorische Elemente wie Promotoren und Enhancer darstellen. Zur ihrer Identifizierung und Quantifizierung stellt die Chromatin-Immunpräzipitation-Technik mit anschließender Sequenzierung (ChIP-Seq) die am häufigsten verwendete Methode dar [407]. Hierbei wird eine Quervernetzung zwischen der DNA und den DNA-bindenden Proteinen über eine Behandlung der Zellen mit Formaldehyd geschaffen und sodann eine Fragmentierung des Chromatins durch Ultraschallsonifikation erreicht [407]. Um die Identifikation derjenigen DNA-Fragmente zu ermöglichen, die ein bestimmtes DNA-bindendes Zielprotein aufweisen (wie bspw. eine bestimmte N-terminale Histon-Modifikation wie H3K27ac), werden spezifische Antikörper verwendet, die jenes Zielprotein markieren [408]. Die Quervernetzung der damit isolierten Chromatinfragmente wird aufgehoben und die DNA-Fragmente, die dementsprechend die regulatorische Region von Interesse aufweisen, können PCR-amplifiziert und folgend sequenziert werden [408]. Damit können locuspezifische Funktionen von DNA-Protein-Interaktionen untersucht werden, die die Chromatinstruktur und Genaktivität beeinflussen können [402]. Ferner können damit die Präsenz und Funktion von bestimmten regulatorischen Modifikationen kartiert werden [409]. Nachteilig bei der ChIP-Seq-Technik ist die starke Abhängigkeit der Methode von der Spezifität der verwendeten Antikörper und der

Effizienz der Chromatin-Fixierung; das zeitintensive Procedere wie der Bedarf an großen Zellmengen können limitierend sein [408].

Zur Bestimmung und Kartierung globaler Aktivität von regulatorischen Elementen auf genomweiter Ebene sind andere Techniken, wie DNase-Seq, MNase-Seq oder ATAC-Seq besser geeignet, da sie viele verschiedene Arten von regulatorischen Informationen in einem Assay erfassen können [408, 409]. Diese Techniken dienen der Bestimmung des Grades der Chromatinverdichtung als Maß für die Chromatin-Accessibility bzw. Chromatin-Zugänglichkeit. Diesen Techniken liegt zugrunde, dass aktiv regulatorische Elemente (aus Promotoren, Enhancer, Silencer und Isolatoren) eine offene Chromatinkonfiguration aufweisen über einen geringeren Verdichtungsgrad der Nukleosomen als in geschlossenen, inaktiven Chromatinregionen. Sie können daher durch eine regionale Überempfindlichkeit gegenüber Nukleasen identifiziert, die eine Destabilisierung der Nukleosom-Struktur an diesen regulatorischen Elementen darstellt [410, 411]. Aus diesem Grund ist die Identifizierung dieser nukleosomdepletierten Regionen ein sehr effektives Mittel um jene regulatorischen Elemente zu bestimmen [9].

Eine der ersten entwickelten Methoden hierfür war die DNase-Seq-Technik [400]. Hier wird die Endonuclease DNase I eingesetzt, die Doppelstrangbrüche einführt in DNA-Regionen mit offener Chromatinkonfiguration und die dementsprechend nukleosomdepletiert sind [400]. So entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, und über die Rangfolge der Fragmentlänge sowie die Sequenzierung dieser DNA-Fragmente kann auf die Position von Nukleosomen geschlussfolgert werden [400]. Damit können solche regulatorische Regionen identifiziert werden, die eine Hypersensitivität gegenüber DNase I aufweisen [400]. Limitierend bei der DNase-Seq-Technik ist die Notwendigkeit einer strengen gewebsspezifischen Enzymtitration wie der Bedarf an großen Zellmengen und das langwierige Protokoll [408].

Bei der verwandten MNase-Seq-Technik kommt die Endo-Exonuclease MNase zum Einsatz, die bakteriellen Ursprungs ist [412]. Sie erkennt unspezifisch DNA-Regionen ohne Proteinbindung (offenes Chromatin) und spaltet diese [408]. Geschlossene Chromatinregionen mit Nukleosombesetzung (und damit Bindung an Histonen oder Transkriptionsfaktoren) werden initial über Formaldehyd-Behandlung fixiert, während der enzymatischen Behandlung unverdaut zurückgelassen, über Ligandenbindung isoliert und folglich PCR-amplifiziert und sequenziert [408, 412]. Die MNase-Seq-Technik misst damit nukleosombesetzte Chromatinregionen und eignet sich zur genomweiten Kartierung von Nukleosompositionen [408].

Als alternative Technik zur Bestimmung der Chromatin-Zugänglichkeit dient die ATAC-Seq-Technik, die sich im Vergleich zu den letztgenannten Methoden durch einen geringen Bedarf an Ausgangsmaterial und einer kurzen Verarbeitungszeit auszeichnet [409]. Hierbei kommt die gentechnisch veränderte hyperaktive DNA-Transposase Tn5 zum Einsatz, die mit Sequenzierungsadaptern beladen ist [408]. Dieses Enzym erkennt offene, nukleosomdepletierte Chromatinregionen, spaltet diese und fügt dort ihre Sequenzierungsadapter ein [408]. Diese markierten DNA-Fragmente werden gereinigt, PCR-amplifiziert und mittels NGS sequenziert [408]. Als Resultat können über ATAC-Seq ähnlich wie bei DNase-Seq genomweite regulatorische Regionen erforscht und kartiert werden [409].

### 2.5.7.2.3 FAIRE-Seq zur Identifizierung aktiver regulatorischer Elemente

Viele der für die epigenetische Analyse entwickelten Methoden (wie ChIP) sind indirekt, da sie auf der Analyse posttranslationaler Modifikationen beruhen, die entweder mit dem transkriptionell aktiven oder dem transkriptionell inaktiven Zustand des Chromatins verbunden sind und in 2.5.6 erläutert werden.

Vor wenigen Jahren wurde eine neue Methode namens FAIRE (Formaldehyd-assistierte Isolierung regulatorischer Elemente) entwickelt, um direkt transkriptionell aktive Regionen im Chromatin zu identifizieren. Sie basiert auf dem Unterschied im Vernetzungsgrad zwischen DNA und Nukleosom-Proteinen, da die DNA in nukleosomdepletierten (aktiven) Regionen wie oben beschrieben viel weniger effizient an Proteine gebunden ist. Zuerst werden die Zellen

kurzzeitig mit Formaldehyd fixiert, sodass die DNA-bindenden Proteine mit ihr quervernetzt werden. Sodann werden die Zellen lysiert und ihre DNA durch Ultraschall aufgebrochen (sonifiziert). Das aufgebrochene Chromatin wird dann einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen [9]. Die (inaktiven) DNA-Fragmente, die mit Proteinen quervernetzt und kovalent gebunden sind, werden in die organische Phase aufgenommen, während sich in der wässrigen Phase nur proteinfreie DNA-Fragmente befinden. Diese proteinfreie DNA wird zuletzt aufgereinigt, quantifiziert und sequenziert [9]. Diese, durch FAIRE isolierten genomischen Bereiche korrespondieren gut mit Indikatoren für aktive regulatorische Elemente; die Methode eignet sich daher, um diese Elemente auf genomweiter Ebene zu identifizieren und zu kartieren [412, 413].

Die FAIRE-Methode zeichnen wichtige Vorteile als fähige Alternative zu anderen etablierten Verfahren wie Nuclease-Aktivitäts-Assay oder Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) aus. Hierzu gehören, dass keine Vorbehandlung der Zellen vor Fixierung und Quervernetzung durch Formaldehyd nötig ist, sodass der Zustand des Chromatins vor Formaldehyd-Gabe sehr wahrscheinlich festgehalten wird [413]. Ferner bietet FAIRE die Kontinuität eines chemisch-basierten Verfahrens, ohne eine Abhängigkeit von (der Variabilität und Genauigkeit von) Antikörpern zu besitzen oder von Enzymen (wie in DNase- und MNase-Seq), die in ihrer Konzentration und Inkubationszeit genau optimiert werden müssen [9, 413]. Auch können durch FAIRE zusätzliche regulatorische Elemente bestimmt werden, die in anderen Verfahren nicht erkannt werden, aber auch der umgekehrte Fall tritt ein [414]. Sie wird dazu verwendet, regulatorische Regionen zu identifizieren, die für den malignen Progress in Tumoren verantwortlich sind [412]

Eine Hürde kann die Interpretation der Ergebnisse darstellen, die technische und bioinformatische Ressourcen benötigt. Darüber hinaus weist FAIRE im Vergleich zu anderen Methoden ein geringeres Signal-Rausch-Verhältnis, weshalb die detektierten Stellen manchmal ein nur geringfügig höheres Signal als den Hintergrund aufweisen. Folglich sind das Design der Untersuchungsmethode (der isolierten FAIRE-DNA) und die Auswahl von Kontrollregionen entscheidend [9]. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass in der Behandlung mit Formaldehyd auch gebundene Transkriptionsfaktoren mit der DNA quervernetzt werden können und damit entfernt werden, sodass die Untersuchung von Transkriptionsprofilen nur eingeschränkt möglich ist [412].

Die FAIRE-Methode wurde bis dato für zahlreiche Zelllinien und -arten verschiedener Gewebe etabliert, jedoch nicht im Hinblick auf Glioblastom-abgeleitete Tumorstammzellen. Die bis dato einzig verfügbare Literatur stammt von Schmid et al. (2016) [415]. Sie wandten die FAIRE-Methode bei GSC an, die durch Dedifferenzierung aus Astrozyten entstanden sind durch die iatrogene Induktion von Drivermutationen. Die FAIRE-Ergebnisse beschreiben die Hochregulierung von stammzellassoziierten Genen (wie die der HOX-Familie) und die Herabregulierung von Astrozyt-assoziierten Genen [415].

Im Gegensatz zur Fülle von Daten aus der genomischen oder transkriptomischen Profilierung von GB und GSC sind epigenetische Profile von GB und GSC weniger systematisch charakterisiert. Die bisher erforschten epigenetischen (dysregulierten) Mechanismen hinsichtlich DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und Chromatinkonfiguration in primären und rekurrenten GB mit der größten Relevanz werden in 2.5.6 diskutiert. Es verbleibt daher eine wissenschaftliche Lücke in diesem Forschungsgebiet, die insbesondere die epigenetische Charakterisierung von GSC als Schlüsselement für die Progression von GB betrifft.

### **2.5.8 Die Rolle von GSC in GB-Therapieresistenz**

Die Evidenz zur führenden Rolle von GSC in der Formation, Erhaltung und Therapieresistenz von GB wächst kontinuierlich an. Sie nehmen im komplexen, dynamischen Netzwerk von GB wie vorherig beschrieben die zentrale Rolle ein und sind aufgrund der Variabilität ihrer genetischen Programme und ihrer Alterationen in der Lage, (radiochemisch-)therapeutischen Druck durch eine Vielfalt an Fluchtwegen zu umgehen und auch nach starker Dezimierung der

Tumormasse einen Rezidivtumor zu initiieren [36]. Zu diesen Resistenzmechanismen tragen auch in GSC intrinsische Faktoren wie ihre genetische Instabilität, Vielfalt der Signalwege, DNA-Reparatur, antioxidative Regulation und intratumorale Heterogenität bei, und ebenso wie in 2.4.2 und 2.5.4 beschrieben extrinsische Faktoren aus dem TME, der Bluthirnschranke und den interzellulären Interaktionen [37, 38]. Während in vorherigen Kapiteln die verschiedenen Mechanismen ausführlich erläutert wurden, wird im Folgenden der, für GSC spezifische Kontext der Therapieresistenz erörtert.

### 2.5.8.1 Radioresistenz von GSC und GB

GSC weisen eine signifikant größere Radio- und Chemoresistenz als die restlichen Glioblastomzellen ohne Stammzeleigenschaften auf. Verantwortlich hierfür sind vorherig beschriebene pathophysiologische Besonderheiten von GSC und nachfolgende Besonderheiten in ihrer Therapieantwort. Entscheidend hierfür sind ihre hypoxischen Nischen (s. 2.5.4), die die Regionen mit dem höchsten Hypoxie-Grad innerhalb von GB darstellen [109]. Zum einen vermindern sie die Effektivität ionisierender Strahlung. Zum anderen treiben sie GSC dazu an, über verschiedene zelluläre Prozesse Resistenz zu entwickeln, um in dieser nährstoffarmen Umgebung zu überleben und versetzen sie in einen Ruhezustand, der sie weniger anfällig für radioinduzierte Schäden macht als die restlichen stärker proliferierenden GB-Zellen [109, 416].

Der Einfluss der Hypoxie geht jedoch darüber hinaus. Sie fördert nicht nur die Erhaltung der Stammzellkapazität von GSC (s. 2.5.4), sondern auch die Zunahme des GSC-Phänotyps innerhalb von GB durch die Dedifferenzierung von GB-Zellen zu GSC [109]. Dies wird vornehmlich über HIF-2 $\alpha$  erreicht, der im Gegensatz zu HIF-1 $\alpha$  ausschließlich in GSC hochreguliert ist (s. 2.4.2.2.1). Dabei korreliert die Expression von HIF-2 $\alpha$  mit der von OCT4 (Octamer binding transcription factor 4) als wichtiger Stammzell-Transkriptionsfaktor, da HIF-2 $\alpha$  dieses aktiviert [417, 418]. Durch die Hypoxie-vermittelte Hochregulierung von OCT4 und ferner auch CD133 und SOX2 (sex determining region Y (SRY)- box 2) als essentielle Regulatoren von Selbsterneuerung und Differenzierung werden GSC-ähnliche Eigenschaften in GB-Zellen induziert und damit Radioresistenz vermittelt [27, 419].

Diese und weitere Stammzell-Transkriptionsfaktoren und -marker werden dabei ebenso durch die Strahlentherapie selbst hochreguliert. So induziert die erhöhte Expression von SOX2, Nestin, OLIG2, EZH2 (s. 2.5.5) und andere Transkriptionsfaktoren nach erfolgter Bestrahlung die Konversion und Dedifferenzierung von Nicht-GSC in GSC und erhöht damit das tumorigene Potenzial und die Tumoresistenz [109, 420]. Evident wird dies anhand der mehrfachen Vergrößerung der CD133-positiven Subpopulation von GB nach erfolgter Bestrahlung, die ihre erhöhte Radioresistenz in vivo und in vitro beweisen [279]. Gewichtigen Anteil an dieser Radioresistenz hat die erhöhte Aktivität der DNA-Schadensreparatur, durch welche radioinduzierte DNA-Schäden effektiver behoben werden als in den restlichen GB-Zellen [27]. Hierzu gehört die erhöhte Aktivierung von DNA-Checkpointkinasen (wie Chk1 und Chk2) und die Hochregulierung des in 2.4.2.2.2 beschriebenen PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs, der eine effizientere Reparatur von radioinduzierten DNA-Schäden einleitet [27, 279].

Zusätzlich zu den PI3K-AKT-aktivierenden genetischen Alterationen aus 2.4.2.2.2 sind in GSC embryologische Signalwege beteiligt an der größeren DNA-Reparaturkapazität. Sie sind maßgeblich an der Formation und Aufrechterhaltung der Stammzellkapazität von GSC beteiligt, fördern ihre Proliferation und Invasivität und verhindern ihre Differenzierung und Apoptose [245]. So ist der Notch-Signalweg an der Radioresistenz über seine aktivierende Regulation des PI3-AKT-Signalwegs (über seine Rezeptoren Notch1 und Notch2) beteiligt [421]. Auch der Sonic Hedgehog-Signalweg ist in GSC übermäßig aktiv [245]. Seinen Beitrag zur Radioresistenz vermittelt er über eine effizientere Aktivierung des nicht-homologen Endjoinings, wodurch radioinduzierte DSB weitreichender repariert werden können [422]. Auch ist das Membranprotein Smo (Smoothed) als Bestandteil des Sonic Hedgehogs-Signalwegs hochreguliert, das die DNA-Reparatur effizienter gestaltet durch die Aktivierung der Checkpointkinase Chk1 [423].

Der wichtigste nachgeschaltete Effekt der Checkpoint-Aktivierung besteht darin, den Zellzyklus anzuhalten, um beschädigte DNA zu reparieren, bevor die Zellteilung stattfindet [279]. In GSC ist hierfür der ATM/Chk2/p53-Signalweg entscheidend. Die ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated)-Kinase fungiert dabei als DNA-Schadenssensor und wird durch radioinduzierte Schäden, allen voran DSB, aktiviert [424-426]. Sie phosphoryliert die Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 sowie p53, die zu einem Zellzyklus-Arrest führen (über die Inhibierung Cyclin-abhängiger Kinasen) [427]. Chk2 führt weiterhin über die Aktivierung von BRCA1 und die Rekrutierung von Rad51 zu einer vermehrten DSB-Reparatur über homologe Rekombination [427]. Dieser hochregulierte Signalweg führt damit über eine weitreichende und effiziente Reparatur von therapieinduzierten DNA-Schäden zu einer selektiven Radio- (und Chemo-)resistenz von GSC im Vergleich zu restlichen GB-Zellen [245, 426].

### 2.5.8.2 Chemoresistenz von GSC und GB

Die in 2.3 detailliert beschriebenen genetischen Aberrationen und Mutationen in GB bilden die Grundlage der genetischen Instabilität von GSC. Unter ihnen stechen Mutationen von replikativen Kontrollpunkten wie p53, TERT, ATRX, NF1, CKN2A und RB1 hervor, durch die eine Mutationstoleranz und ein aberrantes, extensives Überleben von GSC ermöglicht werden [36]. Aufbauend hierauf sind GSC wie oben dargelegt durch eine hochregulierte DNA-Schadensreparatur charakterisiert, aus Checkpointkinasen (wie Chk1 und Chk2) und Reparaturenzymen (wie PARP1 und TIE2) [36, 428, 429]. Die Rolle des prognostisch wichtigen DNA-Reparaturenzyms MGMT (s. 2.4.2.3.1) in GSC wird kontrovers diskutiert. Zum einen wurden unterschiedliche Expressionsraten berichtet, zum anderen erhöht die MGMT-Expression die GSC-Resistenz gegenüber TMZ entscheidend [3, 430, 431]. So wurden in CD133-positiven GSC höhere MGMT-Expressionslevel gefunden, welche mit einem (hohen) Grad an Therapieresistenz korrelierten [432, 433]. Ein positiver MGMT-Expressionsstatus wurde insbesondere in GSC gefunden, die in hypoxischen Nischen lokalisiert waren [434]. Dies ist plausibel, da die hypoxische Umgebung die Stammzell-Kapazität der GSC in Form der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Tumorförderung verstärkt und aufrechterhält [133, 435]. Die verstärkte MGMT-Expression wird dabei über HIF-1 $\alpha$  vermittelt, der durch die Hypoxie hochreguliert wird [436]. Darüber hinaus werden die DNA-Reparatursysteme auch durch jene (embryologische) Signalwege hochreguliert, die ursächlich und bewahrend für den Stammzellstatus von GSC sind, wie der Notch-Signalweg [36]. Durch dieses Gleichgewicht von hochregulierter DNA-Schadensreparatur und genetischer Instabilität mit folgender Mutationstoleranz sind GSC in der Lage, auf therapeutischen Druck dynamisch wie plastisch zu reagieren [36].

Ferner konnte nach Behandlung mit TMZ sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine größere Anreicherung von GSC und damit eine Zunahme dieser Subpopulationen innerhalb der Tumormasse nachgewiesen werden [3, 437]. Dies kann durch die therapieinduzierte Selektion von GSC erklärt werden [225]. Allerdings wurde bei GB-abgeleiteten Zelllinien unter Chemotherapie eine allmähliche Zunahme von Stammzeleigenschaften beobachtet: Unter TMZ-Behandlung wurde die potenziell mögliche Dedifferenzierung von Nicht-GSC in GSC (s. 2.5.2) beschleunigt [133, 437, 438]. Die neu entstehenden GSC wiesen dabei ähnliche molekulare Marker sowie einen ähnlichen Phänotyp wie die elterlichen GSC in ihrer verstärkten Tumorförderung und Invasivität in GB-Xenografts auf [437]. Weiterhin zeigten diese neuen GSC hohe Expressionslevel an die oben erwähnten HIF-1 und HIF-2, sodass diese bei der Konversion von Nicht-GSC zu GSC eine wichtige Rolle spielen scheinen (s. 2.5.8.1), ebenso wie die angeführten Transkriptionsfaktoren SOX3, SALL2, OLIG2 und POU3F2 (s. 2.5.5) [437]. Diese Erkenntnisse untermauern das Modell der Plastizität des GSC-Status (s. 2.5.3) und deuten auf die verstärkte Stammzellkapazität von GB unter therapeutischem Druck durch TMZ [3, 133].

Ein weiterer Mechanismus, der in GSC Resistenz vermittelt, ist die Regulierung und Modulation des (verstärkten) Effluxes von zytotoxischen Substanzen (wie TMZ) aus der Tumorzelle heraus über die Hochregulierung von bestimmten ABC-Transportern, die sich Glioblastomzellen im Allgemeinen ebenso zunutze machen (s. 2.4.2). So werden durch den Transkriptionsfaktor SOX2 die ABC-Transporter ABCC3 und ABCC6 hochreguliert, die die

Chemoresistenz verstärken [30, 439]. Zugleich korreliert eine höhere Expression des ABC-Transporterprotein Multidrug-Resistance-Protein-1 (MDR-1) zum einen mit einer stärkeren Chemoresistenz von GSC (durch verstärkten TMZ-Efflux) und zum anderen ist MDR1 häufig koexprimiert mit CD133 in GB-Zellen, was seine Relevanz in GSC verdeutlicht [3, 133, 440, 441].

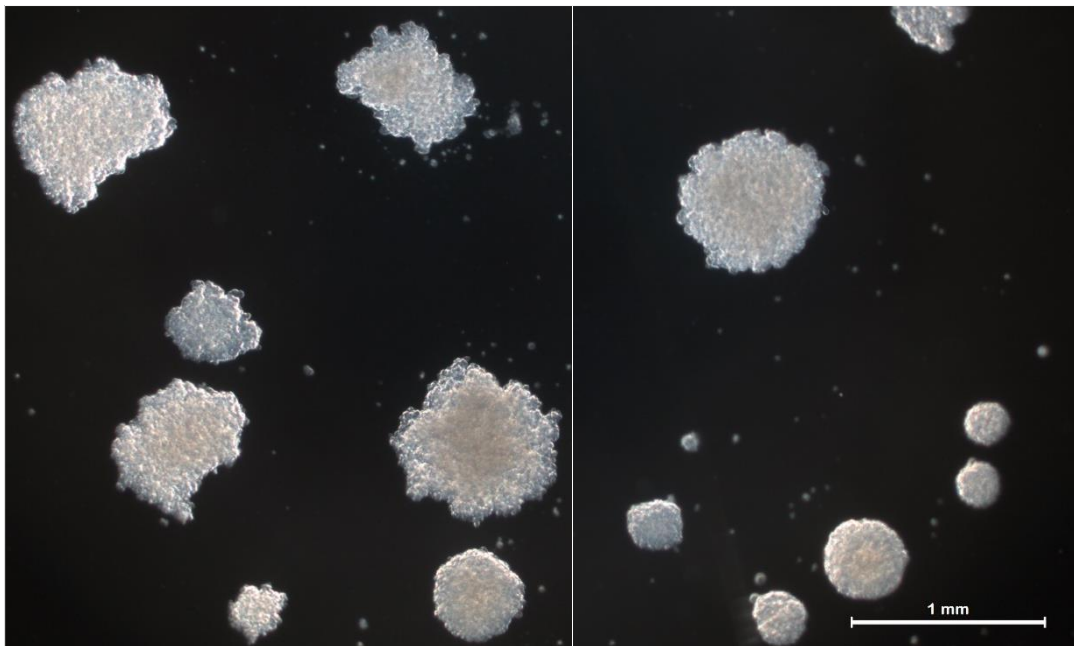
Gemäß den in 2.4.2.1 beschriebenen Modellen der linearen bzw. klonalen und der divergenten Evolution von rGB können diese (Rezidiv-)Muster longitudinaler genetischer Veränderungen bzw. Mutationen auch in (rekurrenten) GSC identifiziert werden, auch wenn solche GSC-spezifischen Studien aus den in 2.4.2.1 genannten und anderen Gründen eine Rarität darstellen. So konnten im paarweisen Vergleich von GSC aus nGB (nachfolgend primäre GSC genannt) und GSC aus den entsprechenden rGB in einer kleinen Stichprobe beide Muster nachgewiesen werden [442]. Der paarweise Vergleich in Bezug auf eine Vielzahl an tumorrelevanten Genen ergab drei Gruppen an rekurrenten GSC. Die erste Gruppe stimmte in jenen Genen vollkommen mit den primären GSC überein, sodass davon auszugehen ist, dass diese GSC-Populationen nicht (vollständig) durch die Therapie eliminiert wurden und das rGB durch Expansion bildeten [442]. Die zweite Gruppe an rekurrenten GSC folgte dem Muster der linearen bzw. klonalen Evolution, ging daher am ehesten aus den primären GSC hervor und akkumulierte neben den ursprünglichen genetischen Alterationen neue Mutationen [442]. Diese erworbenen Mutationen waren solche, die selten in nGB nachzuweisen sind und die charakteristisch für TMZ (d.h. gemäß eines TMZ-assoziierten Mutationsmusters) sind und daher wahrscheinlich durch TMZ induziert wurden [442, 443]. Die dritte Gruppe wies ebenfalls solche neuen, erworbenen Mutationen auf. Sie zeigte jedoch ein Mutationsmuster, das von dem der primären GSC divergierte, gemäß dem Modell der divergenten Evolution [443]. Die beiden letztgenannten Gruppen bewiesen darüber hinaus ihre größere Resistenz gegenüber der etablierten Radiochemotherapie im Vergleich zu den primären GSC [442]. Dies verdeutlicht zum einen, wie vorbestehende resistente GSC-Populationen durch den therapeutischen Druck selektiert werden, und zum anderen, dass rekurrente GSC phylogenetisch mit den primären GSC verwandt sind und auf lineare oder divergente Weise zusätzliche Mutationen erwerben können [442]. Der paarweise Vergleich als Ansatz zur Charakterisierung von rekurrenten GSC verbleibt eine große, wichtig zu schließende Forschungslücke.

Resümierend sind GSC zum einen durch die beschriebenen allgemeinen (s. 2.4.2) und spezifischen Resistenzmechanismen und zum anderen aufgrund ihrer plastischen und dynamischen Tumorarchitektur, die ihre genetische wie epigenetische und exprimierende Landschaft erweitert, in der Lage, multiple therapeutische Bedingungen zu tolerieren und zu überwinden. Durch ihre übergroße Heterogenität und die dynamischen Interkonversionen zwischen verschiedenen zellulären Zuständen und der Modulation dieser durch das TME bilden GSC mit ihrer (Tumor-)Umgebung ein redundantes System, das das Versagen einzelner Komponenten (durch die Behandlung mit einzelnen Wirkstoffen) tolerieren kann und lediglich Subklone bzw. spezifische Zellzustände eliminiert werden [36].

### 3 Materialien

#### 3.1 Zelllinien

Zur Selektion von Temozolomid- und strahlenresistenten GSC wurde die humane Glioblastom-abgeleitete Tumorstammzell-angereicherte Linie #1051 verwendet. Sie entstammt einem neu diagnostizierten Glioblastom, das nach der Tumor-Exzision in Kultur genommen wurde. Die Glioblastomproben wurden am Universitätsklinikum Göttingen in Übereinstimmung mit der Ethikkommission gewonnen und histologisch gemäß der „World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System 2007“ klassifiziert [444]. Diese Zelllinie zeigt die Expression charakteristischer Marker von GSC bzw. neuralen Stammzellen wie Nestin und CD133 [1, 444, 445]. Insbesondere erfüllt sie die definierenden Schlüsselanforderungen als GSC-Linie, die in 2.5.2 dargelegt wurden.



**Abbildung 11: Tumorsphären der Zelllinien #1051 und #1051\_IR**

Die Glioblastom-abgeleitete Stammzelllinie #1051 war sowohl in ihrer naiven (#1051, rechts) als auch in ihrer bestrahlten Form (#1051\_IR, links) in der Lage, in serumfreier Zellkultur zu proliferieren und runde Tumorsphären zu bilden. Die abgebildeten Zellen befinden sich im Zustand nach einmaliger Gabe von 1,94 µl DMSO. Quelle: Eigene Gestaltung, fotografiert von Fitriyani Fitriyani

So bewiesen ihre Zellklone ihre Proliferationsfähigkeit durch die Fähigkeit, sich in serumfreier Zellkultur (wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde unter Zusatz der Wachstumsfaktoren bFGF und EGF) zu vermehren und Tumorsphären zu bilden (s. Abbildung 11). Ihre Kapazität zur Selbsterneuerung wurde durch die ELDA-Methode (s. 4.4) bestätigt, mit der sich der Anteil der Stammzellen abschätzen lässt [1]. Ihr Potenzial zur phänotypischen Differenzierung (in vitro) veranschaulicht ihre schwache und heterogene Expression des astrozytären Markers GFAP und homogene Expression von Nestin in Gegenwart von bFGF/EGF, während sie nach dem Entzug von bFGF/EGF eine differenzierte Morphologie annehmen und eine erhöhte Expression von GFAP zeigen ohne offensichtliche Veränderungen im Nestin-Expressionsmuster [445]. Ihr tumorigenes Potenzial wurde durch ihre orthotope Sekundärtransplantation in immunsupprimierten Mäusen untersucht [444]. Sie erwies sich hierbei als hochgradig tumorerzeugend und war in der Lage, aggressive Hirntumore mit irregulärer und invasiver Morphologie hervorzubringen, die für GB charakteristisch ist [1, 444].

Nach vorheriger autofremder fraktionierter Bestrahlung (s. 4.2 und [1]) und anschließender Behandlung ergaben sich sechs Zelllinien, die in der folgenden Tabelle aufgelistet sind:

**Tabelle 1: Zelllinien**

Nummer	Zelllinie	Herkunft	Vereinfachte Benennung
1	1051 (naiv)	OP-Präparat	#1051
2	1051 mit 100 µM TMZ-Behandlung	Selbst generiert (s. 4.30)	#1051_TMZ
3	1051 mit 0,194% DMSO-Behandlung	Selbst generiert (s. 4.3)	#1051_DMSO
4	1051 mit Bestrahlung	Vorbehandlung (s. 4.2)	#1051_IR
5	1051 mit Bestrahlung und 100 µM TMZ-Behandlung	Selbst generiert (s. 4.2 und 4.3)	#1051_IR_TMZ
6	1051 mit Bestrahlung und 0,194% DMSO-Behandlung	Selbst generiert (s. 4.2 und 4.3)	#1051_IR_DMSO

Die Zelllinien, die nicht bestrahlt wurden („naiv“), werden mit #1051 ohne Zusatz gekennzeichnet, während bestrahlte Zelllinien als IR (IR für „ionizing radiation“) bezeichnet werden. Bei erfolgter Behandlung mit Temozolomid wird TMZ angehängt, bei Behandlung mit DMSO wird DMSO beigefügt. Wie in 4.3.1 beschrieben, wurden (bei stattgehabter Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen) die Experimente auf die Zelllinien beschränkt, die mit der höchsten Konzentration an TMZ (100 µM) respektive DMSO (0,194%) behandelt wurden. Auf die Zelllinien mit diesen Behandlungskonditionen wird fortan verwiesen, die vereinfachte Benennung aus Tabelle 1 wird verwendet. Da DMSO als Lösungsmittel für TMZ fungiert (und damit die TMZ-Behandlungslösung DMSO beinhaltet), erfolgte die parallele Behandlung der Zelllinien mit TMZ-freiem DMSO, um TMZ-spezifische von unspezifischen Effekten des DMSO unterscheiden zu können.

### 3.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits

**Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien**

Name	Firma
Aceton	AppliChem ITW Reagents
Agarose (electrophoresis grade)	Invitrogen™ life technologies
Chloroform:Isoamylalkohol 24:1	Sigma-Aldrich®
cOmplete™ Mini Proteasehemmer-Cocktail	Roche
Dimethylsulfoxid	Roth
DNA Clean & Concentrator™-5	Zymo Research Corp.
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich®
Ethanol absolut vergällt	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Fc Receptor (FcR) Blocking Reagent	Miltenyi Biotec
Fluorescence Mounting Medium	Dako AG
Formaldehyde (37% (wt/vol%))	Thermo Fisher Scientific
Glycin	Roth
Glycogen 20 mg/ml	Sigma-Aldrich®
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Methanol	Roche
Natriumchlorid (NaCl)	Promega

Neuronal Tissue dissociation Kit – Papai	Miltenyi Biotec
NP-40	Thermo Fisher Scientific
Nuclease-Free Water	Ambion
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1	Sigma-Aldrich®
Phosphate buffered saline (PBS)	Gibco™
Poly-L-Ornithine hydrobromid	Sigma-Aldrich®
Sodium Acetate Solution (3 M) pH 5.2	Thermo Fisher Scientific
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Roth
Stickstoff	Linde
Sucrose	Sigma-Aldrich®
Temozolomid	Sigma-Aldrich®
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)-HCl pH 7.4	Sigma-Aldrich®
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)-HCl pH 8.0	Sigma-Aldrich®
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich®

### 3.3 Puffer, Medien und Zusätze

Tabelle 3: Puffer, Medien und Zusätze

Name	Firma
B27 Supplement	Gibco™
DNA Binding Buffer	Zymo Research Corp.
DNA Wash Buffer (concentrate)	Zymo Research Corp.
Double distilled water (ddH <sub>2</sub> O)	Sartorius Stedim Biotech arium® pro VF
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco™
L-Glutamin 200 mM	Gibco™
MACS® Neuro Medium	Miltenyi Biotec
Minimum Essential Medium (MEM)	Gibco™
Natriumpyruvat 100 mM	Gibco™
Neurobasal™ Medium, minus phenol red	Gibco™

### 3.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper

Name	Host/ Target	Verdünnung	Firma
Alexa Fluor 488 IgG (H+L) Sekundär-antikörper	Goat/ anti-Mouse	1:500	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor 555 IgG (H+L) Sekundär-antikörper	Goat/ anti-Rabbit	1:500	Thermo Fisher Scientific
Anti-GFAP Primär-antikörper, polyklonal	Rabbit/ -	1:500	Dako
Anti-Ki67 Primärantikörper, monoklonal	Rabbit/ -	1:100	Abcam

## Materialien

Anti-Nestin Primär- antikörper, monoklonal	Mouse/ -	1:200	Abcam
---	----------	-------	-------

### 3.5 Enzyme, Proteine, Farbstoffe und Marker

Tabelle 5: Enzyme, Proteine, Farbstoffe und Marker

Name	Firma
4',6-Diamidin-2-phenylindol	Thermo Fisher Scientific
6X DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific
Basic fibroblast growth factor (bFGF)	Biochrom AG
DNase-freie RNase	Roche
Epidermal growth factor (EGF)	Biochrom AG
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Proteinase K, recombinant, PCR grade	Roche
Rinderserumalbumin Fraktion V (Bovine Serum Albumin - BSA)	Roche
SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific
Trypanblau (0,5% w/v)	Biochrom AG
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (-EDTA)	Gibco™

### 3.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
Beschriftungsklebeband	neoLab®
CELLSTAR® Zellkultur 24-Multiwell Platten	Greiner Bio-One GmbH
Collection Tubes	Zymo Research Corp.
Deckgläser (Ø 10mm)	Thermo Scientific™
Einmal-Skalpell (steril)	Aesculap
Einmal-Wischtücher (Tissue-Tücher)	Carl Roth
Eisblock	Laborintern
Entsorgungsbeutel	VWR
Erlenmeyerkolben (100; 250; 500 ml)	Duran
Filterpapier (Ø 70mm)	Macherey-Nagel
Glas-Objektträger	Diagonal GmbH & Co. KG
Kryo-Aufbewahrungsbox	neoLab®
Kryoröhrchen (Cryovials)	Thermo Scientific™
Laborflaschen (250; 500; 1000 ml)	VWR
Laborglasflasche (250; 500 ml)	Schott Duran
Latexhandschuhe	Sempercare® Edition
Messpipetten (5; 10; 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH
Mikroreaktionsgefäß (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf
Petrischalen 100x20 mm rund	Greiner Bio-One GmbH
Pinzette	VWR
Pipettenspitzen (20; 200; 1000 µl)	Sarstedt
Preseparationsfilter (Ø 30 µm)	Miltenyi Biotec
Rotilabo®-Spritzenfilter (steril)	Roth

## Materialien

Safe Lock Tubes 2 ml	Eppendorf
Spritze (10 ml)	BD Discardit™ II
Suspensionskulturflaschen (Vol. = 50, 250, 550, 650 cm <sup>3</sup> )	Greiner Bio-One GmbH
Tip SystemBox (für Pippettenspitzen)	Sarstedt
Trockeneis	Laborintern
Tube Racks	Greiner Bio-One GmbH
Verschlussfolie	PARAFILM® M
Zentrifugenröhrchen (15; 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH
Zymo-Spin™ I Columns	Zymo Research Corp.

## 3.7 Laborgeräte

Tabelle 7: Laborgeräte

Name	Firma
Absaugsystem	Integra Biosciences™ Vacusafe™
Centrifuge 5702	Eppendorf
Centrifuge 5804 R	Eppendorf
CO <sub>2</sub> -Inkubator Heracell 150i	Thermo Scientific™
Digitale Farbkamera DFC480	Leica
Digitaler Pipettierhelfer	Sunlab®
Dunkelhaube BDR 1	Biometra GmbH
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences
Elektrische Feinwaage R 180 D	Sartorius Research
Elektrischer Pipettierhelfer	Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop DM IRB	Leica
Gefrierfach (-20 °C)	Liebherr
Geldokumentationssystem BioDocAnalyse (BDA) digital	Biometra GmbH
Gewebehomogenisator nach Potter-Elvehjem	VWR
Heiz- und Magnetrührer Combimag Ret	IKA®
Inverses Labormikroskop DM IL LED	Leica
Kreisschüttler (Vortexer)	VWR
Kreisschüttler (Vortexer) MS1 Minishaker	IKA®
Kühlschrank (+4 °C)	Liebherr
Laborautoklav VX-55	Systec
Live cell movie analyzer JuLI™ Br	NanoEnTek
Mechanische Pipette (2; 10; 20; 100; 200; 1000 µl)	Gilson
Mechanische Pipette (10; 20; 100; 500; 1000 µl)	Eppendorf
Mikrowelle R-334	Sharp
Mikrozentrifuge Biofuge® Pico	Heraeus
Mikrozentrifuge Mikro 200R	Hettich
Nalgene™ Unwire™ Gestelle	Thermo Scientific™
NanoDrop™ 1000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific
Neubauerzählkammer (0,0025 mm <sup>2</sup> )	Brand
Reaktionsgefäß-Ständer	VWR

Reinstwassersystem arium® pro VF	Sartorius Stedim Biotech
Schüttel- und Mischgerät Duomax 2030	Heidolph
Sicherheitswerkbank Herasafe®	HERAEUS®
Sonication System Bioruptor Plus®	Diagenode
Tiefkühlagergerät (-80 °C) HERAFreeze® Basic	Thermo Scientific™
UV-Transilluminator TI 1	Biometra GmbH
Wasserbad AQUAline AL 12	Lauda

### 3.8 Datenverarbeitungsprogramme

Tabelle 8: Datenverarbeitungsprogramme

Name	Firma
(Fluoreszenz-) Mikroskopsoftwareplattform Application Suite V4 LAS 4.0	Leica
Adobe Spark	Adobe Inc.
EndNote X8	Clarivate Analytics
Excel® for Microsoft 365	Microsoft Corporation
Extreme Limited Dilution Analysis	Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Hu, Y., Smyth, GK.
Geldokumentationskamera PowerShot G6	Canon
Geldokumentationsprogramm BioDocAnalyze	Biometra GmbH
IBM SPSS Statistics 27	IBM
ImageJ	Open Source
Photoshop Elements 2021	Adobe Systems Software Ireland Limited
PowerPoint® for Office 365	Microsoft Corporation
Word for Office 365	Microsoft Corporation
XMind 2020	XMind Ltd.

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Kultivierbedingungen und Herstellung des Mediums

Die Zelllinien wurden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert, bei konstanter Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Zellkulturarbeiten, wie das Passagieren oder die Behandlung der Zellen, wurden stets unter sterilen Bedingungen mit sterilen Materialien unter einer Sicherheitswerkbank mit Abzug durchgeführt.

Alle Zelllinien – naive, vorbestrahlte und behandelte - wurden in einem serumfreien Medium kultiviert, das die Selbsterneuerung der Zellen unterstützte [7]. Es bestand aus dem Neurobasal Medium der Firma Gibco, dem das B27-Supplement und die rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren EGF und bFGF hinzugegeben wurden [7]. Das initial zehnfach konzentrierte B27 Supplement wurde direkt zum Medium gegeben und wurde so auf eine einfache Konzentration verdünnt. Die Wachstumsfaktoren wurden separat als zehnfach konzentrierte Lösung angesetzt und zum Medium (mit B27) in einem Verhältnis von 1:9 gegeben, sodass auch sie letztlich in einfacher Konzentration vorlagen.

Um jenes separat angesetzte, zehnfach konzentrierte Reservoir herzustellen, wurde anfangs B27 wie oben beschrieben zum Neurobasal-Medium hinzugegeben. Anschließend werden in 25 ml aus dem sich ergebenden Medium 1 g BSA durch das Schüttelgerät für 30 Min. bei Raumtemperatur gelöst und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen übertragen. Die Lösung wird mit einer Spritze entnommen und durch einen Spritzenfilter (Milliporfilter) steril filtriert, bis auf 5 ml der Lösung. In diesen werden 100 µl aus einer bFGF-Stocklösung mit der Konzentration 0,1 µg/µl sowie 20 µl aus einer EGF-Stocklösung mit der Konzentration 1 µg/µl gelöst. Beide Stocklösungen werden bei -80 °C aufbewahrt und zu diesem Zwecke vorher in einem Wasserbad aufgetaut. Die genannte Mischlösung wird erneut steril filtriert, unter Benutzung des gleichen Spritzenfilters. Um das Maximum an gelösten Wachstumsfaktoren auszuschöpfen, wird das Röhrchen mit 5 ml Medium gespült und der Filtrationsvorgang wiederholt. Es ergibt sich also ein Filtrat mit einem Totalvolumen von etwa 30 ml. Dieses wird nun auf zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt, mit je 15 ml an Filtrat. Es schließt sich eine zehnfache Verdünnung durch die Hinzugabe von 45 ml Medium an, sodass sich ein Totalvolumen von 50 ml pro Zentrifugenröhrchen ergibt. Zum Schluss wird von jedem Röhrchen eine Probe von je 500 µl entnommen und jeweils in ein Well einer 24-Well-Platte übertragen. Diese Platte wird bei 37 °C im Inkubator hinterlegt. Ziel hiervon ist die Erkennung einer etwaigen Kontamination oder bakteriellen Ansiedlung in den Folgetagen und -wochen. In den Röhrchen befindet sich nun eine zehnfach konzentrierte Wachstumsfaktor-Lösung mit einer Endkonzentration von 1 g/100 ml BSA, 100 ng/ml bFGF und 200 ng/ml EGF. Die Röhrchen werden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Die folgende Tabelle gibt Überblick über die Bestandteile der verwendeten Medien.

**Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Medien**

Bezeichnung des Mediums	Zusammensetzung des Mediums
Differenzierungsförderndes Medium NB <sup>-bFGF/-EGF</sup>	Neurobasal™ Medium + B27-Supplement
Selbsterneuerungsförderndes Medium NB <sup>+bFGF/+EGF</sup>	Neurobasal™ Medium + B27-Supplement + 0,1 % BSA + 10 ng/ml bFGF + 20 ng/ml EGF
10-fach konz., wachstumsfaktor-angereichertes Medium	Neurobasal™ Medium + B27-Supplement 1 % BSA + 100 ng/ml bFGF + 200 ng/ml EGF

### 4.1.2 Kultivierung von GSC-Sphärenkulturen

Die GSC-Zelllinien werden als nicht-adhärenente Sphären kultiviert. Sie wachsen daher gelöst im Zellkulturmedium und haften nicht an der Oberfläche der Kulturflasche. Ihr Wachstum wird primär durch das umgebende Medium und seine Wachstumsfaktoren bestimmt und limitiert und nicht von der Wachstumsfläche des Kultiviergefäßes. GSC-Sphären von 100-500 µm Durchmesser wurden durch Sedimentation gesammelt und mit einem kombinierten enzymatisch-mechanischen Verreibungsansatz dissoziiert.

Die GSC-Sphären sedimentierten unter Einfluss der Schwerkraft in einer Ecke der Kulturflasche, von wo aus sie per Pipette (unter Mitnahme von Medium) entnommen und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt wurden. Nach erneuter Sedimentierung der Zellaggregate wurde der Überstand (an Medium) entfernt. Zum Zellpellet wurde nun 0,05 % Trypsin-EDTA gegeben (i.d.R. 200 µl bei großem Zellpellet; bei kleinem Zellpellet 50 -100 µl) und das Gemisch insgesamt zehn Mal resuspendiert. Die Trypsin-EDTA-Lösung dient zur enzymatischen Verdauung der Zell-Zell-Verbindungen und damit der Dissoziation der Zellsphären [446, S.115]. Es folgte eine direkte Neutralisation mit 1 ml Neurobasal-Medium um zytotoxische und irreversible Schäden durch eine lange Einwirkzeit der Dissoziationslösung zu verhindern [446, S.115]. Das Mikroreaktionsgefäß wurde in einer Mikrozentrifuge für 3 Min. mit 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt und das Zellpellet resuspendiert mit 1 ml NB <sup>+bFGF/+EGF</sup>. Die sich ergebende Zellsuspension wurde durch einen Pre-Separationsfilter in ein neues Mikroreaktionsgefäß filtriert.

Es schloss sich die Bestimmung der Zellzahl an. Hierzu wurden 20 µl der unverdünnten Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gemischt (und damit 1:2 verdünnt). Trypanblau ist ein Farbstoff, der nur tote Zellen färbt, während vitale Zellen ihn nicht aufnehmen. Vitale Zellen leuchten daher hell, tote Zellen werden dunkelblau gefärbt. Das Zellsuspensions-Trypanblau-Gemisch wurde nun in eine Neubauerzählkammer überführt und ein Kammerfeld ausgefüllt. Dies beinhaltet 3 x 3 Großquadranten mit jeweils 1 mm Kantenlänge und damit 1 mm<sup>2</sup> Fläche. Nun wurde die Anzahl von lebenden wie toten Zellen in den vier Eckquadranten des Kammerfelds gezählt und der Durchschnitt „n“ aus diesen vier Eckquadranten bestimmt. Nach der folgenden Formel wurde die Zellkonzentration c in Zellen pro Milliliter bestimmt:

$$c = n \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10\,000$$

### 4.1.3 Kryokonservierung, Auftauen und Wiederkultivierung von GSC

Um permanente Kultivierungsarbeit und Veränderungen an Zelllinien (wie Alterungsprozess, Veränderung der Vitalität) zu verhindern, werden diese durch entsprechende Kryokonservierung eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt [446, S.137]. Dies gewährleistet eine Langlebigkeit und Wiederverwendbarkeit der Zellen zu einem späteren Zeitpunkt.

Hierzu wurden die Zellsphären in der Kulturflasche sedimentiert, entnommen und in einem Mikroreaktionsgefäß in einer Mikrozentrifuge für 3 Min. mit 2000 rpm zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand entfernt, 2 ml Gefriermedium hinzugegeben und wenige Male resuspendiert. Das Gefriermedium bestand aus 1,6 ml B27-supplementiertem Neurobasalmedium, 0,2 ml 10-fach konzentrierter NB <sup>+bFGF/+EGF</sup>-Lösung und 0,2 ml 99,5% DMSO. Neben dem üblichen Zellkulturmedium waren hiermit zu 10 % (v/v) DMSO als Frostschutzmittel enthalten. Es verhindert die Kristallbildung in und außerhalb der Zellen [446, S.137] und damit die irreversible Schädigung und Zerstörung der Zellen während des Gefriervorgangs. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen übertragen und in einer Einfrierbox für 24 Stunden deponiert. In ihr wird der Kühlvorgang schonend vollzogen durch eine Abkühlfrequenz von -1 °C pro Minute bis zur Gefriertemperatur von -80 °C. Hiernach wird das Kryoröhrchen in einem Stickstofftank aufbewahrt, der die Gefriertemperatur von ca. -196 °C aufweist.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen in einem vorgewärmten Wasserbad bis auf 37 °C aufgewärmt. Die Zellsuspension wurde in ein Mikroreaktionsgefäß übertragen und in einer Mikrozentrifuge mit 2000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das

Zellpellet in dem üblichen Zellkulturmedium (NB<sup>+bFGF/+EGF</sup>) resuspendiert und in eine Kulturflasche samt Zellkulturmedium übertragen, die im Inkubator hinterlegt wurde.

### 4.2 Bestrahlung der Zellen

In vorherigen Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe wurden Klone der Glioblastom-abgeleiteten Stammzelllinie 1051 mit ionisierender Strahlung behandelt, um die Auswirkungen der Strahlentherapie zu modellieren. Diese Strahlenbehandlung wird in [1] erläutert. Dabei wurde ein hypofraktioniertes Bestrahlungsschema angewandt, das aus sieben Fraktionen von je 2 Gy Röntgenstrahlung bestand, die von einem Gulmay RS225 GS014 Röntgengerät (Gulmay Medical Ltd., Camberley, UK) bei einer Stromstärke von 200 kV, einer Spannung von 15 mA und einer Dosisleistung von 1 Gy/min erzeugt wurde [1]. Die Tumorsphären wurden hierzu einen Tag vor der Bestrahlung passagiert. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden die Zellen bis zur nächsten Bestrahlung in ihrem Zellkulturmedium im Inkubator kultiviert [1]. Abgesehen von der Bestrahlung wurden die Kontrollkulturen aus naiven #1051-Zellklonen parallel dazu in gleicher Weise behandelt. Insgesamt wurden daher sieben aufeinander folgende Fraktionen von Strahlen- oder Scheinbehandlungen an isogenen Paaren aus #1051 und #1051\_IR durchgeführt [1].

### 4.3 Selektion der Zellen durch Temozolomidbehandlung

#### 4.3.1 Selektionsprozess

Zur Zielsetzung dieser Arbeit gehörte die Charakterisierung von Temozolomid-resistenten Klonen der Glioblastom-abgeleiteten Stammzelllinie #1051. Die Grundlage hierfür bildete ein mehrschrittiger Selektionsprozess, der durch wiederholte Behandlung der Zellen mit Temozolomid induziert wurde. Zur Subkultivierung dieser Temozolomid-resistenten Klone wurden Klone der beiden Zelllinien aus elterlicher #1051-Linie und vorbestrahlter Linie #1051\_IR mit Temozolomid in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Zeitpunkt der Behandlung war stets am Folgetag nach durchschnittlich 24 Stunden nach dem Passagieren der Zellen. Die nächste Behandlung folgte, wenn die Zellsphären den Zustand zum nächsten Passagieren erreicht haben, sprich wenn sie sich in der späten exponentiellen (log-) Wachstumsphase befanden. Der Zeitraum zwischen zwei Passagen betrug bei bestrahlten Zelllinien durchschnittlich 21 Tage und bei unbestrahlten 22 Tage. Über dem gesamten Zeitraum von ca. 16 Wochen befanden sich die Zellen in Anwesenheit des Temozolomid. Hierbei fanden insgesamt sechs Behandlungsphasen statt, angelehnt an das Therapieschema von Glioblastomen zum gegenwärtigen Zeitpunkt aus adjuvanter Radiochemotherapie mit (zur Bestrahlung begleitender Temozolomid-Gabe und) anschließender alleiniger Gabe von Temozolomid in sechs Zyklen [21, 447]. Nach dieser mehrschrittigen Temozolomid-Behandlung wurde der Selektionsprozess als abgeschlossen betrachtet. Dies wurde als Endpunkt der Behandlung festgelegt, da nach jedem Behandlungsschritt Zellen durch die zytotoxische Wirkung des Temozolomid zugrunde gingen (s. 5.2) und andere trotz der hohen Konzentration des Chemotherapeutikums überlebten und proliferierten. Wiederholt man diesen Prozess, wie in der vorliegenden Arbeit getan wurde, nimmt die Resistenzfähigkeit der Tumorzellen gegenüber Temozolomid mutmaßlich fortlaufend zu. Das zu erwartende Ergebnis ist eine steigende Aggressivität der Tumorzellen *in vitro* und analog hierzu des Tumorgewebes *in vivo*.

TMZ ist in Wasser unlöslich, kann aber in DMSO gelöst werden [448]. Der Grund hierfür liegt in der Eigenschaft des DMSO, ein organisches Lösungsmittel zu sein, das mit Wasser mischbar ist [449]. Die Temozolomid-Arbeitsstocklösung beinhaltete daher DMSO als Dissoziationsmedium (s. 4.3.2). Um die mit TMZ verbundenen Effekte eindeutig von unspezifischen Auswirkungen des Lösungsmittels zu trennen, wurden alle Behandlungen von GSC mit TMZ parallel zu einer Scheinbehandlung mit TMZ-freiem DMSO durchgeführt. Die

Kontroll-Sublinien wurden als #1051\_DMSO bezeichnet und mit demselben Selektionsverfahren erzeugt, nur dass die Zellen mit TMZ-freiem DMSO behandelt wurden. Daher wurden, um eine Kontrollgruppe zu kultivieren, andere Klone der beiden Zelllinien #1051 und #1051\_IR mit DMSO behandelt. Das Volumen an DMSO, das zur Behandlung verwendet wurde, entsprach dabei stets dem Volumen an der Temozolomid-Arbeitsstocklösung, das den Zellen in der Kulturflasche verabreicht wurde. Ferner fand die Behandlung mit DMSO immer parallel zu jedem Behandlungsschritt mit Temozolomid statt und umfasste daher insgesamt ebenso sechs Zyklen.

Für die sich anschließenden Experimente wurden die Zellklone ausgewählt, die jeweils mit der höchsten Konzentration an Temozolomid und DMSO behandelt wurden (s. 4.3.2). Diese waren jene Klone, die mehrschrittig mit 100 µM Temozolomid respektive 0,194% DMSO behandelt wurden. Es war plausibel, davon auszugehen, dass diese Zellklone – nach Selektion und Resistenzentwicklung – von den vorliegenden behandelten Zelllinien den höchsten Grad an etwaigen (molekular-)biologischen Veränderungen und Resistenzmechanismen aufwiesen [449]. In der Untersuchung und Charakterisierung dieser war es daher stringent, den Fokus auf genannte Zellklone zu setzen. Die restlichen Zellklone, die mit niedrigeren Konzentrationen an Temozolomid und DMSO behandelt wurden, wurden kryokonserviert.

### 4.3.2 Herstellung der Temozolomid-Arbeitsstocklösung und Behandlungsschema

Zur Behandlung der Zelllinien mit Temozolomid wurde dieser Arbeit vorangehend eine Arbeitsstocklösung hergestellt und aliquotiert, sodass in jedem Behandlungsschritt eine identische Behandlungslösung verwendet wurde. Hierzu wurden 100 mg Temozolomid (von der Firma Sigma-Aldrich®) – bei einem molekularen Gewicht von 194,151 g/mol [450] – in 10 ml 99,5%-ige DMSO-Lösung gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 51,5 mM. Diese Lösung wurde anschließend im Verhältnis von 1:1 mit kalter, steriler PBS-Pufferlösung gemischt, sodass die finale Konzentration von Temozolomid in der Lösung 25,75 mM entsprach. Dies stellte die Arbeitsstocklösung dar und wurde für späteren Gebrauch aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Für den Selektionsprozess der Zellen wurden als Temozolomid-Konzentrationen (zur Behandlung) 1 µM, 10 µM und 100 µM festgelegt. Um diese Konzentrationen im Kulturmedium von 7 ml zu erreichen, war für die Konzentration von 1 µM pro Behandlungsschritt die Verabreichung von ca. 0,272 µl an obiger Arbeitsstocklösung nötig, für 10 µM ca. 2,72 µl und für 100 µM als höchste Konzentration ca. 27,2 µl. Um mögliche Pipettierfehler zu minimieren, wurde für alle Behandlungskonzentrationen und zu behandelnden Zelllinien eine gemeinsame Gebrauchsmischlösung erstellt, in der die Temozolomid-Arbeitsstocklösung 1:9 mit eiskaltem B27-supplementiertem Neurobasalmedium gemischt und damit 1:10 verdünnt wurde. Aus dieser Temozolomid-Gebrauchslösung wurde den Zellen im nächsten Schritt jeweils das Zehnfache der oben genannten (aus der Arbeitsstocklösung benötigten) Volumina verabreicht, sprich 2,72 µl Temozolomid-Arbeitsgemisch für die Konzentration von 1 µM, 27,2 µl für 10 µM und 272 µl für 100 µM. Analog hierzu wurde wie in 4.3.1 dargelegt dem anderen Teil der Zelllinien dieselben Volumina an DMSO verabreicht (d.h. 2,72 µl, 27,2 µl und 272 µl an 5% DMSO für drei Zellklone pro Zelllinie), sodass die DMSO-Konzentration 0,0019, 0,0194 und 0,194 Prozent betrug.

Daraus ergaben sich für jede der sechs Zelllinien aus 3.1 folgende sechs Klone, die exemplarisch an der Zelllinie #1051 dargestellt sind:

Tabelle 10: Exemplarisches Behandlungsschema

Zelllinie + Behandlung
#1051 + 1 µM Temozolomid in 0,0019% DMSO
#1051 + 10 µM Temozolomid in 0,0194% DMSO
#1051 + 100 µM Temozolomid in 0,194% DMSO

#1051 + 0,0019% DMSO
#1051 + 0,0194% DMSO
#1051 + 0,194% DMSO

## 4.4 Bestimmung der Selbsterneuerungskapazität durch das Extreme Limited Dilution Assay

### 4.4.1 Prinzip des Extreme-Limited-Dilution-Assays

Beim Extreme-Limited-Dilution-Assay (ELDA) - übersetzt Grenzwert-Verdünnung - handelt es sich um eine experimentelle Methode, um die Frequenz von Effektorzellen (mit spezifischen Eigenschaften und Funktion) innerhalb einer Gesamtpopulation zu bestimmen [451, 452]. In dieser Arbeit diente sie der Bestimmung der Anreicherung von GSC in den verschiedenen Zellreihen unter unterschiedlichen Konditionen sowie ihrer Kapazität zur Selbsterneuerung. Es handelt sich um eine Art Dosis-Wirkungs-Experiment, bei dem jede einzelne Kultur eine negative oder positive Reaktion ermöglicht (nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip) [451, 453].

Diese positive Reaktion ist im vorliegenden Fall durch ein sichtbares Wachstum, sprich eine Bildung von mindestens einer Neuro- bzw. Tumorsphäre definiert; bei Ausbleiben dessen handelt es sich um eine negative Reaktion. Die Häufigkeit der gebildeten Neurosphären ist dabei nicht von Relevanz, da unklar bleibt, ob dieser eine oder mehrere GSC zugrunde liegen. Entscheidend ist dagegen die negative Reaktion, da sie demonstriert, dass keine GSC in dieser Kultur vorhanden war [453]. Andernfalls wäre eine positive Reaktion erfolgt, da GSC (selbst bei geringer Zellanzahl) stark tumorigen sind.

Die Grundlage bildet das Anlegen einer Verdünnungsreihe. Dabei erfolgt die Ausplattierung der Zellen ab einer solch hohen Konzentration, wo die erwünschte Reaktion in jedem Fall auftritt (100 %), schrittweise absteigend und verdünnend bis zu einem so niedrigen Grenzwert, dass er (nahezu) limitierend ist für die erwünschte Reaktion (0%) [451, 452]. Die Rate an positiven und negativen Reaktionen für jede Konzentration erlaubt die Bestimmung der Frequenz an GSC pro Zellreihe und den Vergleich dieser [451]. Das zugrunde liegende Analysemodell ist in 4.4.3 beschrieben.

### 4.4.2 Durchführung

In der vorliegenden Arbeit wurden entsprechend der Proliferationskapazität der Zelllinie #1051 die obere Grenze der Zellkonzentration pro Kultur im ELDA mit 20 Zellen/Kultur und die untere Grenze mit (rechnerisch) 0,3075 Zellen/Kultur festgelegt. Die Verdünnungsschritte zwischen diesen Konzentrationen besaßen jeweils den Verdünnungsfaktor 1:2. Damit ergab sich eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen [20 – 10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,6125 – 0,3075] Zellen/Kultur.

Zur Vorbereitung des ELDA wurden die Zellen wie in 4.1.2 beschrieben passagiert und gezählt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in NB<sup>+bFGF/+EGF</sup> 1:100-fach verdünnt (in zwei Schritten à 1:10-Verdünnung). Für die Konzentrationen von 20, 10, 5 und 2,5 wurde jeweils ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen beschriftet und mit 20 ml NB<sup>+bFGF/+EGF</sup> pro Röhrchen gefüllt. Nun wurde für die jeweilige Zellkonzentration eines jeden Zentrifugenröhrchens das benötigte Zellsuspensionsvolumen (auf das Volumen von 20 ml bezogen) entnommen und ins Zentrifugenröhrchen überführt. Für jede dieser Konzentrationen (20 – 10 – 5 – 2,5) wurde eine 24-Well-Platte vorbereitet und in die Wells aller Reihen jeweils 1 ml NB<sup>+bFGF/+EGF</sup> verteilt, mit Ausnahme der ersten Reihe, die vorerst leer blieb. Aus dem Zentrifugenröhrchen wurden sechsmal 2 ml der Zellsuspension entnommen und in die sechs Wells der ersten (leeren) Reihe der zugehörigen Well-Platte überführt. Nun wurde die Verdünnungsreihe initiiert, indem 1 ml Zellsuspension von jedem Well der ersten Reihe in das darunterliegende Well der zweiten Reihe übertragen und (in dem dort vorhandenem Medium) mehrfach resuspendiert wurden. Dieser Verdünnungsschritt zwischen zwei Reihen wurde bis zur letzten Reihe fortgeführt und

das verbleibende Zellsuspensionsvolumen (von 1 ml) wurde in eine Restplatte übertragen. Damit ergab sich folgendes Konzentrations- und Verdünnungsmuster:

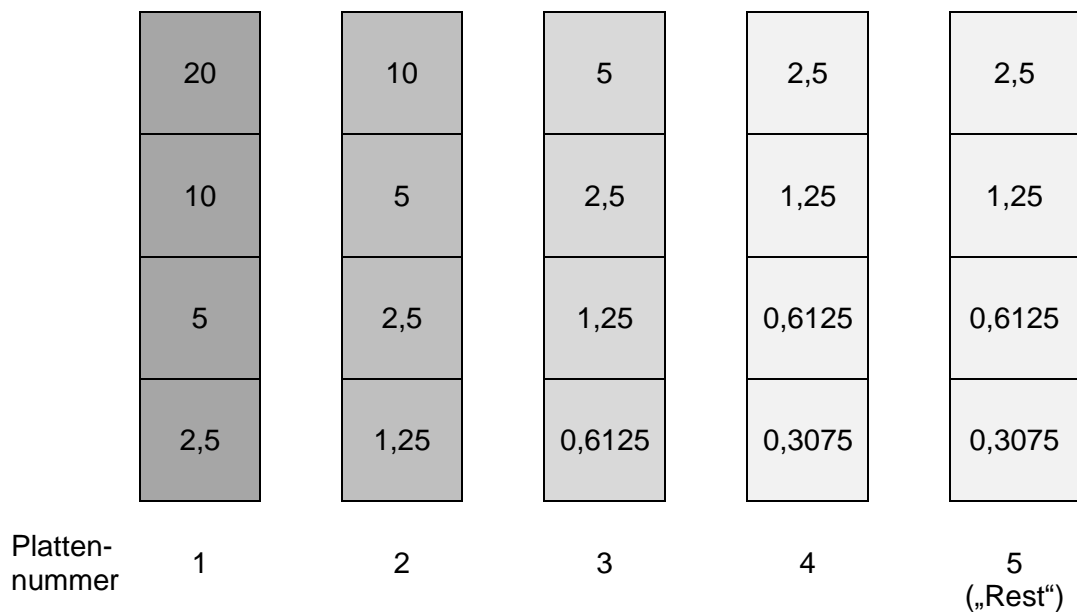


Abbildung 12: Verdünnungsmuster des ELDA

Die erste Reihe jeder Platte beinhaltete die höchste Zellkonzentration, die in jedem der sechs Wells (pro Reihe) enthalten war. Ausgehend von dieser ersten Reihe wurde eine mehrstufige 1:2-Verdünnung bis zur letzten Reihe vorgenommen. Die restliche Zellsuspension wurde in die fünfte „Restplatte“ transferiert. Pro ELDA-Set ergaben sich daher die Höchstkonzentration von 20 und die niedrigste Konzentration von 0,3075 Zellen/Well. Ersichtlich ist, dass je niedriger die Zellkonzentration ist, desto mehr Kulturen wurden angelegt. Quelle: Eigene Darstellung

Diese Verdünnungsreihe wurde zur Validierung der Ergebnisse pro Zellreihe dreimal durchgeführt. Zum ELDA einer Zellreihe wurde stets das ELDA der Kontrollgruppe parallel durchgeführt.

#### 4.4.3 Auswertung des Extreme-Limited-Dilution-Assays

Nach erfolgter Ausplattierung der Zellen in den Well-Platten fand eine Inkubation im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % für durchschnittlich vier bis fünf Wochen statt. Diese Zeit genügte, um eine Positiv- von einer Negativreaktion zu unterscheiden. Da die Durchführung des ELDA einer Zellreihe immer parallel zur Kontrollgruppe geschah, erfolgte die Auswertung beider ELDA ebenso parallel zum selben Zeitpunkt. Durch lichtmikroskopische Betrachtung wurde beurteilt, ob sich in einem Well mindestens eine Neurosphäre gebildet hat. Für dieses Well wurde demnach eine Positivreaktion verzeichnet. Erfolgte kein sichtbares Zellwachstum wurde eine Negativreaktion vermerkt. So wurde die Gesamtanzahl an Wells, positiven sowie negativen Antworten für die jeweilige Zellkonzentration ermittelt, exemplarisch in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 11: Exemplarische ELDA-Auswertung

Konzentration [Zellen/Well]	Gesamtanzahl (Wells)	Anzahl an Positivreaktionen	Zellreihe
20	6	6	#1051_IR_TMZ
10	12	12	#1051_IR_TMZ
5	18	17	#1051_IR_TMZ
2,5	30	23	#1051_IR_TMZ
1,25	24	11	#1051_IR_TMZ
0,625	18	6	#1051_IR_TMZ
0,3125	12	1	#1051_IR_TMZ

20	6	6	#1051_IR_DMSO
10	12	12	#1051_IR_DMSO
5	18	16	#1051_IR_DMSO
2,5	30	15	#1051_IR_DMSO
1,25	23	9	#1051_IR_DMSO
0,625	18	3	#1051_IR_DMSO
0,3125	12	1	#1051_IR_DMSO

Zur Analyse dieser erhobenen Daten wurde eine Extreme-Limited-Dilution-Analyse verwendet. Dieses Softwareprogramm ist als Online-Werkzeug frei zugänglich auf der Webseite [11] und wird durch [451] zur Verfügung gestellt. Nach Eingabe der Daten ist diese Software dazu imstande, die Stammzell-Frequenz innerhalb der Ausgangs- bzw. Gesamtpopulation zu ermitteln. Diese Bestimmung unterliegt einem 95 %-Konfidenzintervall und setzt die Annahme des „Poisson-Single-Hit-Model“ voraus. Dieses geht von einer Poisson-Verteilung von Effektorzellen (bzw. Stammzellen) innerhalb verschiedener Populationen aus und setzt voraus, dass eine einzige Effektor- bzw. Stammzelle ausreichend ist, um eine Positivreaktion einer Kultur im ELDA auszulösen [451].

Darüber hinaus vergleicht die Software die Stammzell-Frequenz verschiedener Zellpopulationen unter Angabe des p-Werts [451]. Als Signifikanzniveau wurde der Wert  $\alpha=0,05$  festgelegt. Bei multipler Testung ergab sich hierbei die Notwendigkeit einer Alpha-Korrektur. Zur Alpha-Korrektur wurde die Korrektur nach Benjamini-Hochberg herangezogen. Es ergab sich ein korrigiertes Signifikanzniveau von  $\alpha=0,02857$ .

## 4.5 Immunfluoreszenzfärbung

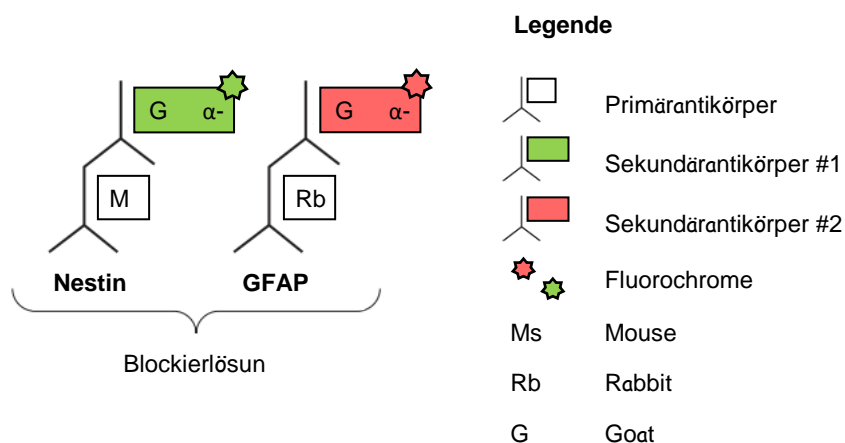
### 4.5.1 Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung

Die Identifizierung von Zell-/Gewebeeigenschaften und -strukturen durch die Immunfluoreszenzfärbung nimmt einen wichtigen Platz im Rahmen immunzytochemischer Untersuchungen ein. Sie ist charakterisiert durch die hohe Spezifität ihres Nachweises, da er auf der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen basiert [454, S.270]. Hierbei stellt die Zielstruktur ein Antigen da, das durch seine dreidimensionale Tertiärstruktur verschiedene Angriffspunkte (Epitope) für Antikörper bietet. Ein oder mehrere Antikörper haben eine Affinität zu diesen Epitopen und können nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip spezifisch an sie binden; hierdurch erfolgt die Markierung dieser Zielstrukturen. Um diese Markierung nachweisbar zu gestalten, ist ein Detektionssystem vorhanden, das in der Regel ein farbliches Signal bei erfolgter Bindung aussendet (und bei erfolgloser Bindung bzw. bei Nicht-Vorhandensein des Antigens nicht). Diese kann durch UV-Mikroskopie detektiert werden [454, S.270]. Diese fluoreszierenden Detektionssysteme können unmittelbar kovalent mit Antikörpern verbunden sein, welche direkt an das Antigen binden und dieses damit unmittelbar markieren. Solche Antikörper werden als Primärantikörper bezeichnet, da sie direkt an das Antigen binden. Diese Methode wird daher als direkte Immunfluoreszenz bezeichnet, da die immunfluoreszierende Komponente direkt mit dem Primärantikörper verbunden ist.

Im Gegenzug bindet bei der indirekten Immunfluoreszenz im ersten Schritt ein unkonjugierter Primärantikörper (an dem kein immunfluoreszierendes Detektionssystem gebunden ist) an das Antigen. Im zweiten Schritt wird ein konjugierter Sekundärantikörper dazugegeben, der Träger für das Detektionssystem ist. Dieser erkennt und bindet an den Primärantikörper (der damit selbst als Antigen fungiert) und dient zur farblichen Markierung der erfolgten Antigen-Identifizierung [454, S.273, 288]. Ein Vorteil dieser indirekten Immunfluoreszenz gegenüber der direkten ist die Möglichkeit, dass mehrere polyklonale Antikörper (die folglich gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind) an denselben Primärantikörper binden können und farbig markieren [13, S.107, 454, S.288]. Dadurch wird eine Signalverstärkung erzielt, die im

Mikroskop auch stärker imponiert. In dieser Arbeit werden Fluorochrome als Detektionssystem verwendet. Diese sind kovalent mit den Sekundärantikörpern verbunden und ihre Fluoreszenz kann durch ein Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Hierbei wird von einer Lichtquelle des Mikroskops Licht mit einer spezifischen Anregungswellenlänge ausgesendet, die an das Fluorochrom angepasst ist. Letzteres absorbiert das ausgesandte Licht, wird dadurch zur Fluoreszenz angeregt und sendet wiederum Licht mit einer bestimmten Emissionswellenlänge aus, die durch den Betrachter wahrgenommen werden kann [454, S.360].

Zur kombinierten (Mehrfach-)Färbung von mehreren Antigenen kann man die verwendeten Primärantikörper-Sekundärantikörper-Paare nacheinander oder simultan inkubieren lassen [454, S.293]. Da in der vorliegenden Arbeit die Markierung der unterschiedlichen Antigene durch Primärantikörper erfolgte, die aus unterschiedlichen Spezies stammen, konnte die simultane, zeitsparende Methode angewandt werden [13, S.106]. Der Grund ist, dass durch die Gewinnung der Primärantikörper aus unterschiedlichen (Host-)Spezies diese sich auch in ihrer Eigenschaft als Antigen für die Sekundärantikörper unterscheiden. In anderen Worten unterscheiden sich die Epitope der Sekundärantikörper auf diesen unterschiedlichen Primärantikörpern und daher können sie simultan an ihr jeweiliges Epitop binden und dieses markieren. Dies wird in Abbildung 13 veranschaulicht. Hierbei müssen Kreuzreaktionen ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit solche Sekundärantikörper verwendet, die gegen die respektive Host-Spezies gerichtet sind (und nicht an die Primärantikörper aus den anderen Hostspezies binden) [13, S.107]. Ferner konnten aufgrund eines vorangehenden Optimierungs- und Etablierungsprozess der Antikörper-Auswahl und Methodik Kreuzreaktionen zwischen den Sekundärantikörpern untereinander als auch zwischen ihnen und dem jeweils gegenteiligen Primärantikörper ausgeschlossen werden. Darüber hinaus muss darauf Acht gegeben werden, dass sich die Detektionssysteme der Sekundärantikörper in ihren Absorptions- und Emissionswellenlängen bzw. -spektra unterscheiden, damit keine Überlappung des Detektionssignals vorliegt [13, S.104, 110]. Dies wurde garantiert durch die gleichzeitige Anwendung verschiedener Fluorochrome.



**Abbildung 13: Indirekte Immunfluoreszenz und Doppelfärbung**

Bei der indirekten Immunfluoreszenz erfolgt die Markierung des Antigens in zwei Schritten. Im ersten Schritt bindet ein Primärantikörper aus einer bestimmten Hostspezies (hier „Mouse“ bzw. „Rabbit“) spezifisch an das Antigen (hier Nestin bzw. GFAP). Im zweiten Schritt bindet an ihn ein Sekundärantikörper, der gegen seinen Host reaktiv ist. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluorochrom verbunden und sendet ein Farbsignal aus. Wenn unterschiedliche Primärantikörper verschiedene Hosts besitzen kann man sie simultan färben, da keine Kreuzreaktion zwischen Primär- und Sekundärantikörpern auftreten. Dabei müssen die Sekundärantikörper unterschiedliche Fluorochrome besitzen, um eine Signal-Überlappung zu vermeiden. Quelle: In Anlehnung an [13, S.108]

#### 4.5.2 Herstellung von ornithinbeschichteten Deckgläschen

Zur Anwendung von immunzytochemischen Methoden wie der Immunfluoreszenzfärbung bei nicht-adhären Zellen wie in der vorliegenden Arbeit ist die Immobilisierung dieser Zellen durch induzierte Anheftung an Zellkulturoberflächen nötig. Insbesondere ist dies im

vorliegenden Fall vonnöten, da das verwendete Kulturmedium serumfrei ist. Die verwendeten Kulturgefäße müssen daher (zur Immunzytochemie) mit Anheftungsfaktoren beschichtet werden [446, S.63]. Diese Vorbeschichtung verstärkt die Anhaftung von Zellen an der Glasoberfläche. Diese Anheftung trägt zur Differenzierung der Tumorzellen bei und ist daher im vorliegenden Experiment der Immunfluoreszenzfärbung förderlich [455].

In dieser Arbeit wurde Poly-L-Ornithin als Anheftungsfaktor verwendet. Damit wurden die Deckgläschen beschichtet, die als Kulturoberfläche für die Zellen dienten, die zu einem späteren Zeitpunkt einer immunfluoreszenten Färbung unterzogen wurden. Vorgenommen wurde dies vom Laborteam. Die benötigten Materialien stellen Poly-L-Ornithinhydrobromid-Pulver und einfach konzentrierter steriler PBS-Puffer dar. Zum Ansetzen der Poly-L-Ornithinlösung wurden 50 mg des Poly-L-Ornithin-Pulvers in 3,33 ml PBS-Puffer gelöst und mit einem Spritzenfilter steril filtriert. Dies stellte die 1000-fach konzentrierte Stocklösung dar (mit einer Poly-L-Ornithin-Konzentration von 15 mg/ml), die aliquotiert wurde. Um die Gebrauchslösung herzustellen, wurde ein 300 µl-Aliquot der Stocklösung in 30 ml PBS-Puffer gelöst. Die Lösung wurde auf sechs Zentrifugenröhrchen à 5 ml verteilt und jedes Röhrchen auf 50 ml mit (45 ml) sterilem PBS-Puffer aufgefüllt. Die resultierende (1-fache) Konzentration der fertigen Gebrauchslösung betrug 15 µg/ml. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

Zur Beschichtung der Deckgläschen wurden diese zuerst in eine Glaspetrischale gelegt und sterilisiert. Hiernach wurden sie mit steriler, gebogener Pinzette entnommen und jedes Deckgläschen in ein separates Well einer 24-Well-Platte getan. Im nächsten Schritt wurden in jedes Well 0,5 ml der Poly-L-Ornithin-Gebrauchslösung gegeben und die Well-Platten wurden bis zum Folgetag im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C aufbewahrt. Am Folgetag wurde die Poly-L-Ornithin-Lösung abgesaugt und die Wells bzw. Deckgläschen jeweils dreimal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen. In jedem Waschschrift wurden 1 ml PBS-Puffer gegeben und nach fünf Minuten entfernt (und mit frischem PBS ersetzt). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Wells jeweils mit 0,5 ml sterilem PBS aufgefüllt und erneut bis zum Folgetag im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C aufbewahrt. Am folgenden dritten Tag wurde die PBS-Lösung entfernt und der vorherige Waschschrift (mit PBS-Puffer) erneut dreimal wiederholt. Zum Schluss wurde jedes Well mit 1 ml PBS-Puffer aufgefüllt. Die Well-Platten mit den Deckgläschen waren nun gebrauchsfertig und für etwa vier Wochen haltbar. Die Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

### 4.5.3 Vorbereitung: Zellausplattierung auf Deckgläschen

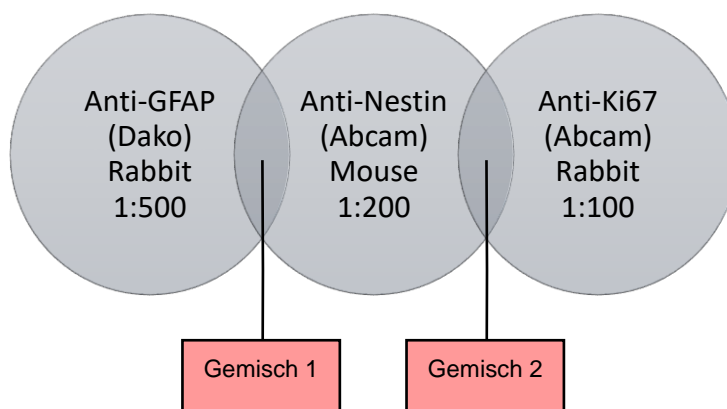
Zur Vorbereitung des Zellmaterials für die immunfluoreszente Färbung wurden die Zellen auf den Ornithin-beschichteten Deckgläschen ausplattiert und für sieben Tage inkubiert. Hierzu wurden die beschichteten Deckgläschen von ihrer Well-Platte entnommen und in eine neue 24-Well-Platte übertragen. Es folgte ein, zu 4.5.2 identischer, dreiteiliger Waschschrift; allerdings wurde als Waschmedium NB<sup>+bFGF/+EGF</sup> anstelle des PBS-Puffers verwendet. Nach dem letzten Waschschrift wurde das restliche Medium entfernt und die Deckgläschen in eine neue 24-Well-Platte übertragen mit einem Deckgläschen pro Well. Im zweiten Teil der Vorbereitung wurden die zu färbenden Zellen passagiert (s. 4.1.2) und jeweils das benötigte Zellsuspensionsvolumen für 30 000 Zellen berechnet. Dieses Zellsuspensionsvolumen wurde auf die Deckgläschen pipettiert. Die Well-Platte wurde nun zur Adhäsion der Zellen an die Oberfläche der Deckgläschen für 10 Min. bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Es folgte die Beurteilung der Zelldichte, -verteilung und -adhäsion im Lichtmikroskop. Im letzten Schritt wurden 1 ml des jeweiligen Mediums (NB<sup>-bFGF/-EGF</sup> bzw. NB<sup>+bFGF/+EGF</sup>) in die Wells gegeben und die Zellen für sieben Tage im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Für jede Zelllinie wurden Zellklone auf insgesamt zehn Deckgläschen kultiviert, fünf für jedes der beiden Medien.

### 4.5.4 Fixierung der Zellen und Färben mit Primärantikörper

Nach der Inkubationszeit von sieben Tagen wurde das Zellmaterial im ersten Teil und am Tag der Immunfluoreszenzfärbung fixiert. Hierzu wurde zuerst das Medium der Wells, in denen sich die Deckgläschen mit kultivierten Zellen befinden, abgesaugt. Die Wells wurden nun dreimal gewaschen mit einfach konzentriertem PBS-Puffer; pro Waschschrift wurden die Wells

mit 1 ml PBS-Puffer gefüllt, der nach 5 Min. entfernt wurde. Während der Wartezeit wurde 0,2 % Triton X angesetzt, das aus 100 % Triton X in zwei Verdünnungsschritten mit PBS als Verdünnungsmedium hergestellt wurde, sodass eine Gesamtverdünnung von 1:500 bestand. Triton-X diente der Permeabilisierung der Zellen. Nach Beendigung des Waschschruttes wurden die Zellen auf den Deckgläschen durch die Zugabe von 4 % PFA fixiert. Hierzu wurden 0,5 ml an 4 % PFA in jedes Well gegeben und die Zellen inkubierten für 5 Min. auf einem Eisblock. Es schloss sich ein identischer Waschschrut wie zu Beginn des ersten Teils an. Nach dem Waschen wurden die Deckgläschen auf eine Well-Platte übertragen. Die angesetzten 0,2 % Triton X wurden nun aufgetragen durch die Pipettierung von 20 µl der 0,2 % Triton X-Lösung auf jedes Deckgläschen. Die Zellen wurden erneut für 5 Min. auf einem Eisblock inkubiert. In dieser Zeit wurde jenes Volumen an Blockierlösung angesetzt, das für den ersten und den zweiten Teil benötigt wurde; dies betrug im vorliegenden Fall 200 µl pro Deckgläschen. Die Blockierlösung beinhaltete als Ausgangsmedium den PBS-Puffer, in dem die 10%-ige BSA- und FcR Blocking Reagent-Stocklösung 1:9 verdünnt wurden, sodass eine 1%-ige Arbeits-Blockierlösung entstand. Nach Behandlung des Zellmaterials mit Triton X wurden pro Deckgläschen 50 µl der angesetzten Blockierlösung gegeben und für 30 Min. belassen. Dadurch wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert.

Zwischenzeitlich wurden zwei Primärantikörper-Gemische angesetzt. Die verwendeten Primärantikörper (s. Tabelle 4) wurden - wie in Abbildung 14 gezeigt - kombiniert und stets (gemeinsam) in der 1%-igen Blockierlösung gelöst. Diese Kombination wurde ausgewählt, da die vorhandenen Antikörper an Anti-GFAP und Anti-Ki67 den Hasen („Rabbit“) als „Host“ bzw. Spezies gemeinsam haben. Sie können nicht gepaart zur Färbung verwendet werden, da der später dazugegebene (einfarbig) fluoreszierende Sekundärantikörper (der gegen „Rabbit“ speziesreaktiv ist) an beide Primärantikörper gleichermaßen binden würde. Deshalb wäre keine (ausreichende) Differenzierung in der Färbung zwischen beiden Zielstrukturen möglich. Der Anti-Nestin-Antikörper dagegen stammt von der Maus („Mouse“) und wird daher durch einen anderen Sekundärantikörper erkannt und gebunden, der speziesreaktiv gegen „Maus“ ist. Daher kann er jeweils mit einem der beiden anderen Primärantikörper kombiniert werden.

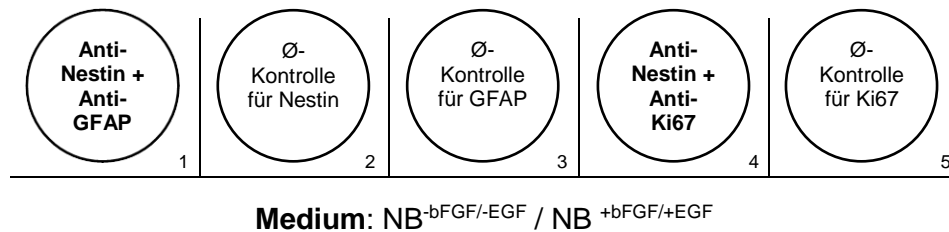


**Abbildung 14: Primärantikörper-Gemische**

Als Primärantikörper wurden Anti-GFAP, -Nestin und -Ki67 verwendet, die mit unterschiedlicher Verdünnung in der Blockierlösung verdünnt wurden. Kombiniert wurde Anti-Nestin (mit „Mouse“ als divergenten Host) jeweils in zwei verschiedenen Gemischen: Im ersten mit Anti-GFAP und im zweiten mit Anti-Ki67, da beide letztgenannten „Rabbit“ als gemeinsamen Host haben und daher nicht kombiniert werden können. Quelle: Eigene Darstellung

Nach erfolgter Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen bei allen Deckgläschen wurden die Primärantikörper-Gemische nach dem Schema in Abbildung 15 (für jedes Medium) mit jeweils 50 µl des festgelegten Gemischs pro Deckgläschen gegeben. Insgesamt wurden pro Zelllinie die Zellen von vier Deckgläschen mit Primärantikörpern markiert (zwei pro Medium), während sechs Deckgläschen kein solches Gemisches erhielten (drei pro Medium). Diese Deckgläschen dienten als Negativkontrolle (Ø-Kontrolle) für die Färbung der drei Zielstrukturen. Dies, weil zu ihnen später nur der Sekundärantikörper gegeben wurde. Diesem fehlte damit die Zielstruktur (die ein Primärantikörper ist) und damit durfte hier kein

Fluoreszieren sichtbar werden. Hierdurch wurde eruiert, ob eine allgemeine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers vorlag [13, S.111]. Falls dies vorgelegen würde, wäre die Aussagekraft der erfolgten Färbung der Antigene eingeschränkt. Die Inkubation fand bei 4 °C im Kühlschrank in einer feuchten Kammer statt und dauert bis zum Folgetag an.



**Abbildung 15: Verteilungsmuster der Primärantikörper**

Die Deckgläschen von jeder Zelllinie wurden für jedes Medium mit 1 bis 5 nummeriert. Zum ersten wurden die Antikörper Anti-Nestin und -GFAP gegeben. Damit wurden hier diese zwei Antigene als Zielstrukturen markiert. Zum Zweiten wurde kein Primärantikörper gegeben, sondern nur der sekundäre, der Anti-Nestin als Antigen besitzt. Das dritte Deckgläschen erhielt nur den Sekundärantikörper gegen Anti-GFAP. Zum vierten Deckgläschen wurden die beiden Zielstrukturen Nestin und Ki67 durch die Primärantikörper Anti-Nestin und Anti-Ki67 markiert. Das fünfte Deckgläschen erhielt nur den Sekundärantikörper mit Anti-Ki67 als Zielstruktur. Quelle: Eigene Darstellung

### 4.5.5 Auftragen der Sekundärantikörper

Im zweiten Teil der Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Deckgläschen am Folgetag dreimal gewaschen mit jeweils 50 µl PBS, um die Blockierlösung bzw. Primärantikörper-Gemische auszuwaschen. Es folgte eine erneute Blockierung mit 50 µl der Blockierlösung pro Deckgläschen für 30 Min. In der Zwischenzeit wurde das Sekundärantikörper-Gemisch bei dunkler Raumbeleuchtung angesetzt. Hierzu wurden die in Tabelle 4 angegebenen Sekundärantikörper verwendet und beide mit einer 1:500 Verdünnung in PBS-Puffer gelöst. Es wurde (so wie in 4.5.1 beschrieben) eine simultane Mehrfachfärbung angewandt. Dabei war der erste Sekundärantikörper mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 markiert. Da er gegen „Maus“ speziesreaktiv ist, band er an den Primärantikörper Anti-Nestin. Der zweite Sekundärantikörper besaß den roten Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 555 und band an Primärantikörper, die aus „Hase“ stammen, in diesem Fall an Anti-GFAP und Anti-Ki67. Da bei jeder Zelllinie zum Zweiten der Deckgläschen (s. Abbildung 15) die Primärantikörper Anti-Nestin und Anti-GFAP simultan gegeben wurden, banden auch beide Sekundärantikörper an das Zellmaterial dieser Deckgläschen. Damit wurden die zugehörigen Zellen, falls sie beide Antigene exprimierten, doppelt mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt und markiert. Selbiges gilt für die Zellen des vierten Deckgläschen jeder Zelllinie (und Medium-Kondition), mit dem Unterschied, dass hier Anti-Nestin und Anti-Ki67 simultan gegeben wurden. Hier lag demnach ebenso eine Doppeltmarkierung vor, wenn die Zellen beide Antigene exprimierten.

Auf jedes Deckgläschen wurden folgend 50 µl des Sekundärantikörper-Gemisches gegeben und unter Lichtausschluss für 60 min inkubiert. Es erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschschriff mit PBS-Puffer. Anschließend wurde der blaue Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zu jedem Deckgläschen gegeben, der als Gegenfärbung diente. Dieser Farbstoff bindet spezifisch an die zelluläre DNA (-Doppelhelix) und eignet sich daher zur Färbung von Zellkernen [454, S.276]. Hierzu wurde DAPI 1:1000 in PBS-Puffer verdünnt. Aus dieser Gebrauchslösung wurden 50 µl pro Deckgläschen aufgetragen und für 15 Min. inkubiert. Durch die Färbung mit DAPI wurden alle vorhandenen Zellen gefärbt und markiert. Die aufgetragene Lösung wurde hiernach mit Filterpapier abgesaugt. Final wurden die Objektträger beschriftet und mit dem Klebemittel Fluorescence Mounting Medium (Dako) pro Deckgläschen bestückt. Das Klebemittel diente zur Fixierung der Deckgläschen, die nun durch Drehung invers auf das Klebemittel auf den Objektträgern positioniert wurden. Die Objektträger wurden zum Trocknen über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Immunfluoreszenzfärbung war damit abgeschlossen. Die Zellen wurden zeitnah (nach 5 Tagen) fotografiert, da die Fluoreszenzintensität nachlässt.

#### 4.5.6 Dokumentation der gefärbten Zellen

Die Dokumentation der durchgeführten Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte über das Fluoreszenzmikroskop DM IRB (Leica) und mithilfe der digitalen Farbkamera DFC480 (Leica) bei einer 20-fachen Vergrößerung. Exemplarische Zellen wurden bei 40-facher Vergrößerung fotografiert. Von jeder Zelllinie und je Färbung (aus Nestin+GFAP und Nestin+Ki67) wurden dabei ausgehend von der DAPI-Zellkernfärbung pro Mediumkondition (mit und ohne Wachstumsfaktoren) drei Regionen mit hoher Zelldichte ausgewählt. Die DAPI-Färbung einer Region wurde fotografiert. Im Anschluss wurden beide Fluoreszenzfilter (entsprechend der Sekundärantikörper, die in roter und grüner Farbe fluoreszierten) nacheinander eingestellt und die gleiche Region fotografiert, sodass in der späteren Bildbearbeitung die Färbungen überlagert und damit verschiedene Färbungen der gleichen Zellen visualisiert werden konnten. Die Spektren der Wellenlängen für die Anregung (Absorption) und Emission waren wie folgt:

Tabelle 12: Absorptions- und Emissionsspektren

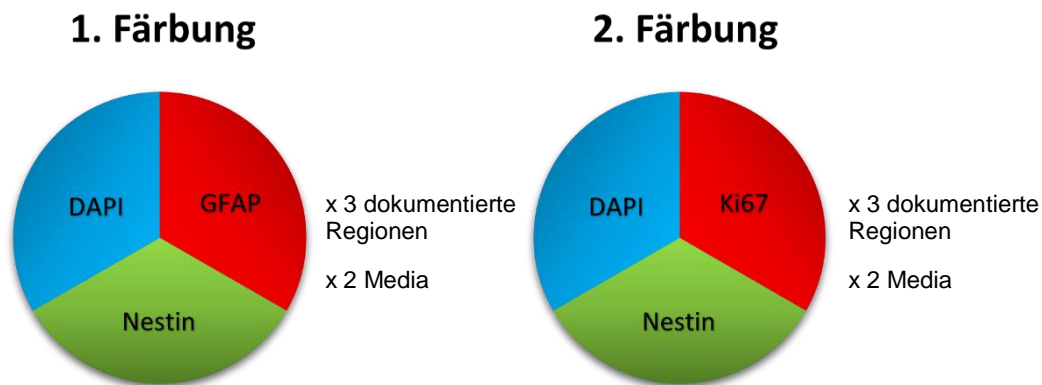
Färbung durch...	Absorption	Emission	Farbe
DAPI	358	461	Blau
Alexa Fluor® 488	494	519	Rot
Alexa Fluor® 555	554	567	Grün

Im Live-Bild wurde die Belichtungszeit für jeden Fluoreszenzfilter so hoch wie nötig und so gering wie möglich eingestellt, sodass die bildliche Trennschärfe zwischen stark ausgeprägter Färbung (als Indikator für eine hohe Genexpression der Zielstruktur) und schwach ausgeprägter Färbung (als Indikator für eine geringe Genexpression der Zielstruktur) hoch war. Die Belichtungszeit für die Färbungen und Zelllinien ist (in beiden Media identisch) in Tabelle 13 angegeben. Für alle Zelllinien wurden zwecks späterer Präsentation ebenso Bilder derselben Regionen in höherer Belichtungszeit aufgenommen, die eine höhere Farbintensität innehatten.

Tabelle 13: Belichtungszeiten der Färbungen

Gefärbte Zielstrukturen	Belichtungszeit	
	Bestrahlte Zelllinien (#1051_IR, #1051_IR_DMSO, #1051_IR_TMZ)	Unbestrahlte Zelllinien (#1051, #1051_DMSO, #1051_TMZ)
Zellkern (DAPI)	100 ms	100 ms
Nestin	4 s + 6 s	0,7 s + 1,5 s
GFAP	1 s + 4s	0,7 s + 1,5 s
Ki67	1,5 s + 3 s	0,7 s + 1,5 s

Insgesamt ergaben sich pro Zelllinie folgende Färbungskombinationen und Bildanzahl:



**Abbildung 16: Färbungskombinationen pro Zelllinie**

Die durchgeführten Färbungen hatten drei verschiedene Zielstrukturen: Zellkern (DAPI), Nestin, GFAP und Ki67. Diese wurden (bei denselben Zellen pro Färbung) in zwei verschiedenen Kombinationen angefärbt. Die erste Färbungskombination vereinte die Anfärbung der Zellkerne (DAPI, in blau), Nestin (in grün) und GFAP (in rot.) Die zweite Färbungskombination beinhaltete das Anfärben der Zellkerne (DAPI), Nestin (in grün) und Ki67 (in rot). Diese beiden Färbungskombinationen fanden für beide Media (NB-bFGF/-EGF und NB +bFGF/+EGF) statt. Bei der Bilddokumentation wurden je Färbung drei verschiedene Regionen dokumentiert. Quelle: Eigene Darstellung

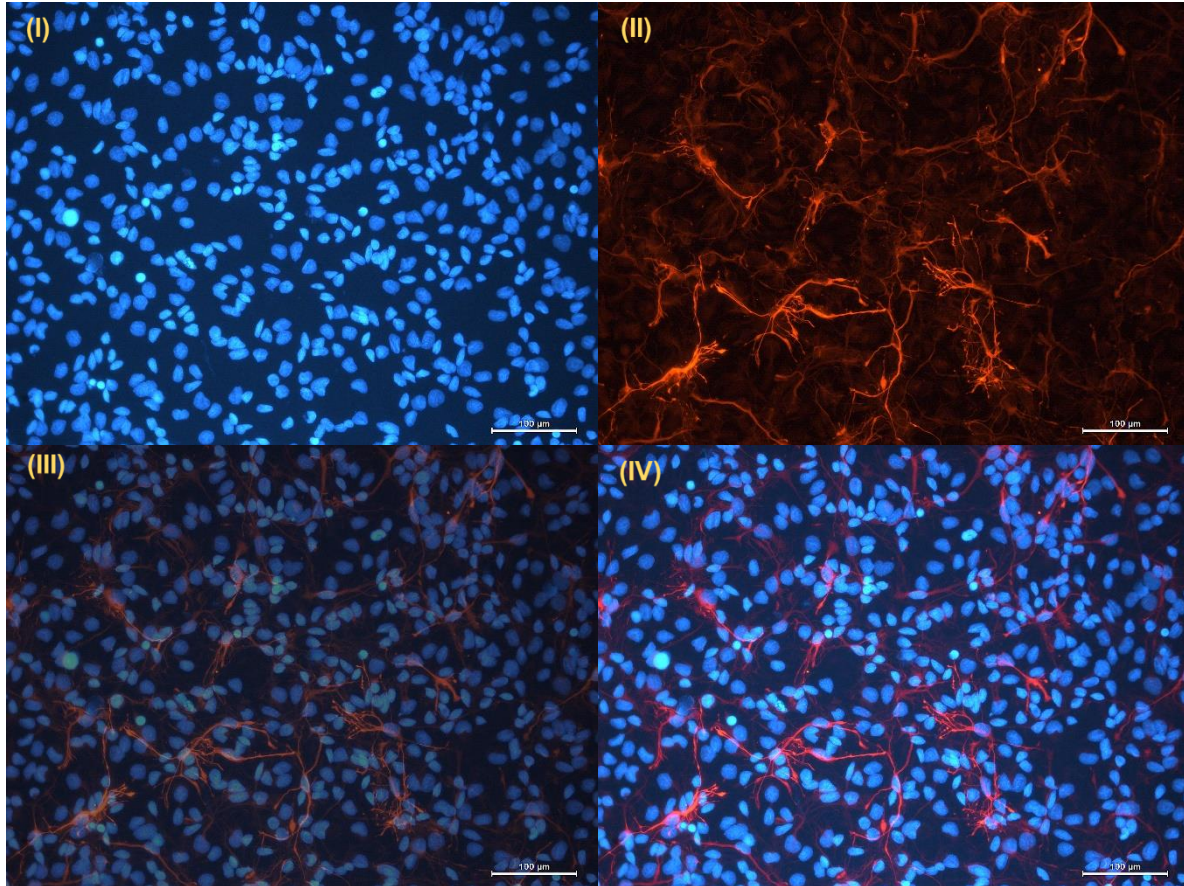
### 4.5.7 Immunfluoreszenz-Auswertung

Das Ziel der Auswertung der Bilder, die nach der immunfluoreszenten Färbung der Zellen aufgenommen wurden, war die Häufigkeitsbestimmung der gefärbten Zellen für die unterschiedlichen Immunfärbungen. Durch die Färbung der Zellkerne mit DAPI wurde eine unspezifische Färbung aller vorhandenen Zellen realisiert. Diese Färbung diente daher als Referenz für die Gesamtanzahl an Zellen. Die Antikörper-Immunfärbung dagegen diente als spezifische Färbung von Zielstrukturen bzw. -proteinen. Eine erfolgte, sichtbare Immunfärbung einer Zelle bedeutete die stattgefundenene Proteinexpression des Zielproteins (und Aktivität des jeweiligen Gens) und diente damit als Positivreaktion. Das exprimierte Zielprotein wurde demnach identifiziert und mittels Primär- und Sekundärantikörpern markiert. Als Negativreaktion wurde eine fehlende Immunfärbung einer Zelle eingestuft; das Zielprotein wurde demzufolge nicht exprimiert und das zugehörige Gen war inaktiv zum Zeitpunkt der Färbung. Die Auswertung umfasste drei Arbeitsschritte. Zuerst wurden die Bilder zur qualitativen Aufwertung und zur Vereinfachung der Analyse fotografisch bearbeitet. Im nächsten Schritt wurden sie fotografisch ausgewertet, durch Zellzählung der erfolgten Färbungen und damit wurden die Häufigkeiten der stattgefundenen Färbungen bestimmt. Zuletzt wurden diese Häufigkeiten statistisch auf Signifikanz untersucht.

#### 4.5.7.1 Fotografische Bearbeitung der Immunfluoreszenz-Bilder

Die fotografische Bearbeitung der Bilder wurde für alle Bilder (mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop Elements 2021) gleichermaßen durchgeführt, sodass sie in den bildlichen Aspekten (der Schärfe, Helligkeit, Überlappung etc.) übereinstimmten. Für jede Zellreihe und Kondition (NB<sup>-bFGF/-EGF</sup> oder NB<sup>+bFGF/+EGF</sup>) lagen Bilder von drei Regionen (vom Deckgläschen) der konkomitanten Mehrfachfärbung DAPI, Nestin und GFAP und von drei Regionen der Mehrfachfärbung DAPI, Nestin und Ki67 vor. Die Schärfe der Bilder wurde gleichermaßen erhöht und optimal eingestellt. Es folgten Überlappungen zweier Bilder in verschiedenen Kombinationen und digitalen Mischmodi (der Bildbearbeitungssoftware), um die spätere fotografische Auswertung zu präzisieren und verschiedene Referenzen bei der Unterscheidung einer Positiv- von einer Negativreaktion zu besitzen. DAPI-Bilder wurden unter partieller Deckkraft mit den Bildern von Nestin, GFAP und Ki67 per Standard-Mischmodus (reine Überlappung ohne weitere Effekte) überlappt. Zusätzlich wurden die DAPI-Bilder mit jeder anderen Färbung mit einem bestimmten Mischmodus überlappt.

Dies erfolgte bei GFAP-Bildern mit dem Mischmodus „Aufhellen“ mit vollständiger Deckkraft (100%) beider Färbungen (nachfolgend „Modus 2“ genannt). Hier wählte die Software für jedes Bildpixel die jeweils hellere (Ausgangs-)Farbe von beiden Bildern für das Ergebnisbild aus [456]. Es resultierte eine stärkere Hervorhebung der GFAP-Färbung (und damit eine erleichterte Zuordnung der Zellfortsätze zu den Zellen), ohne die Deckkraft der DAPI-Färbung zu reduzieren (in Kontrast zum Standard-Mischmodus), wie in der folgenden Abbildung erkennbar ist:

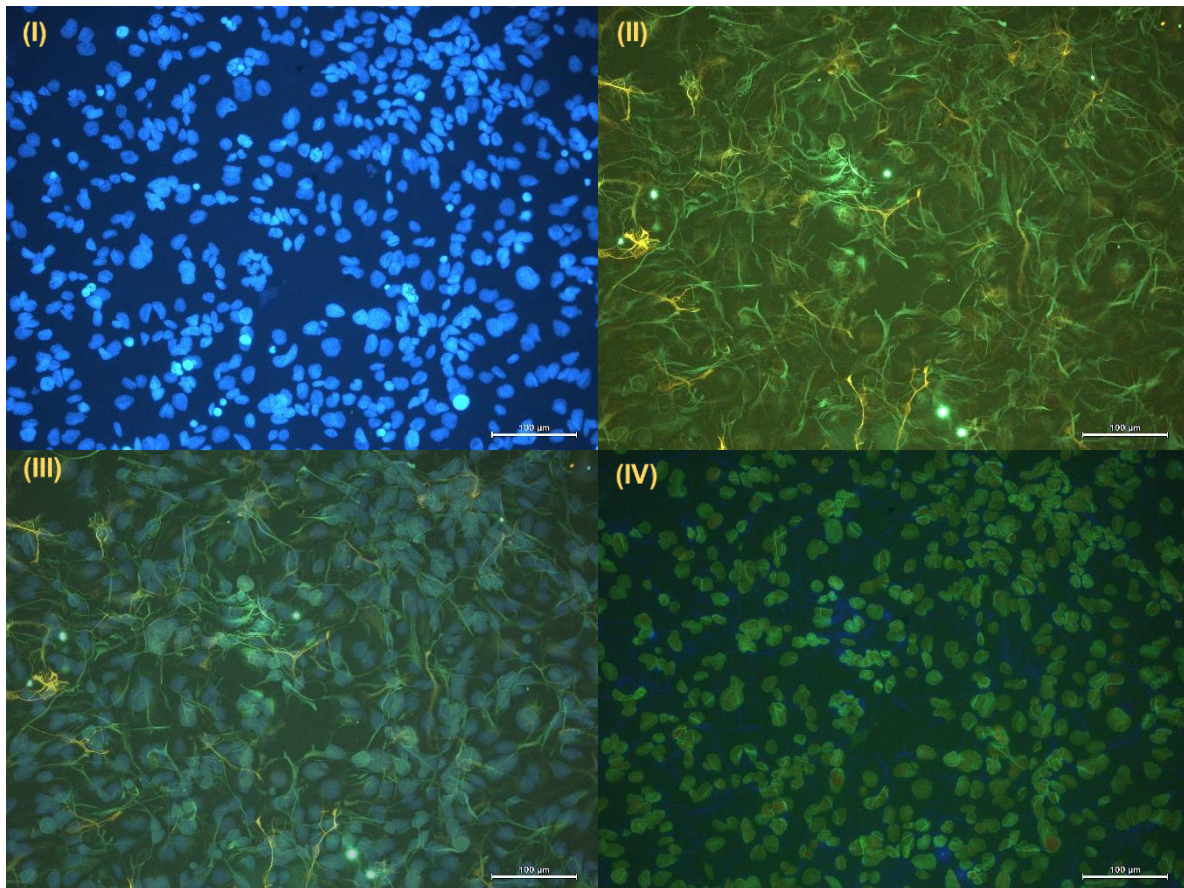


**Abbildung 17: Mischmodi von DAPI- und GFAP-Färbung**

Die Überlappung der DAPI- (I) und GFAP-Färbungen (II) erfolgte im Standard-Mischmodus (III) und im Modus 2 (IV). Die Überlappung im (III) erfolgte unter partieller Deckkraft beider Färbungen, sodass eine verstärkte Deckkraft der GFAP- zu Lasten der DAPI-Färbungen geschah. In (IV) dagegen erfolgte die Überlappung mit maximaler Deckkraft beider Färbungen, sodass eine stärkere Hervorhebung der GFAP-Färbung realisiert wurde und zugleich die Zuordnung der gefärbten (roten) Zellfortsätze zu den Zellen erleichtert wurde. Quelle: Eigene Darstellung

Mit Nestin-Bildern erfolgte die Überlappung im Mischmodus „Abdunkeln“ mit 100% Deckkraft (nachfolgend „Modus 3“ genannt). Dabei wurde von der Software für jedes Bildpixel die dunklere Farbe von beiden Ausgangsfarben (DAPI und Nestin) für das Ergebnisbild ausgewählt [456]. Das Ergebnisbild zeigte einerseits eine Reduzierung der Zellform auf die Form des (DAPI-gefärbten) Zellkerns, unter Subtraktion der Nestin-gefärbten Zellbereiche außerhalb des Zellkerns. Andererseits wurde die reduzierte Form mit der Nestin-Färbung gefüllt (s. Abbildung 18).

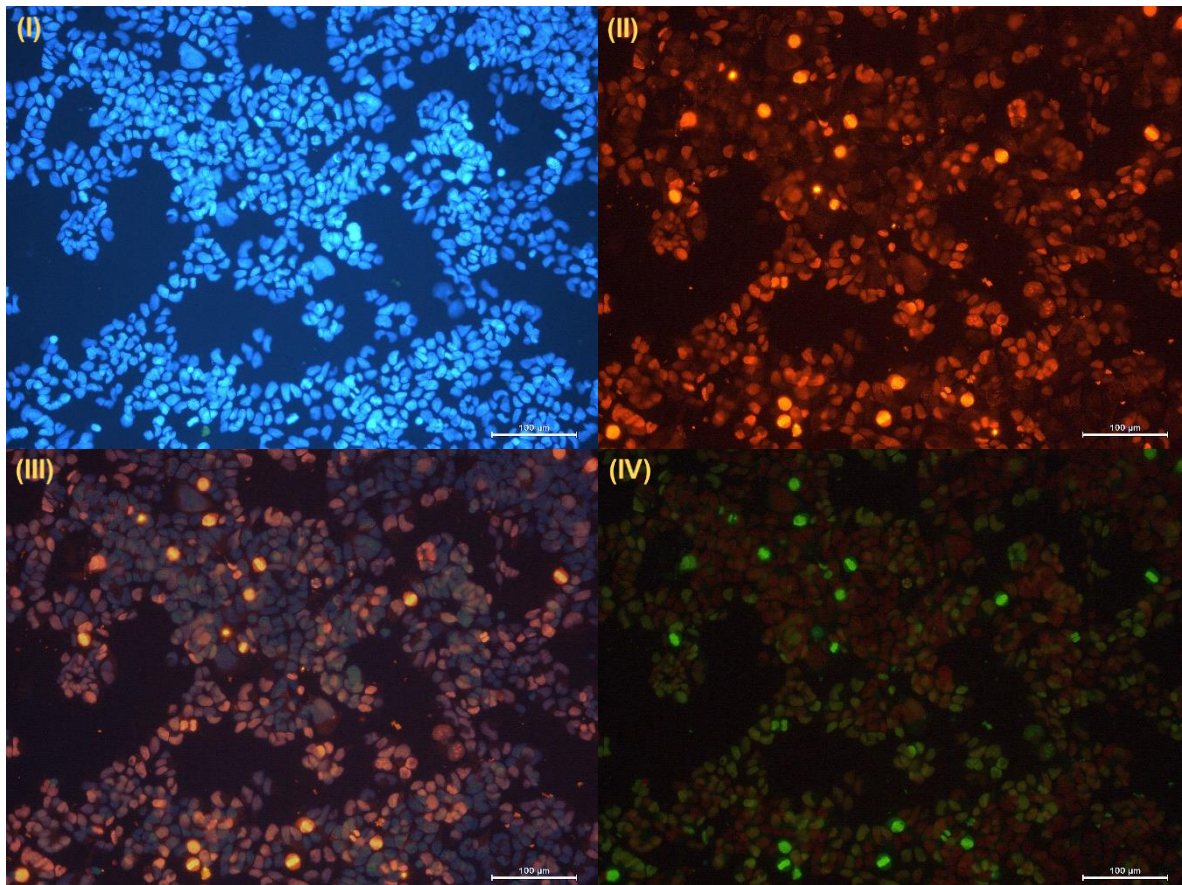
Der Nutzen hiervon war die vereinfachte Bestimmung der Nestin-positiven und -negativen Zellen im weiteren Schritt. Da nahezu alle Zellen Nestin-positiv waren, erleichterte diese Überlappung das Erfassen dieser durch Ersparung des manuellen Zählens (s. 4.5.7.2).



**Abbildung 18: Mischmodi von DAPI- und Nestin-Färbung**

Die DAPI- (I) und Nestin-Färbungen (II) wurden durch zwei Mischmodi überlappt. Im Standard-Mischmodus (III) erfolgte eine Überlagerung mit partieller Deckkraft beider Färbungen. Im Modus 3 (IV) erfolgte eine Reduzierung der Zellform auf die Form des (DAPI-gefärbten) Zellkerns. Zugleich wurde dieser mit der Nestin-Färbung ausgefüllt. Dies ermöglichte die schnelle Identifizierung Nestin-negativer Zellen. Quelle: Eigene Darstellung

Zuletzt wurde der Mischmodus „Abdunkeln“ auch zur Überlagerung der DAPI- mit den Ki67-Bildern verwendet (mit 100% Deckkraft; nachfolgend „Modus 4“ genannt). Da die gefärbten Zellbereiche in beiden Färbungen identisch waren (nämlich auf den Zellkern beschränkt), wurde die Zellform hier nicht reduziert. Dagegen fand eine (digitale) Vermischung des blauen Farbtons (der DAPI-Färbung) und des rötlichen Farbtons (der Ki67-Färbung) statt. Die Ergebnisfarbe präsentierte sich als grüner Farbton in Abstufungen (s. Abbildung 19). Der Zweck dieser Überlappungsart lag in der leichteren Identifizierung und Differenzierung zwischen starker, mittlerer und schwacher Ki67-Färbung bzw. Expression (s. 4.5.7.2).



**Abbildung 19: Mischmodi von DAPI- und Ki67-Färbung**

Die Überlappung der DAPI- (I) und Ki67-Färbung (II) wurde über zwei Mischmodi durchgeführt. In (III) ist der Standard-Mischmodus dargestellt, der unter partieller Deckkraft beider Färbungen geschah. Verschiedene Farbabstufungen der orange-rosanen Ergebnisfarbe sind erkennbar, die unterschiedliche Expressionsstärken von Ki67 anzeigen. Zur leichteren Differenzierung dieser erfolgte eine weitere Überlappung im Modus 4 (IV), wodurch eine (digitale) Farbmischung der beider Färbungen aus DAPI und Ki67 eine grün-braune Ergebnisfarbe mit Abstufungen ergab. Quelle: Eigene Darstellung

### 4.5.7.2 Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Bildanalysesoftware ImageJ. Sie bestand darin, die Häufigkeit der Zellen zu bestimmen, die eine Positivreaktion und damit Anfärbung eines (oder mehrere) der Zielproteine aus Nestin, GFAP und Ki67 zeigten und den Anteil dieser Zellen an der verwendeten Gesamtpopulation. Die Häufigkeitsbestimmung der Zellen, die positiv reagierten auf die Nestin-, GFAP- und Ki67-Färbungen, folgte einer dichotomischen Einteilung in positive und negative Zellen.

Im ersten Schritt wurde die Gesamtpopulation als Referenzwert durch die Quantifizierung der DAPI-Färbung bestimmt, da DAPI die Zellkerne bzw. DNA anfärbt und damit jede vitale Zelle DAPI-positiv ist. Im nächsten Schritt erfolgte die Zählung der Nestin-positiven Zellen. Da Nestin ein Stammzellmarker ist, exprimiert die vorliegende Zelllinie #1051 als Glioblastom-abgeleitete Tumorstammzell-angereicherte Linie diesen Marker ubiquitär. Nach der Nestin-Zählung erfolgte die Zählung der GFAP-positiven Zellen. Grundlage hierfür bildeten einerseits die beiden GFAP-Färbungen pro Region mit unterschiedlichen Belichtungszeiten (s. Tabelle 13). Während das Bild mit hoher Belichtungszeit dazu diente, die GFAP-positiven Zellen zu identifizieren, wurde das Bild mit niedriger Belichtungszeit dazu verwendet, eine Positivreaktion im Kontrast zum Hintergrundrauschen zu definieren. Hierdurch konnte das Signal-Rausch-Verhältnis möglichst hoch angesetzt werden und die Positivreaktion einheitlich für alle Zelllinien definiert werden. Zuletzt wurde die Anzahl Ki67-positiver Zellen bestimmt. Hier erfolgte die Einteilung dichotomisch (in positive und negative Zellen). Die Identifizierung der Ki67-positiven Zellen erfolgte unter Zuhilfenahme mehrerer Modi desselben

Färbungsbildes. Zum einen wurde das Ki67-Bild mit niedriger Belichtungszeit (s. Tabelle 13) verwendet, um eine positive Reaktion in Abgrenzung zum Hintergrundrauschen zu definieren. Das Ki67-Bild mit höherer Belichtungszeit wurde gewählt, um die Ki67-positiven Zellen zu identifizieren.

### 4.5.7.3 Statistische Auswertung

Nach der fotografischen Auswertung lagen die Informationen über die Expressionshäufigkeit der oben genannten Proteine in den unterschiedlichen Zelllinien in Form von Kontingenztafeln vor. Anhand derer konnte der Anteil der positiv-gefärbten Zellen bestimmt und graphisch dargestellt werden. Die deskriptive Statistik wurde mithilfe von SPSS-Version 27 erstellt. Dargestellt wurde sie anhand der absoluten und relativen Häufigkeit für alle Färbungen. Zur Bestimmung, ob die vorliegenden Unterschiede unabhängig voneinander sind (und damit signifikant verschieden) wurden paarweise Vergleiche zwischen den verschiedenen Zelllinien über den zweiseitigen exakten Test nach Fisher durchgeführt. Die Anwendbarkeit von diesem war bei den vorliegenden Daten aus kategorialen unabhängigen Ausgangsvariablen und kategorialen abhängigen Zielvariablen gegeben. Das Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  wurde festgelegt. Bei multiplen Tests wurde eine Alpha-Korrektur über die Korrektur nach Benjamini-Hochberg vorgenommen. Diese wurde für die Testung bzw. Daten der GFAP-Expression und für die Daten der Ki67-Expression separat durchgeführt. Dies, weil beide Datensätze getrennt und unabhängig voneinander sind, da keine parallele Färbung von Zellen für beide Proteine erfolgte. Für den GFAP-Datensatz betrug das korrigierte Signifikanzniveau  $\alpha=0,04167$  und für den Ki67-Datensatz  $\alpha=0,0380$ . Die Korrekturen berücksichtigen die multiplen Tests, die die Nestin-Expression betreffen, da hier voneinander abhängige Daten vorliegen.

## 4.6 Live-Cell-Imaging-Mikroskopie

Die Bildgebung bzw. Mikroskopie lebendiger Zellen (live-cell imaging) ermöglicht die Beobachtung dieser in Echtzeit und die Analyse von dynamischen biologischen Prozessen wie ihrer Proliferation und Differenzierung. In der vorliegenden Arbeit wurde sich diese Untersuchungsmethode zu Nutze gemacht, um die durchschnittliche Verdopplungszeit der verschiedenen Zelllinien zu bestimmen.

Hierzu wurden im ersten Schritt ornithinbeschichtete Deckgläschen hergestellt (s. 4.5.2) und auf eine 24-Well-Platte übertragen. Im zweiten Schritt wurden die Zellsuspensionen wie in 4.1.2 beschrieben passagiert. Das benötigte Suspensionsvolumen für 100 000 Zellen wurde berechnet und auf die Deckgläschen transferiert. Zur Adhäsion der Zellen wurde die Well-Platte samt der Deckgläschen nun für zehn Minuten in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt. Hiernach erfolgte die Beurteilung des Adhäsionsgrades im Lichtmikroskop; war dieser ausreichend wurde in jedes Well (d.h. zu jedem Deckgläschen und jeder Zellkultur) 1 ml NB<sup>+bFGF/+EGF</sup>-Medium transferiert. Unmittelbar danach wurden die Well-Platten unter den Live Zell-Analysator im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei konstanter Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % positioniert. Die Bildeinstellungen an Schärfe und Kontrast wurden optimiert und die Vergrößerung auf ca. 20-fach eingestellt. Die Bildfrequenz der über die Mikroskopkamera dokumentierten Bilder wurde auf 1/30 Min. gestellt. Durch die doppelte Mikroskopeinheit konnten TMZ- und Kontrollgruppe parallel beobachtet und verglichen werden. Nach zehn Tagen wurde die Fotoaufnahme gestoppt und das gewonnene Bildmaterial ausgewertet.

### 4.6.1 Auswertung der Verdopplungszeit via Live-Cell-Imaging

Zur Bestimmung der Verdopplungszeit der unterschiedlichen Zelllinien erfolgte eine fotografische Auswertung des zugrundeliegenden Bildmaterials. Die beobachteten Zellen wurden einzeln bis zu ihrer Teilung verfolgt, und anhand der Bildnummerierung konnte die zeitliche Differenz zwischen Aufnahmestart, der unmittelbar nach dem Passagieren der Zellen stattfand, und der Zellteilung bestimmt werden. Auf diese Weise wurden pro Zelllinie 65 bis ca. 200 Zellen beobachtet. Die gewonnenen metrischen (Zeit-)Daten wurden im ersten Schritt durch eine deskriptive Statistik auf ihre Mittelwerte, Mediane und Standardabweichung

untersucht. Im zweiten Schritt wurde der Shapiro-Wilk-Test zur Überprüfung einer möglichen Normalverteilung angewandt, jedoch lag keine hinreichende Normalverteilung vor. Der Test war bei allen vier Zelllinien signifikant. Daher kamen nicht-parametrische Tests zur Anwendung. Für diese wurde das Signifikanzniveau mit  $\alpha=0,05$  festgelegt. Als Äquivalent zur ANOVA bzw. einfaktorielle Varianzanalyse wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test angewandt. Hiermit wurde untersucht, ob sich die zentrale Tendenz der vorliegenden unabhängigen Stichproben (d.h. Zelllinien) unterscheidet. Da dieser ein signifikantes Ergebnis zeigte, wurde zum paarweisen Vergleich der unabhängigen Stichproben der Mann-Whitney-U-Test benutzt, um zu untersuchen, ob die zentrale Tendenz zweier Zelllinien divergiert und mit welcher Signifikanz. Da bei den vorliegenden Zelllinien somit multiples Testen angewandt wurde, erfolgte die Alpha-Korrektur nach Benjamini-Hochberg, sodass sich ein korrigiertes Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  ergab. Zur Bestimmung der Effektstärke wurde als Effektmaß Cohen's  $d_s$  unter Verwendung der gepoolten Standardabweichung für ungleich große Gruppen herangezogen. Die verwendete Formel lautet (aus [457]):

$$\text{Cohen's } d_s = \frac{M_2 - M_1}{\sqrt{\frac{(n_1-1) \times SD_1^2 + (n_2-1) \times SD_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}}$$

mit

$M_1$  = Mittelwert der Stichprobe 1

$M_2$  = Mittelwert der Stichprobe 2

$SD_1$  = Standardabweichung der Stichprobe 1

$SD_2$  = Standardabweichung der Stichprobe 2

$n_1$  = Stichprobenumfang der Stichprobe 1

$n_2$  = Stichprobenumfang der Stichprobe 2

Zur Interpretation dienten folgende Richtwerte [457]:

Kleiner Effekt  $|d_s| = 0,2$

Mittlerer Effekt  $|d_s| = 0,5$

Großer Effekt  $|d_s| = 0,8$

## 4.7 FAIRE

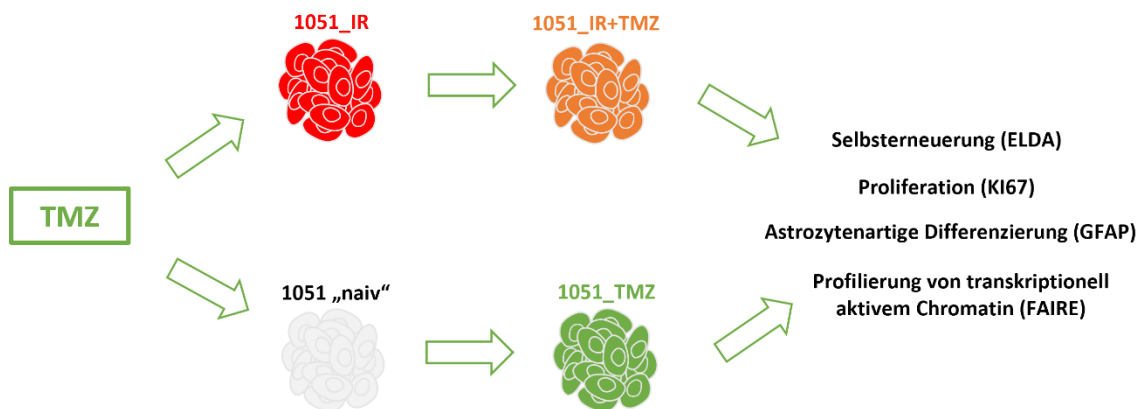
Das Prinzip wie Vor- und Nachteile der FAIRE-Methode wurden bereits in 2.5.7.2.3 erläutert.

In der vorliegenden Arbeit galt der Fokus der Optimierung der FAIRE-Methode für Glioblastom-abgeleitete Tumorstammzellen, die als nicht-adhärenente Zellen in einer Suspension kultiviert werden. Dies erfolgte durch einen Optimierungsprozess der FAIRE-Methode, die an den unterschiedlichen #1051-Zelllinien aus 3.1 angewandt wurde. Es resultierte eine Vielzahl an Modifikationen des ursprünglichen Protokolls in [9], um ein zufriedenstellendes Resultat der FAIRE-Methode anhand der Menge und Reinheit der gewonnenen FAIRE-DNA zu erzielen. Diese werden in 5.6.1 beschrieben.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Zielsetzung und Design der Studie

Das Hauptziel des Projekts war es festzustellen, ob die TMZ-Behandlung allein oder nach ionisierender Strahlung (IR für „ionizing radiation“) einen Einfluss auf die Chromatinstruktur und DNA-Methylierungsmuster in humanen GSC hat. Um diese Frage zu klären, wurden in dieser Studie experimentelle Modelle von TMZ-behandelten GSC erstellt, wie in Abbildung 22 dargestellt. Die zugrundeliegende Idee ist es, die Auswirkungen von TMZ auf die Proliferation, Selbsterneuerung, Differenzierung und Chromatinstruktur von GSC im Kontext von neu diagnostiziertem GB (#1051\_TMZ) oder nach einer Strahlenbehandlung (#1051\_IR+TMZ) zu rekapitulieren und zu charakterisieren, wie in Abbildung 20 dargestellt.



**Abbildung 20: Studiendesign zur Charakterisierung von phänotypischen und epigenetischen Veränderungen in GSC nach TMZ-Behandlung**

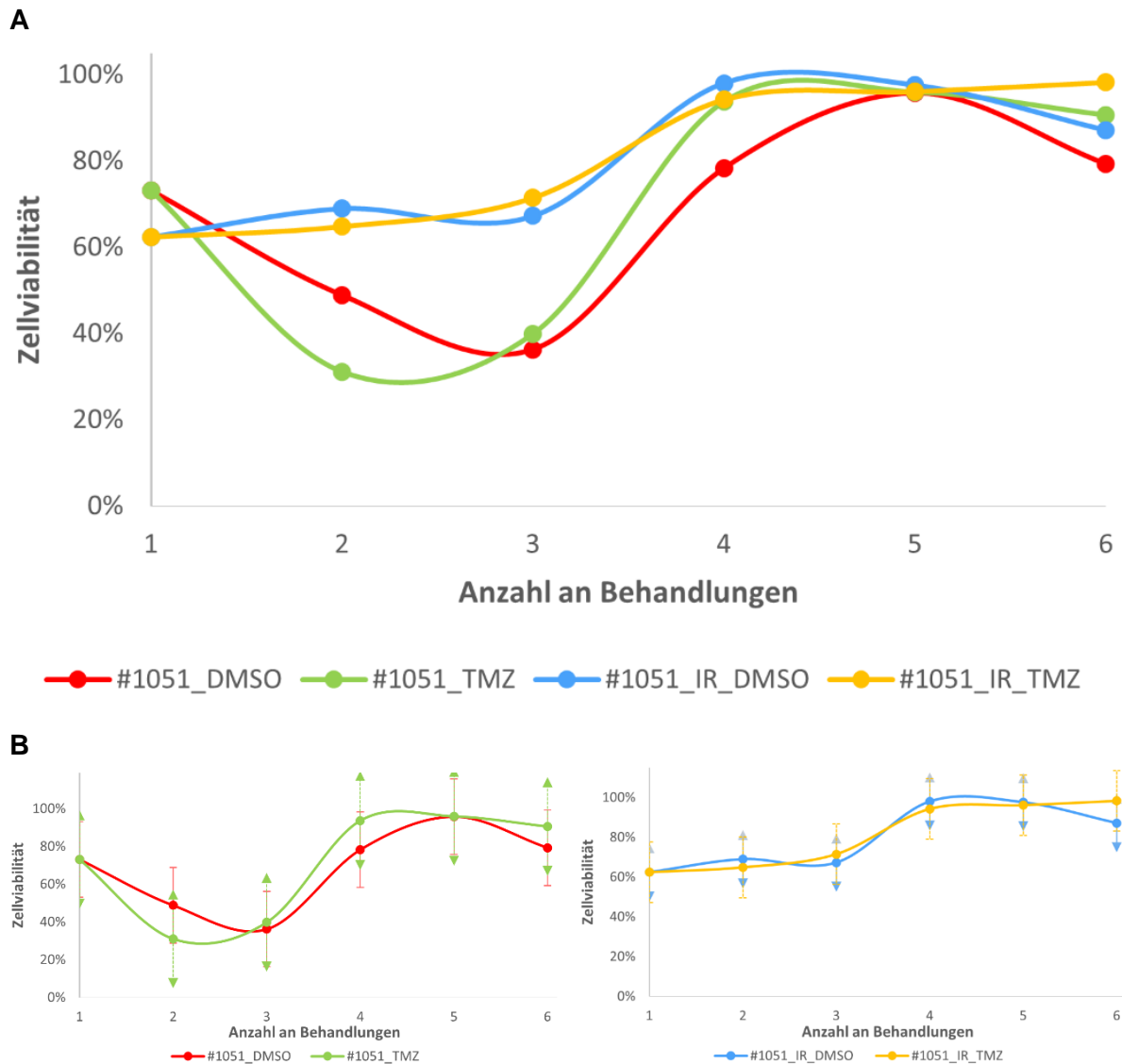
Zur Rekapitulation von TMZ-induzierten Veränderungen in GSC mit und ohne Strahlenbehandlung wurden unbehandelte („naive“) sowie vorbestrahlte (IR) Zellklone der GSC-Zelllinie #1051 in mehreren Zyklen mit TMZ behandelt. Hiernach schloss sich eine Untersuchung ihrer Kapazität zur Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung sowie eine Profilierung ihres transkriptionell aktives (offenes) Chromatin an. Quelle: Eigene Darstellung

### 5.2 Etablierung eines experimentellen Modells für TMZ-resistente GSC

Um die Auswirkungen von TMZ auf der phänotypischen und epigenetischen Ebene zu untersuchen, wurde ein experimentelles Modell für TMZ-resistente GSC wie in Methoden (s. 4.3) beschrieben etabliert. Die GSC-Linien #1051 und #1051\_IR wurden einer TMZ-Behandlung mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  unterzogen - einer Konzentration, die über der im Gehirn von GBM-Patienten gemessenen TMZ-Konzentration liegt (30-50  $\mu\text{M}$ , [144, 458]). Der Grundgedanke war, dass das Überleben von GSC unter der Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  TMZ in vitro die Tumoresistenz gegenüber klinisch erreichbaren TMZ-Dosen, die für die GB-Therapie verwendet werden, angemessen rekapitulieren sollte. GSC wurden in Anwesenheit von TMZ für eine Gesamtzeit von ca. 16 Wochen (6 Passagen) gehalten, wobei die TMZ-Lösung nach jeder Passage erneuert wurde. Während der Selektion wurde die Viabilität der Zellen mit Hilfe des Trypanblau-Assays überwacht (s. 4.1.2). Die elterliche Linie #1051 zeigte einen biphasischen Erholungstrend, bei dem das Niveau der Viabilität der Population nach den ersten drei Durchgängen der TMZ- oder DMSO-Behandlung abnahm, aber nach dem vierten Durchgang stetig anstieg (s. Abbildung 21). Bemerkenswert ist, dass die Veränderungen der Viabilität zwischen DMSO- und TMZ-behandelten Zellen sehr ähnliche Profile zeigten. Dies deutet darauf hin, dass der anfängliche Rückgang der Viabilität eher auf die toxischen Wirkungen von DMSO als auf die zytotoxischen Wirkungen von TMZ zurückzuführen ist. Interessanterweise zeigte die #1051\_IR-Linie sowohl nach der DMSO- als auch nach der TMZ-Behandlung eine deutlich geringere Reduktion der Viabilität, was auf eine allgemein größere Robustheit der vorbestrahlten GSC hindeutet. Nach dem vierten Behandlungszyklus hatte sich die Viabilität aller Linien eingependelt und blieb auf einem

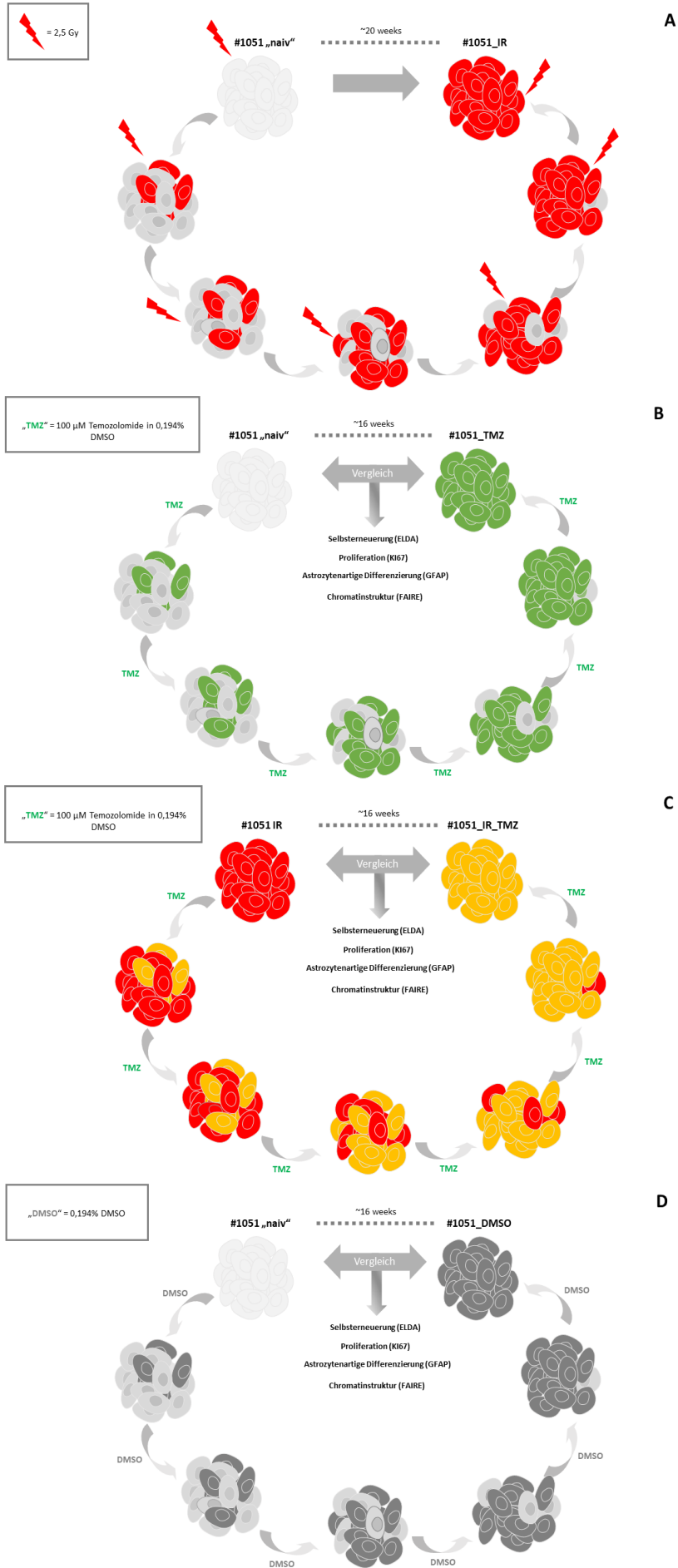
## Ergebnisse

vergleichbaren und konstanten Niveau, was als Kriterium für die Beendigung des Selektionsprozesses herangezogen wurde.



**Abbildung 21: Zellviabilität während des Selektionsprozesses**

Darstellung der Zellviabilität (in % auf der y-Achse) in Abhängigkeit von der Anzahl an Behandlungen (auf der x-Achse) mittels TMZ bzw. DMSO. Die Viabilität der Subpopulationen der GSC-Linie #1051 zeigt während des Selektionsprozesses mittels TMZ (und DMSO) einen biphasischen Verlauf für alle Zelllinien (A). Die vorbestrahlten Zelllinien (#1051\_IR\_TMZ und #1051\_IR\_DMSO) zeigen sich gegenüber der Zytotoxizität der Behandlung resistenter mit geringerer Reduktion der Viabilität. Zur vereinfachten Übersicht sind die jeweiligen Standardabweichungen der Subpopulationen in (B) dargestellt. Quelle: Eigene Darstellung



### Abbildung 22: Selektion von TMZ-resistenten Populationen der GSC-Linie #1051

Schematische Darstellung der experimentellen Ansätze zur Selektion von TMZ-resistenten Populationen aus unbestrahlten (B) oder vorselektierten strahlenresistenten Populationen (C) der GSC-Linie #1051. Die Vorselektion strahlenresistenter GSC-Klone (A) wurde vorab durch (Kalasauskas et al. 2020) durchgeführt [1]. Die Selektion umfasste sechs Behandlungszyklen mit TMZ, für welches DMSO als Dissoziationsmedium verwendet wurde. Als Kontrollgruppe wurden Klone der GSC-Linie #1051 mit TMZ-freiem DMSO behandelt und identisch selektiert (D).  
Quelle: Eigene Darstellung

### 5.3 Die Auswirkungen der TMZ-Behandlung auf die Selbsterneuerung von unbehandelten oder vorbestrahlten GSC

Selbsterneuerung ist eine grundlegende biologische Aktivität aller Stammzellen, einschließlich der GSC (s. 2.5.2). Die in dieser Studie erzeugten experimentellen Modelle von TMZ-resistenten GSC bieten die Möglichkeit, die Auswirkungen von TMZ auf die Selbsterneuerung von GSC zu charakterisieren. Um die Auswirkungen von TMZ auf die Selbsterneuerung von GSC zu bestimmen, wurden TMZ-selektierte Sublinien, die von unbestrahlten oder bestrahlten GSC stammen, für 6 Passagen in Abwesenheit von TMZ oder DMSO expandiert und auf den Grad der Selbsterneuerungsaktivität untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Häufigkeit der Zellen mit Selbsterneuerungskapazität bzw. die Stammzellfrequenz zwischen den TMZ-selektierten Sublinien #1051\_TMZ und #1051\_IR\_TMZ und den entsprechenden Referenzsublinien #1051\_DMSO oder #1051\_IR\_DMSO mittels ELDA verglichen. Die jeweiligen Stammzellfrequenzen (SZF) werden als  $1/SZF$  angegeben.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Selbsterneuerungsaktivität in der durch TMZ selektierten GSC-Linie #1051\_TMZ gegenüber der Elternlinie #1051 erhöht ist (1,58 gegenüber 2,59,  $P < 0,0001$ ; s. Abbildung 23). Der Anstieg der Selbsterneuerung kann nicht auf die Wirkung des TMZ-Lösungsmittels DMSO zurückgeführt werden, wie die ähnliche Selbsterneuerungsaktivität der #1051\_DMSO-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Elternlinie zeigt (2,29 gegenüber 2,59,  $p = 0,333$ ). In ähnlicher Weise zeigten vorbestrahlte #1051\_IR-Zellen eine signifikante ( $P = 0,00425$ ) Erhöhung der Selbsterneuerungsaktivität nach TMZ-Selektion im Vergleich zur Referenzlinie #1051\_IR\_DMSO (1,64 gegenüber 2,30). Bemerkenswert ist, dass die DMSO-Behandlung allein zu einem gegenteiligen Effekt führte, nämlich zu einer Abnahme der Selbsterneuerung (2,30 gegenüber 1,37). Dies bedeutet, dass die TMZ-assoziierte Erhöhung der Selbsterneuerung in der #1051\_IR-Linie noch größer gewesen sein könnte, wenn ihr nicht durch die unspezifischen Effekte des Lösungsmittels DMSO entgegengewirkt worden wäre. Interessanterweise wurde die Hemmung der Selbsterneuerung durch DMSO nur in vorbestrahlten #1051\_IR-Zellen (2,3 vs. 1,37), nicht aber in unbestrahlten #1051-Zellen (2,29 vs. 2,59) beobachtet, was auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit von unbestrahlten und vorbestrahlten GSC gegenüber DMSO hinweist. In Anbetracht der Tatsache, dass DMSO Zytotoxizität vermittelt, indem es die Funktion der Zellmembran beeinträchtigt [459], ist eine mögliche Erklärung, dass die Strahlenbehandlung die Durchlässigkeit oder Struktur der GSC-Membran verändert. Insgesamt zeigen diese Experimente, dass eine TMZ-Behandlung die Selbsterneuerungsaktivität entweder in „naiven“ (unbehandelten) GSC oder in GSC, die vor der TMZ-Behandlung klinischen Dosen ionisierender Strahlung ausgesetzt waren, erhöht.

### 5.4 Auswirkungen von TMZ auf das Differenzierungspotenzial von unbestrahlten oder strahlenselektierten GSC

Stammzellen können sich auf unterschiedliche Weise teilen, nämlich durch symmetrische oder asymmetrische Zellteilung. Bei der symmetrischen Teilung entstehen zwei identische Zellen, die die gleiche zelluläre Bestimmung haben. Bei der asymmetrischen Teilung entstehen Tochterzellen, die ein unterschiedliches Schicksal haben und sich in ihren phänotypischen und molekularen Eigenschaften unterscheiden. Bei der asymmetrischen Teilung einer

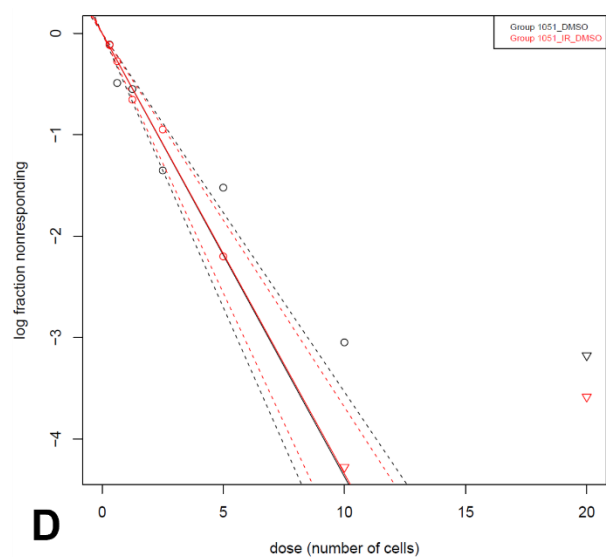
undifferenzierten Stammzelle behält eine der Tochterzellen dieselben Eigenschaften wie die Mutterzelle, während die andere Tochterzelle einen differenzierteren Zustand annimmt, der mit einer Verringerung der Selbsterneuerungsaktivität einhergeht [280]. Bei neuronalen Stammzellen geht die Induktion der Differenzierung mit einer verstärkten Expression von phänotypischen Markern der wichtigsten neuronalen Linien einher, d. h. astrozytär, oligodendrozytär oder neuronal. Bei GSC ist die Differenzierung abnormal und kann sich in gemischten Mustern manifestieren, die zwischen den verschiedenen GSC-Typen und in Abhängigkeit von ihrer Ursprungszelle variieren. Unter experimentellen Bedingungen kann der Entzug der die Selbsterneuerung fördernden Wachstumsfaktoren bFGF und EGF aus dem Kultivierungsmedium bei einigen (aber nicht allen) GSC-Typen eine Differenzierung auslösen.

Bei der GSC-Linie #1051 führt der Entzug von bFGF/EGF zu einer erhöhten Expression des astrozytären Markers GFAP [1, 444]. Der Anteil der GFAP-exprimierenden Zellen der GSC-Linie #1051 in dieser Studie stand in Übereinstimmung mit früheren Studien, wie in Abbildung 24 gezeigt. Um festzustellen, ob TMZ eine Auswirkung auf die Differenzierungsfähigkeit hat, wurde die GFAP-Expression durch Immunfluoreszenzfärbung von Zellen in TMZ-selektierten GSC, die in Anwesenheit oder Abwesenheit der Selbsterneuerungsfaktoren bFGF und EGF gewachsen waren, untersucht. Als Referenzkontrolle wurden parallel dazu DMSO-selektierte Sublinien analysiert.

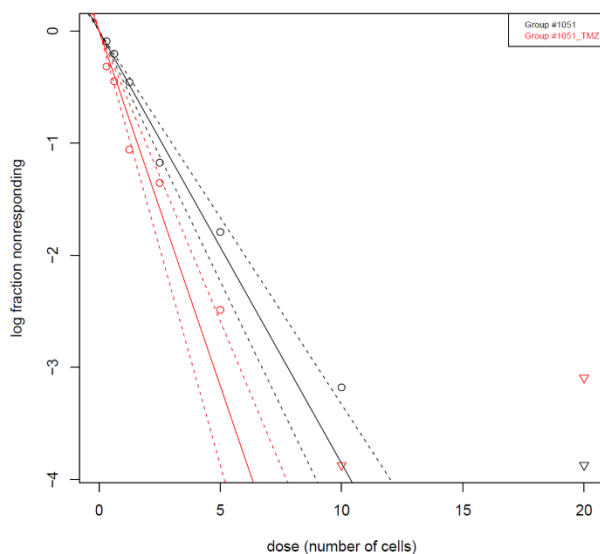
**A**

Zelllinie	SZF
#1051	2,59
#1051_DMSO	2,29
#1051_TMZ	1,58
#1051_IR	1,37
#1051_IR_DMSO	2,30
#1051_IR_TMZ	1,64

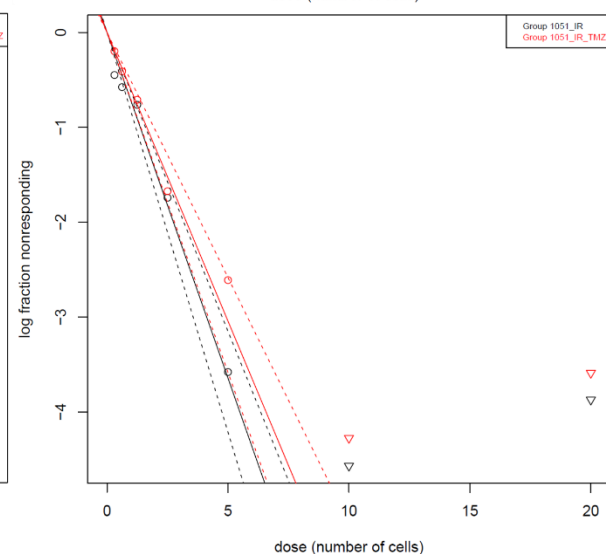
**B**



**C**



**D**

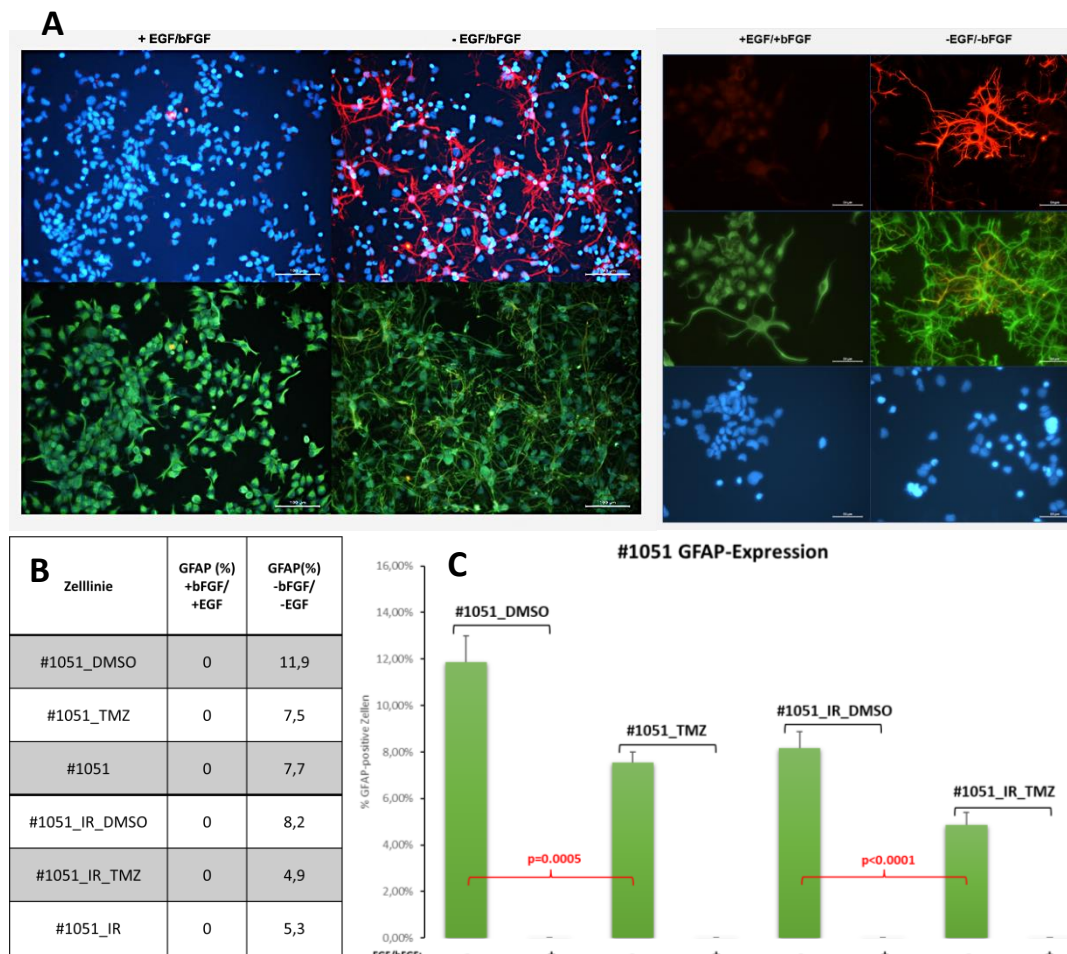


**Abbildung 23: Vergleichende Bewertungen der Selbsterneuerungskapazität in TMZ-selektierten GSC**

**A:** Zusammenfassung der ELDA-Ergebnisse für DMSO- oder TMZ-selektierte Sublinien, die von der unbestrahlten (elterlichen) oder vorbestrahlten Linie #1051 bzw. #1051\_IR stammen. **B:** ELDA-Daten für DMSO-behandelte Kontrollproben. **C:** ELDA-Ergebnisse für die Elternlinie #1051 und ihre TMZ-selektierte Sublinie #1051\_TMZ. **D:** ELDA-Ergebnisse für die vorbestrahlte Linie #1051\_IR und ihre TMZ-selektierte Sublinie #1051\_IR\_TMZ. Quelle: Eigene Darstellung und [11]

Die Ergebnisse zeigten, dass die Linie #1051 und ihre Derivate unter Bedingungen, die die Selbsterneuerung fördern (+bFGF/+EGF), praktisch keine GFAP-exprimierenden Zellen aufweisen. Unter differenzierungsfördernden Bedingungen (-bFGF/-EGF) wurde die GFAP-Expression jedoch deutlich induziert, wobei die Population der GFAP+-Zellen zwischen den Linien variierte (Abbildung 24, B). Auch hier wurde festgestellt, dass TMZ und sein Lösungsmittel DMSO entgegengesetzte Wirkungen auf die Differenzierung der GSC ausüben. In den mit DMSO selektierten Linien war die GFAP-Induktion im Vergleich zu den „naiven“ (elterlichen) Zellen signifikant größer (unbestrahlt: 11,9% vs. 7,7% mit  $P=0,0007$  bzw. bestrahlt: 8,2% vs. 5,3% mit  $P=0,001$ ), was darauf hindeutet, dass DMSO die inhärente Differenzierungsfähigkeit der #1051-Zellen erhöht. Im Gegensatz dazu zeigten TMZ-selektierte Linien, die entweder von unbestrahlten oder von vorbestrahlten GSC abstammen, einen signifikant geringeren Anteil an GFAP-exprimierenden Zellen unter differenzierungsinduzierenden Bedingungen (-bFGF/-EGF) im Vergleich zu Referenzlinien, die nur mit DMSO behandelt wurden (unbestrahlt: 7,5% vs. 11,9% mit  $P=0,0005$  bzw. bestrahlt: 4,9% vs. 8,2% mit  $P<0,0001$ ; jeweils Abbildung 24, C).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Selbsterneuerungsanalysen zeigen diese Daten, dass TMZ bei GSC eine doppelte Wirkung hat: Einerseits steigert es die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und andererseits verringert es das Differenzierungspotenzial.



### Abbildung 24: Auswirkungen von TMZ auf die GFAP-Expression unter selbsterneuerungsfördernden und differenzierungsinduzierenden Bedingungen in unbestrahlten und bestrahlten GSC

**A:** Repräsentative Bilder der GFAP-Expression, bewertet durch Immunfluoreszenzfärbung. Links, Vergrößerungsfaktor 20x, Maßstableiste entspricht 50  $\mu\text{m}$ . Rechts, 40-fache Vergrößerung, Maßstableiste entspricht 100  $\mu\text{m}$ . "+bFGF/+EGF", selbsterneuerungsfördernde Kulturbedingungen. "-bFGF/-EGF", differenzierungsinduzierende Kulturbedingungen. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern für GFAP (rotes Signal) und Nestin (grünes Signal) angefärbt. Nukleäre Gegenfärbung durch DAPI (blaues Signal). **B:** Quantifizierung der GFAP-exprimierenden Zellen in verschiedenen Linien. **C:** Grafische Darstellung der erhobenen Ergebnisse anhand von TMZ-selektierten Linien und Referenzlinien, die nur in Gegenwart von DMSO selektiert wurden. Quelle: Eigene Darstellung, in Anlehnung an [1]

## 5.5 Die Auswirkungen der TMZ-Behandlung auf die Proliferation von GSC

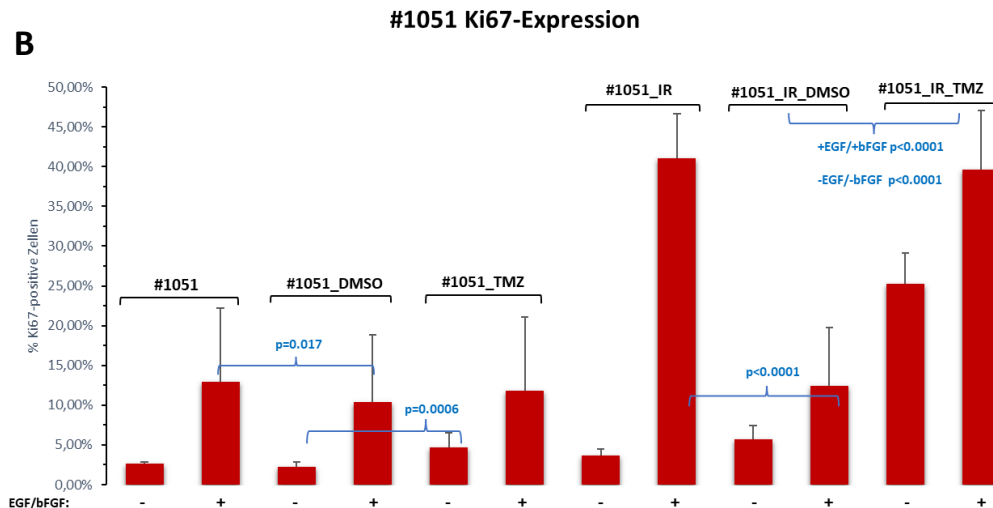
Die Übergänge zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung gehen mit Veränderungen der Zellproliferation einher. Die Tatsache, dass sowohl die Selbsterneuerung (Abbildung 23) als auch die Differenzierung (Abbildung 24) von GSC durch TMZ beeinflusst werden, legt nahe, dass auch die Proliferationsaktivität durch TMZ beeinflusst werden könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Prozentsatz der proliferierenden Zellen in TMZ-selektierten GSC und in Referenzsublinien, die nur mit DMSO behandelt wurden, durch Auswertung der Expression von Ki67, dem Marker für Zellproliferation, bestimmt. Grundsätzlich wurde eine Ki67-Expression in unterschiedlichen Intensitätsstufen beobachtet, ein Umstand, der sich nach Literaturrecherche bereits in [460] vorbeschrieben erwies. In der GB-Literatur wird der Ki67-Index bisher nur nach einer binären Einteilung (in Ki67-positive und -negative Tumorzellen) bestimmt, ohne diesen Umstand zu berücksichtigen [1, 326, 430, 461].

Die Ergebnisse zeigten, dass der Anteil der Ki67-exprimierenden Zellen in den strahlenselektierten GSC im Vergleich zur elterlichen Linie unter selbsterneuerungsfördernden Bedingungen mehr als dreifach höher ist. Dies deutet darauf hin, dass die Bestrahlung zu einem signifikanten Anstieg des Basalniveaus der proliferativen Aktivität in selbsterneuernden GSC führt (41,1 bzw. 12,9%,  $P < 0,0001$ ) (Abbildung 25, A). Unter Selbsterneuerungsbedingungen hatte die TMZ-Behandlung keine signifikante Auswirkung auf die Proliferationskapazität der unbestrahlten GSC, während die DMSO-Behandlung zu einer signifikanten ( $P = 0,017$ ), aber geringfügigen Reduktion des Prozentanteils an Ki67-exprimierenden Zellen führte (10,4 vs. 12,9%) (Abbildung 25, A). Unter differenzierungsfördernden Bedingungen zeigten TMZ-selektierte Zellen, die aus unbestrahlten GSC stammen, einen signifikanten ( $P = 0,0006$ ), aber eher bescheidenen Anstieg des Prozentsatzes der Ki67-exprimierenden Zellen (4,7 vs. 2,2). Im Gegensatz zu unbestrahlten GSC zeigten bestrahlte GSC nach der Selektion mit DMSO oder TMZ wesentlich tiefgreifendere Veränderungen in der Proliferationskapazität. Die Behandlung von bestrahlten GSC mit DMSO allein führte zu einer mehr als dreifachen Verringerung der Ki67-exprimierenden Zellen unter selbsterneuerungsfördernden Bedingungen (12,4 gegenüber 41,1 % in "DMSO-naiven" Zellen). Im Gegensatz dazu war die proliferative Aktivität in TMZ-selektierten Zellen im Vergleich zu der mit DMSO allein behandelten Referenzlinie deutlich erhöht. Im Vergleich zur DMSO-selektierten Referenzlinie wies die TMZ-selektierte Linie einen 3,19- bzw. 4,4-fach höheren Anteil an Ki67-Zellen unter selbsterneuerungsfördernden bzw. differenzierungsinduzierenden Bedingungen auf (39,6 vs. 12,4% mit  $P < 0,0001$  bzw. 25,2 vs. 5,7% mit  $P < 0,0001$ ).

**A**

Zelllinie	#1051	#1051_DMSO	#1051_TMZ	#1051_IR	#1051_IR_DMSO	#1051_IR_TMZ
Ki67 (%) +bFGF/+EGF	12,9	10,4	11,9	41,1	12,4	39,6
Ki67 (%) -bFGF/-EGF	2,7	2,2	4,7	3,7	5,7	25,2

**B**

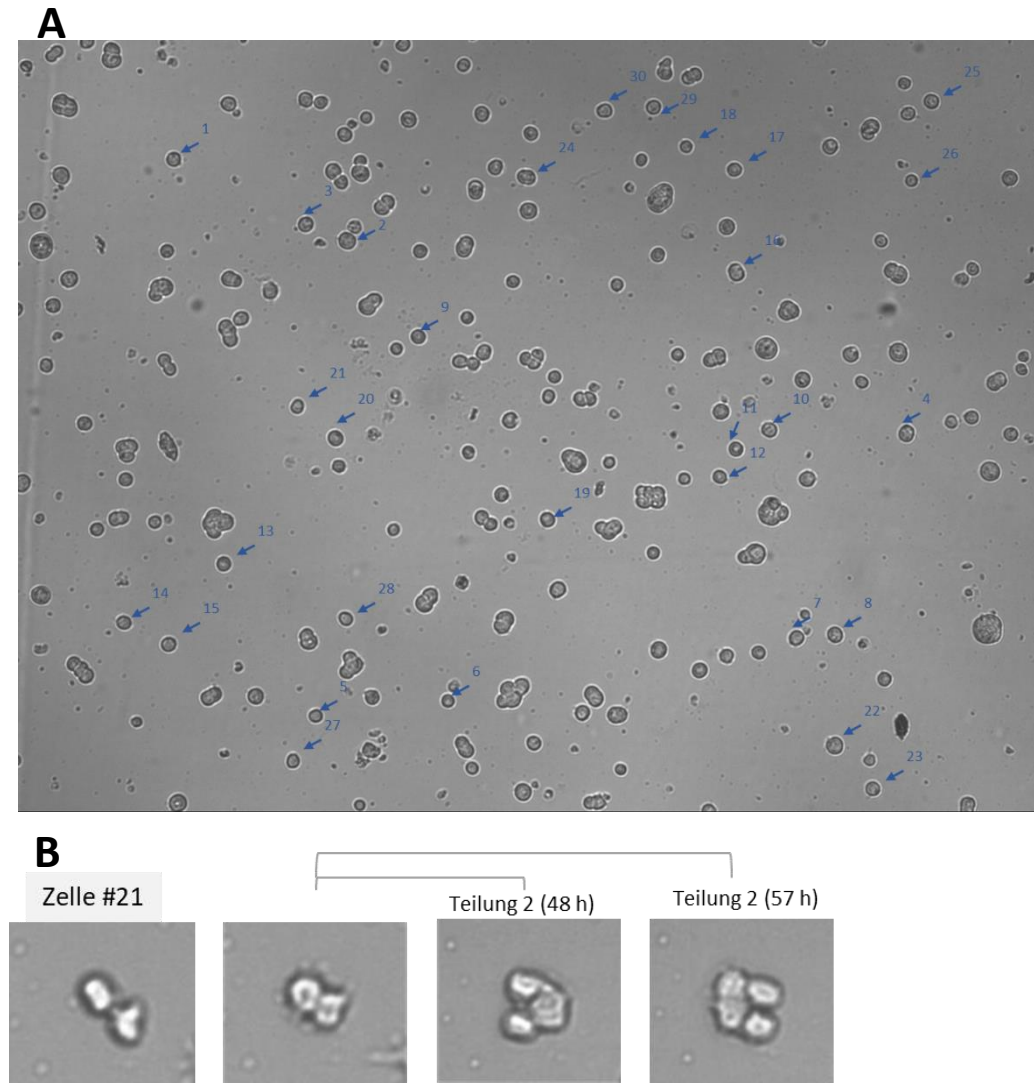


**Abbildung 25: Auswirkungen von TMZ auf die Proliferationsfähigkeit unter selbsterneuerungsfördernden und differenzierungsinduzierenden Bedingungen in unbestrahlten und bestrahlten GSC**

**A:** Beurteilung der Proliferationsfähigkeit anhand der Quantifizierung der Ki67-exprimierenden Zellen in verschiedenen Linien. "+bFGF/+EGF", selbsterneuerungsfördernde Kulturbedingungen. "-bFGF/-EGF", differenzierungsinduzierende Kulturbedingungen. **B:** Grafische Darstellung der erhobenen Ergebnisse anhand von TMZ-selektierten Linien und Referenzlinien, die nur in Gegenwart von DMSO selektiert wurden. Quelle: Eigene Darstellung

Diese Ergebnisse zeigen also, dass sowohl die Strahlen- als auch die TMZ-Behandlung die Proliferationsfähigkeit von GSC auf eine kooperative Weise steigern. Die DMSO-Behandlung bewirkte aufgrund ihrer Zytotoxizität eine Reduktion der Proliferationskapazität, die in bestrahlten GSC ein wesentlich größeres Ausmaß aufwies, welches erneut auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit von unbestrahlten und vorbestrahlten GSC gegenüber DMSO hinweist. Dies ist konkordant zur beobachteten Hemmung der Selbsterneuerung in Abbildung 23, die bestrahlte GSC stärker trifft als unbestrahlte. Eine mögliche Erklärung ist wie bereits erwähnt eine strahlungsinduzierte Änderung der Membranstruktur oder -permeabilität, sodass die DMSO-vermittelte Zytotoxizität potenziert wird (s. 5.3).

Um die obige Schlussfolgerung, dass die TMZ-Behandlung die Proliferationskapazität von GSC konkordant zur Strahlenbehandlung steigert, zu bestätigen, wurde die durchschnittliche Zellverdopplungszeit mit Hilfe der Bildgebung von lebenden Zellen bestimmt, wie in Abbildung 26 dargestellt. Das arithmetische Mittel wird in Abbildung 27, A angezeigt, der Median in Abbildung 27, B.



**Abbildung 26: Bestimmung der Zellverdopplungszeit mittels Live-Mikroskopie.**

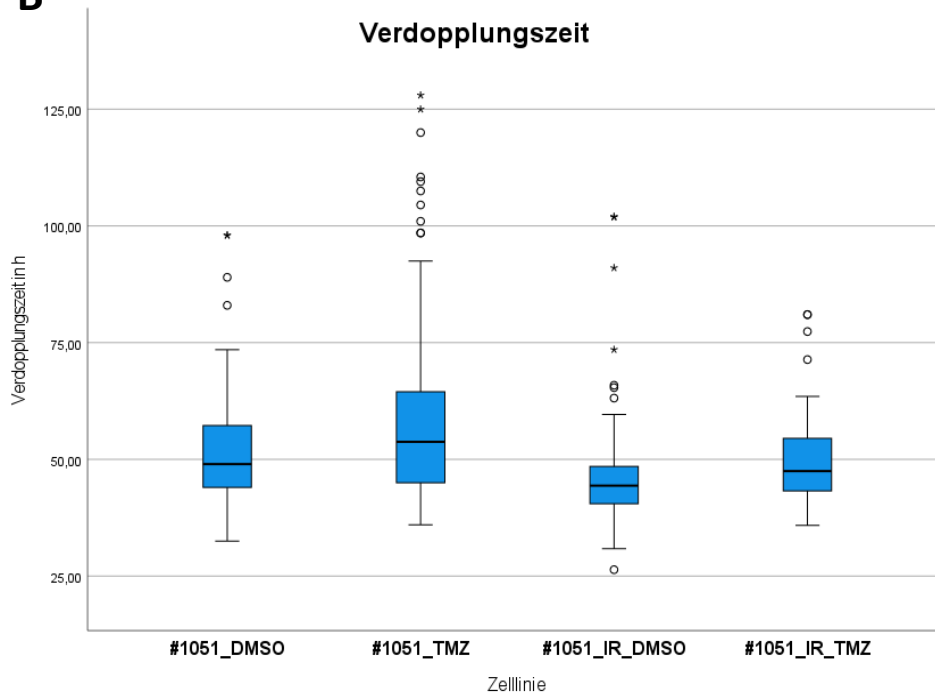
**A:** Repräsentatives Bild des Beobachtungsfeldes. Nummeriert sind die Zellen, die ca. 400 Stunden lang beobachtet wurden. **B:** Repräsentatives Bild einer einzelnen Zelle (#21), die über zwei aufeinanderfolgende Teilungsrunden beobachtet wurde. Quelle: Eigene Darstellung

Die Ergebnisse zeigten, dass die bestrahlten GSC eine signifikant ( $P < 0,001$ ) verkürzte Verdopplungszeit als unbestrahlte GSC aufwiesen, sowohl nach DMSO- wie TMZ-Behandlung (46,43 vs. 51,56 h, bzw. 49,74 vs. 57,7 h, Abbildung 27, A). Dies spiegelt eine strahlungsinduzierte Verstärkung der proliferativen Aktivität wider und steht im Einklang mit den Ergebnissen der Ki67-Bestimmung. Sie weist in Bezug auf die Verdopplungszeit eine mittlere Effektstärke auf ( $d_s = 0,44 - 0,5$ ). Überraschenderweise weisen die TMZ-selektierten GSC-Linien im jeweiligen Vergleich zu ihren DMSO-Referenzlinien sowohl ohne als auch mit Strahlenbehandlung eine signifikante Verlängerung der Verdopplungszeit um 11,91 bzw. 6,67 % auf (unbestrahlt: 57,7 vs. 51,56h mit  $P = 0,004$  bzw. bestrahlt: 49,74 vs. 46,43 h mit  $P = 0,003$ ; s. Abbildung 27, A). Bei TMZ-induzierter Erhöhung der proliferativen Aktivität (unter Selbsterneuerungsbedingungen) im vorherigen Experiment wäre hier der gegenteilige Effekt zu erwarten gewesen. Eine mögliche Erklärung ist, dass TMZ bekanntermaßen über die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase auslöst [129, 259, 462]. Dieser führt bei den TMZ-selektierten GSC nicht zur Apoptose oder Autophagie aufgrund ihrer erworbenen TMZ-Resistenz, könnte jedoch die verlängerte Verdopplungszeit als Maßstab für einen verlängerten Zellzyklus erklären.

**A**

Zelllinie	#1051_DMSO	#1051_TMZ	#1051_IR_DMSO	#1051_IR_TMZ
Verdopplungszeit (h) +bFGF/+EGF	51,56	57,7	46,43	49,74

**B**



**Abbildung 27: Auswirkungen von TMZ auf die Verdopplungszeit unter selbsterneuerungsfördernden Bedingungen in unbestrahlten und bestrahlten GSC**

**A:** Bestimmung der Verdopplungszeit (Mittelwert) anhand einer Lebendzell-Mikroskopie in verschiedenen Linien. "+bFGF/+EGF", selbsterneuerungsfördernde Kulturbedingungen. **B:** Grafische Darstellung der erhobenen Ergebnisse (mit Angabe des Medians) anhand von TMZ-selektierten Linien und Referenzlinien, die nur in Gegenwart von DMSO selektiert wurden. Quelle: Eigene Darstellung

Diese TMZ-assoziierte Verlängerung der Verdopplungszeit ist in bestrahlten GSC (im Vergleich zu den Referenzlinien) geringer ausgeprägt als in unbestrahlten GSC (und wies entsprechend eine geringere (milde) Effektstärke mit  $d_s = 0,31$  auf vs.  $d_s = 0,38$ ).

## 5.6 Die Auswirkungen von TMZ auf die Genexpression in bestrahlten GSC

Die Tatsache, dass Bestrahlung und TMZ einen kooperativen Effekt auf die Proliferationsfähigkeit von GSCs haben, legt nahe, dass einige gemeinsame Wege, die an der Regulierung der Proliferation beteiligt sind, durch beide Behandlungen verändert werden können. Um diese Frage auf molekularer Ebene zu klären, wurden die GSC-Linien #1051\_IR\_DMSO und #1051\_IR\_TMZ einer vergleichenden Analyse der transkriptionell aktiven Promotorregionen mittels FAIRE unterzogen. Die FAIRE-Methode ist eine relativ neue Methode, die es ermöglicht, transkriptionell aktive Regionen im Chromatin, so genannte Peaks, zu identifizieren. Sie wurde erstmalig anhand von Hefezellen entwickelt und auf menschliche Zellen wie Gewebe übertragen, ist aber noch nicht für humane GSC optimiert

worden [9]. Daher lag eines der Ziele dieser Studie auf der Etablierung und Optimierung der FAIRE-Methode für humane GSC.

### 5.6.1 Optimierung des Protokolls und Generierung von FAIRE-DNA aus humanen GSC

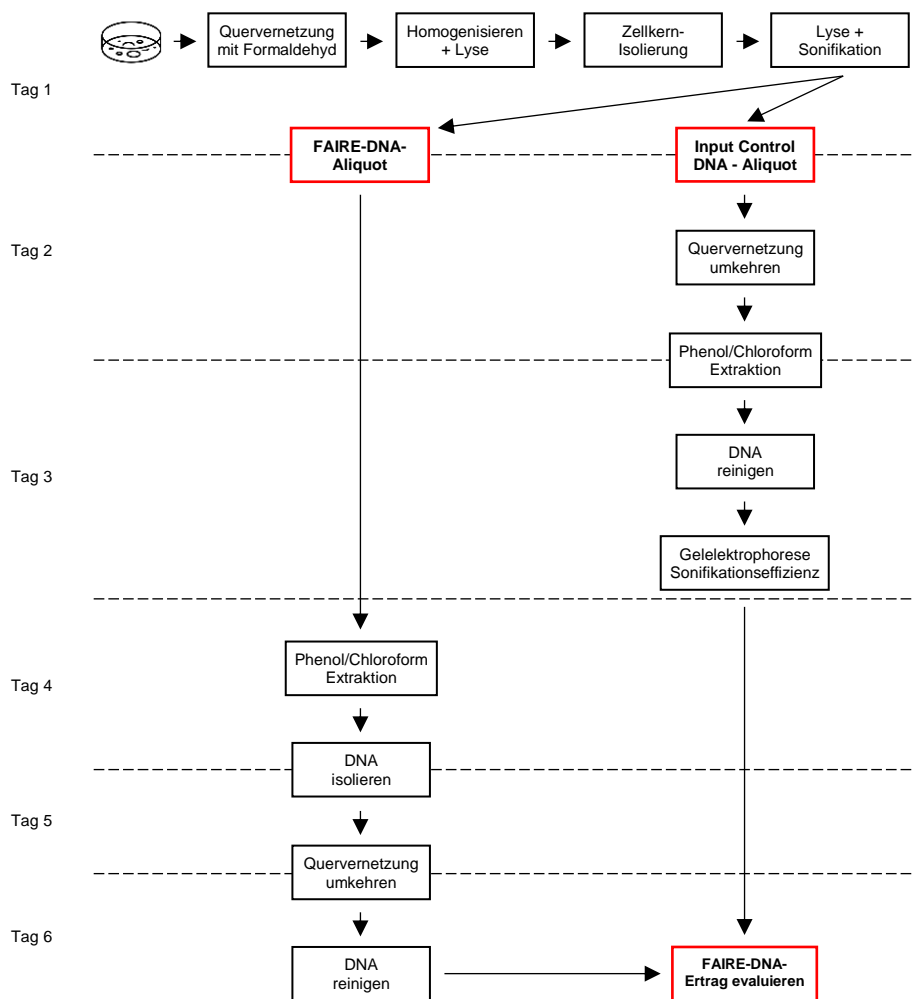
Im Folgenden werden die Optimierungen und Modifikationen der FAIRE-Methode für die verwendeten Glioblastom-abgeleiteten Tumorstammzell-angereicherten Zelllinien beschrieben. Als Grundlage diente das ursprüngliche Protokoll von Simon et al [9]. Sofern von diesem nicht abgewichen wurde, werden jene identischen Arbeitsschritte nicht separat aufgeführt und beschrieben. Die modifizierten Arbeitsschritte werden getreu der ursprünglichen Nummerierung beschriftet. Die Optimierung fand zusammen mit einer Labormitarbeiterin (Alina Braukmann) statt. Ein Überblick über die Etappen des Experiments mit dem zeitlichen Rahmen bietet Abbildung 28.

Für die FAIRE-Methoden wurden für die Zelllinien aus 3.1 je 10 Millionen Zellen am Tag vor Experimentbeginn ausgesät, aufgeteilt auf je zwei T175-Kulturflaschen mit 60 ml Medium aus NB<sup>+bFGF/+EGF</sup> pro Flasche. Das Verfahren wurde mit allen Zelllinien parallel unter gleichen Konditionen durchgeführt. Ausgewählt wurde aus dem vorgegebenen Protokoll das Prozedere (B), da die Nutzung eines Zellaufschlussgeräts (engl. bead-beater) wie im Prozedere (A) nicht möglich war.

(i) Nach Aussäen der Zellen in den Kulturflaschen erfolgte eine 24-stündige Inkubation. Am Folgetag wurde mit den nachfolgenden Schritten begonnen.

(2) Sonifikation: Als Sonifikationsmodus wurden 70 s mit 10-s-Burst gefolgt von 60-s-Rest eingestellt. Die Sonifikation wurde mit dem Sonication-System Bioruptor Plus® von Diagenode durchgeführt. Die ideale durchschnittliche Chromatin-Fragmentlänge wurde mit 300 bis 400 Basenpaaren (bp) mit einer Streuung der Fragmentlängen von 150 bis 750 bp angegeben [9]. Zur Ermittlung und Optimierung der benötigten Anzahl an Sonifikationszyklen, um diese Vorgabe zu erreichen, wurde die Sonifikation auf drei Niveaus umgesetzt. Im ersten Sonifikationsabschnitt wurden 116 Zyklen durchgeführt. Aus diesem Zell-Lysat wurde (für jede Zelllinie) ein 800 µl-Aliquot als Zwischenergebnis entnommen. Das restliche Zell-Lysat wurde mit weiteren 30 Zyklen sonifiziert. Hiernach wurden erneut 800 µl als Aliquot abgenommen als zweites Zwischenergebnis. Das verbleibende Zelllysate wurde anschließend mit 54 weiteren Zyklen sonifiziert.

Es ergaben sich daher für jede Zelllinie drei sonifizierte Zell-Lysat-Aliquots. Sie stellten drei Sonifikationsniveaus dar: mit 116 Zyklen für das erste, 146 Zyklen für das zweite und 200 Zyklen für das dritte Aliquot. Bis zum Schritt (30) (Ermittlung der Sonifikationseffizienz) wurden alle Schritte parallel mit allen drei Aliquots pro Zelllinie durchgeführt.



**Abbildung 28: FAIRE-Etappen und -Zeiträumen**

Am ersten Experimenttag wurden die Zellen, die am Vortag passagiert und gezählt wurden, zur Quervernetzung zwischen (inaktivem) Chromatin und Proteinen mit Formaldehyd versetzt. Es folgten Schritte zur Lyse von Zellen und Kern sowie eine Sonifikation. Aus dem Zell-Lysat wird ein erster Aliquot zur späteren Isolierung der FAIRE-DNA entnommen. Ein zweiter Aliquot wird als Input-Control-DNA entnommen, um die Effizienz der Sonifikation zu überprüfen. Hierfür schließen sich mehrere Schritte bis zur Gelelektrophorese an Tag 3 an. War die Sonifikation effizient, wurde die Extraktion, Isolierung und Reinigung der FAIRE-DNA (aus dem ersten Aliquot) aufgenommen. An Tag 6 erfolgte die Berechnung des volumennormierten Ratio aus Faire- und Input-Control-DNA, um den Ertrag an FAIRE-DNA zu evaluieren. Quelle: Eigene Darstellung, in Anlehnung an [2, 9]

(3) Um die Effizienz der Sonifikation zu ermitteln, wurde ein 200 µl-Aliquot Zell-Lysat entnommen, während im Protokoll 100 µl Zell-Lysat angegeben sind. Aus diesem Grund wurden in den nachfolgenden Schritten zu diesem Zell-Lysat-Aliquot das doppelte Volumen an Reagenzien und Lösungen gegeben, wenn im ursprünglichen Protokoll eine absolute Volumenangabe erfolgte. Wurde ein relatives Volumen angegeben (wie beispielweise aus Schritt (21) „Geben Sie ein Zehntel des Lösungsvolumens an 3 M Natriumacetat (pH 5,2) hinzu (...)“ [9]), so wurden diese Vorgaben umgesetzt. Konkret betrifft der Umstand an doppeltem (Absolut-) Volumen die Schritte (6, 7, 8, 9, 12, 18 und 21).

(4) Die Zentrifugation wurde mit einer Dauer von 10 Min. (statt 5 Min.) durchgeführt. Diese zeitliche Verdopplung betraf auch die Zentrifugationsschritte in den Arbeitsschritten (10, 13, 16, 19, 23 (hier 20 anstatt 15 min), 32, 35, 38, 41, 44, 48 (hier 20 anstatt 15 min)).

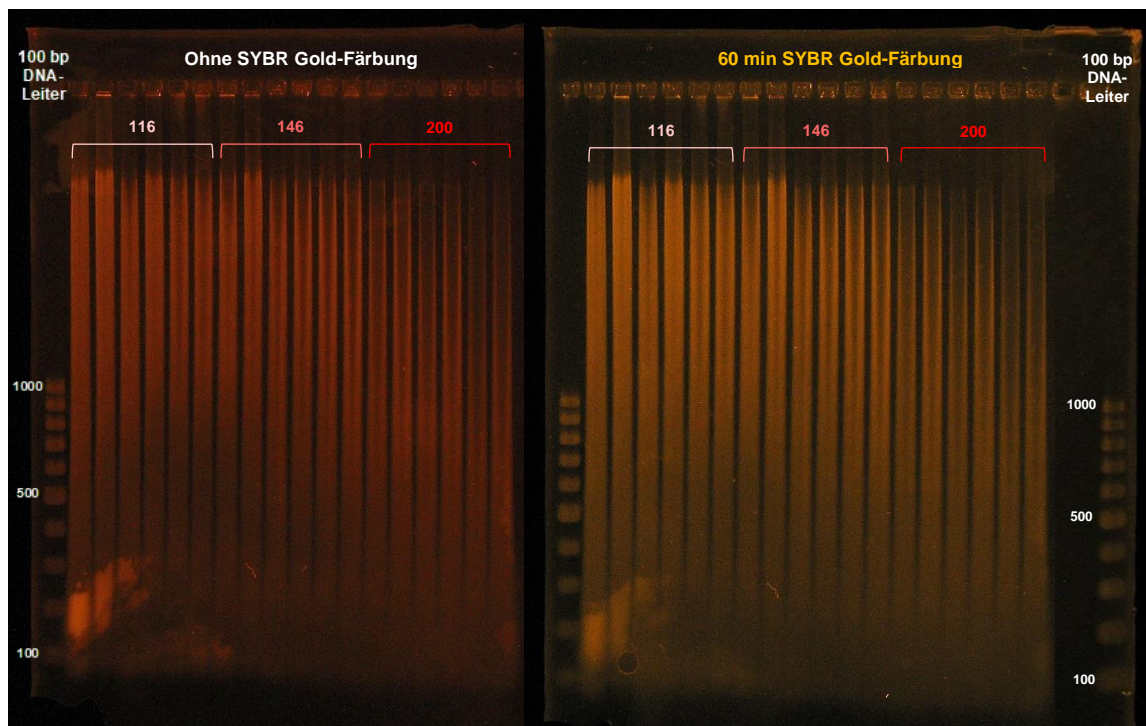
(28) Das DNA-Pellet wurde in 15 µl an 10 mM Tris-HCL (pH 7.4) resuspendiert.

(29) Zur Quantifizierung wurden je Probe 3 µl der Input-Control-DNA-Lösung aus (28) entnommen und mittels Spektralphotometer quantifiziert. Es wurde die Konzentration der

Input-Control-DNA für sechs Proben (da für jede Zelllinie eine) pro Sonifikationsniveau (aus 116, 146 und 200 Zyklen) bestimmt. Innerhalb eines Sonifikationsniveaus wurden die Proben daraufhin auf die niedrigste DNA-Konzentration unter ihnen mit Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) verdünnt, um in Schritt (30) die gleiche DNA-Menge von jeder Zelllinie ins Agarose-Gel aufzutragen. Damit wurde die Vergleichbarkeit der Färbung im Agarose-Gel gewährleistet.

(30) Um die Effizienz der Sonifikation zu überprüfen, wurde ein 1,5 %-Agarose-Gel angesetzt. Hierfür wurde vorherig ein 10-fach konz. TBE-Puffer hergestellt. Hierzu wurden 108 g Tris, 55 g Borsäure und 40 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>-EDTA (pH 8.0) in 900 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und das Lösungsvolumen mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt. Dieser TBE-Puffer wurde 1:10 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt, um einen einfachen TBE-Puffer zu erhalten. Hierin wurden 1,5 g Agarose gelöst. Es folgten die Erhitzung in der Mikrowelle, ein sich anschließendes Abkühlen und das Ausgießen in die Gelkammer.

Es folgte das Auftragen der Input-Control-DNA in die Gelkammer. Hierzu wurden jeweils 4 µl Input-Faire-DNA (nach der Verdünnung von Schritt (29)) mit 1 µl Loading Dye (6-fach konz.) gemischt und in die Geltaschen gegeben. Parallel wurde als DNA-Leiter 1 µl GeneRuler 100 bp mit 1 µl Loading Dye (6-fach konz.) und 3 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt und ebenso in eine Geltasche übertragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V für 120 Min. durchgeführt. Hierauf erfolgte die Färbung der (aufgetrennten) DNA-Fragmente mittels dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>TM</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain (anstelle von Ethidiumbromid, das im Protokoll vorgesehen war, da es um ein Vielfaches sensitiver ist als dieses). Hierzu wurde eine 1-fach konz. SYBR<sup>TM</sup> Gold-Färbelösung hergestellt durch eine 1:10000 Verdünnung der Stocklösung in Wasser. Das Gel wurde vorsichtig aus der Gelkammer entnommen. Die Gel-Visualisierung erfolgte per UV-Transilluminator vor und nach der Färbung durch die SYBR<sup>TM</sup> Gold-Färbelösung für 60 Min. bei Raumtemperatur. Es ergab sich folgendes Bild:



**Abbildung 29: Anfärbung der Input-Control-DNA (116-146-200 Zyklen) nach Gelelektrophorese**

Nach geleelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente der Input-Control-DNA erfolgte die Visualisierung der (fortlaufenden) DNA-Banden per UV-Transilluminator vor (links) und nach 60-minütiger Färbung (rechts) mittels SYBR<sup>TM</sup> Gold-Färbelösung. Die DNA der unterschiedlichen Sonifikationsniveaus (aus 116, 146 und 200 Zyklen) wurde parallel getrennt. Als Maß für die Fragmentlänge diente eine 100 bp DNA-Leiter. Es ist zu erkennen, dass die Sonifikation mit 116 und 146 Zyklen ineffizient und nicht ausreichend war; der Großteil der DNA-Fragmente war länger als 1000 bp. Die Sonifikation mit 200 Zyklen dagegen präsentierte sich als effizient und angemessen, da der Großteil der Fragmente eine Länge von weniger als 1000 bp besaß. Quelle: Eigene Darstellung

Aufgrund der großen Streubreite der DNA-Fragmente mit dominierend Fragmenten, die größer als 1000 bp waren, wurde die Sonifikation mit 116 und 146 Zyklen als ineffizient und unzureichend bewertet. Aus den durchgeführten Niveaus bot die Sonifikation mit 200 Zyklen die bestmögliche Fragmentierung, mit einem überwiegenden Anteil an DNA-Fragmenten, die kleiner als 1000 bp waren. Sie wurde deshalb ausgewählt für das weitere Prozedere. Die Zell-Lysatproben, die mit 116 und 146 Zyklen sonifiziert und nach Schritt (2) des Protokolls bei 4 °C aufbewahrt wurden, wurden nun zusätzlich mit 84 respektive 54 weiteren Zyklen sonifiziert, um insgesamt 200 Zyklen durchlaufen zu haben. Diese Proben (mit ehemals 116 und 146 durchlaufenen Zyklen) wurden mit den Proben mit primär 200 durchgeführten Zyklen entsprechend der Zugehörigkeit zur Zelllinie gepoolt.

Es ergaben sich daher anstatt 18 Proben vorher nun 6 Proben an Zell-Lysat. An diesen wurden alle Arbeitsschritte des Protokolls (und wie oben angegeben modifiziert) ab Schritt (3) angewendet. Während die Experimentdurchführung bisher der Optimierung diente, begann mit der Wiederholung der Arbeitsschritte die ergebnisrelevante Durchführung der FAIRE-Methode.

(29) Da alle Arbeitsschritte ab Schritt (3) mit den gepoolten Proben wiederholt wurden, wurde eine erneute Quantifizierung der Input-Control-DNA vorgenommen. Hierzu wurden je Probe 2 µl der Input-Control-DNA-Lösung entnommen und mittels Spektralphotometer quantifiziert. Wie oben für den ersten Durchlauf beschrieben wurden die Proben auch hier auf die niedrigste gemessene DNA-Konzentration verdünnt, um im nächsten Schritt für jede Zelllinie die gleiche Menge an DNA gelelektrophoretisch aufzutrennen.

(30) Ebenso wurde eine erneute Gel-Elektrophorese durchgeführt, um die DNA-Fragmente der Input-Control entsprechend ihrer Länge aufzutrennen und die Effizienz der Sonifikation mit 200 Zyklen zu bestätigen. Nach entsprechender Färbung in einer SYBR™ Gold-Färbelösung ergab sich das Verteilungsmuster in Abbildung 30. Es ist deutlich zu erkennen, dass die höchste Farbintensität und damit größte DNA-Anreicherung zwischen 100 und 400 bp Länge besteht, mit einer Streuung von etwas weniger als 100 bp bis über 1000 bp hinaus. Damit liegt die ungefähre durchschnittliche Fragmentlänge zwischen 100 und 400 bp und erfüllt die Anforderungen an eine hinreichende und adäquate Sonifikation [9].

(31) Das restliche Zell-Lysat wurde für die weiteren Arbeitsschritte in zwei Mikroreaktionsgefäße mit je 300 µl aliquotiert. Das restliche Zell-Lysat wurde bei -80 °C aufbewahrt.

(57) Die Reinigung der FAIRE-DNA erfolgte mit dem DNA Clean & Concentrator™-5-Kit (Zymo Research) nach dem vorgegebenen Protokoll in [463]. Abweichend davon wurden in Schritt (5) zwei Elutionsschritte mit je 10 µl an 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) (als DNA-Elutionspuffer) durchgeführt und nach jedem Eluieren 2 min inkubiert.

(58) Zur Quantifizierung der FAIRE-DNA wurden 2 µl der FAIRE-DNA-Lösung pro Probe entnommen.

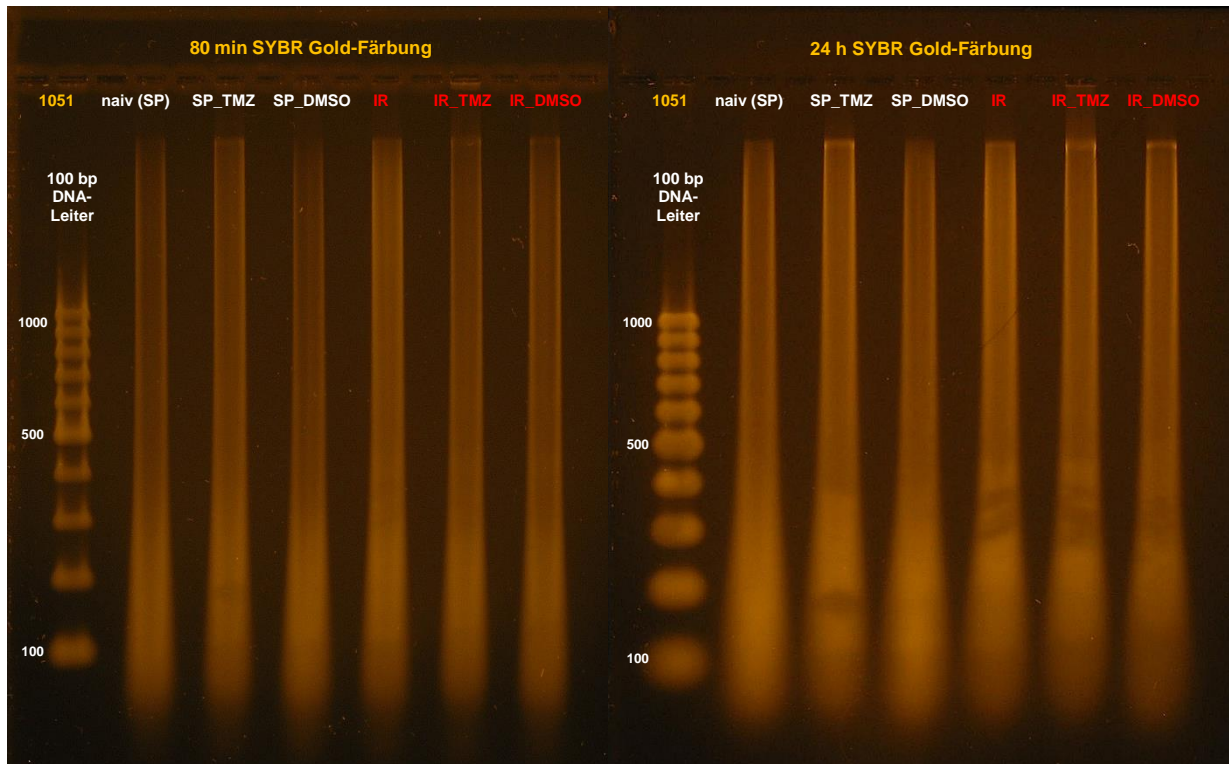


Abbildung 30: Anfärbung der Input-Control-DNA (200 Zyklen) nach Gelelektrophorese

Die gepoolte Input-Control-DNA nach 200 Zyklen Sonifikation wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Effizienz der Sonifikation zu bestätigen. Die Proben aller Zelllinien wurden parallel getrennt (weiß: unbestrahlt, rot: bestrahlt). Die fortlaufenden DNA-Banden wurden nach 80-minütiger (links) und 24-stündiger Färbung (rechts) mittels SYBR™ Gold-Färbelösung per UV-Transilluminator visualisiert. Die DNA-Fragmentlängen streuen von 100 bis über 1000 bp. Markant wie deutlich ausgeprägt ist die Anreicherung von DNA-Fragmenten zwischen 100 und 400 bp Länge. Dieser Bereich stellt die durchschnittliche Fragmentlänge dar und bedeutet damit eine effiziente und adäquate Sonifikation. Quelle: Eigene Darstellung

### 5.6.2 Quantifizierung der Pure FAIRE DNA und der Input-Control-DNA

Nach Durchführung der FAIRE-Methode wurde überprüft, ob der Ertrag an isolierter FAIRE-DNA innerhalb einer angemessenen Reichweite liegt. Als Maß hierfür diente die volumennormierte Ratio der isolierten FAIRE-DNA im Verhältnis zur isolierten Input-Control-DNA. Diese Ratio befindet sich idealerweise im Bereich zwischen 1 und 3 % und sollte 5 % nicht übersteigen, da dies häufig ein Merkmal für Unterfixierung ist [9]. Zur Berechnung der Ratio wurde der Gesamtertrag der FAIRE-DNA (in ng) durch das verwendete Zell-Lysat-Volumen (in µl) dividiert; dieser Wert wurde entsprechend für die Input-Control-DNA berechnet. Die Wertebenen für beide DNA-Arten sind in Anhangstabelle 1 und Anhangstabelle 2 zu finden. Die volumennormierte Ratio ergibt sich aus dem Verhältnis des Wertes der FAIRE-DNA zum Wert der Input-Control-DNA. Diese betrug bei den verschiedenen Zelllinien wie folgt:

Tabelle 14: Ratio FAIRE-DNA/Input-Control-DNA

Zelllinie	Volumennormierte Ratio FAIRE-DNA/Input-Control-DNA
1051 SP	2,55 %
1051 SP_TMZ	3,47 %
1051 SP_DMSO	4,08 %
#1051_IR	3,31 %
#1051_IR_TMZ	4,53 %
#1051_IR_DMSO	4,69 %

Es ist zu erkennen, dass für die FAIRE-DNA von allen Zelllinien die Maßgabe von 5 % erfüllt wurde. Daher war nicht mit einer Unterfixierung und damit unzureichender Qualität der FAIRE-DNA zu rechnen.

Ebenso war der Reinheitsgrad der isolierten FAIRE- und Input-Control-DNA angemessen. Zur Reinheitsbestimmung wird sich die Eigenschaft der DNA zunutze gemacht, dass sie Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm absorbiert. Das Maß an Absorption wird bei dieser Wellenlänge spektrophotometrisch bestimmt und in Verhältnis gesetzt zur Absorption bei 230 und 280 nm, da bei diesen Wellenlängen das Absorptionsmaximum für andere Moleküle wie Proteine, Phenol und weitere liegt. Indem die Absorptionsmaße bei 260 nm und 230 bzw. 280 nm in Verhältnis gesetzt werden, wird hierdurch das Vorhandensein von Kontamination der DNA durch das Vorhandensein von andersartigen Stoffen ersichtlich. Je stärker die Kontamination, desto größer die abweichende Absorption bei 230 bzw. 280 nm, desto kleiner die Ratio aus der Absorption bei 260 nm und bei diesen beiden Wellenlängen. Die Ratio von 260 nm/ 230 nm sollte zwischen 2,0 und 2,2 und die Ration von 260 nm/ 280 nm bei ungefähr 1,8 liegen; kleinere Werte indizieren eine Kontamination [464]. Bei den vorliegenden Proben orientierten sich die beiden Ratios am Zielbereich. Teilweise liegt eine leichte Abweichung vor, jedoch stets mit einer Ratio größer und nicht kleiner als der Zielbereich, wie aus Anhangstabelle 1 und Anhangstabelle 2 ersichtlich ist.

Der Fokus dieser Arbeit in Bezug auf die FAIRE-Methode lag auf der Etablierung und Optimierung der FAIRE-Methode für GB-abgeleitete Tumorstammzellen (im Allgemeinen und im Speziellen) sowie der Gewinnung von FAIRE-DNA für die vorliegenden Zellklone aus Tabelle 1. Die FAIRE-DNA-Proben wurden einer Hochdurchsatz-Sequenzierung (FAIRE-Seq) unterzogen. Im zweiten Schritt wurden Peaks von offenem Chromatin (als Anreicherung von FAIRE-DNA) in Genpromotorregionen bestimmt, mit der parallelen Verwendung von Kontrollproben als Referenz, um das Hintergrundrauschen zu definieren. Die zugehörigen Gene dieser Peakregionen wurden bestimmt. Resümierend konnten durch diese Daten die offenen Chromatinregionen (und damit aktiv regulierte Genregionen) der unterschiedlichen Zelllinien bestimmt werden. Sie wurden verglichen und bioinformatisch interpretiert, um mögliche Einflüsse der unterschiedlichen Behandlungen ermitteln zu können.

### 5.6.3 FAIREseq-Ergebnisse

Nach der Optimierungsphase konnten FAIRE-DNA-Proben aus den in Tabelle 1 aufgeführten GSC-Linien erfolgreich generiert und für Hochdurchsatz-Sequenzierungsanalysen an kommerzielle Anbieter von Next Generation Sequencing (StarSeq GmbH Mainz) und Bioinformatik-Dienstleistungen (Novel Software Systems Inc.) geschickt werden.

Die in der FAIRE-DNA angereicherten Genomregionen ("Peaks") wurden zwischen verschiedenen Linien verglichen (Abbildung 31, A) Um Hintergrundpeaks auszuschließen, wurde die gesamte genomische DNA derselben Linie ("Input-DNA") parallel zur FAIRE-DNA analysiert (Abbildung 31, B) Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Anreicherung von offenen Chromatinregionen ("Peaks") in allen FAIRE-DNA-Proben im Vergleich zu den Hintergrundpeaks in den Input-DNA-Proben (Abbildung 31, B) Die größte Anzahl von Peaks wurde bei solchen GSC festgestellt, die entweder allein oder in Kombination mit Bestrahlung oder TMZ mit DMSO behandelt wurden. Der Anteil der Peaks in Promotorregionen ("Promotor-Peaks") war jedoch bei den mit DMSO behandelten GSC im Vergleich zu den unbehandelten "naiven" GSC geringer (2,39 % bzw. 4,31 %). Dies deutet darauf hin, dass die meisten der mit DMSO-Behandlung assoziierten Peaks außerhalb von transkriptionell regulatorischen Regionen liegen und die Transkriptionsrate möglicherweise nicht wirksam verändern. Der größte Anteil an Promotor-Peaks wurde in bestrahlten GSC gefunden, bei denen der Anteil der Promotor-Peaks im Vergleich zu "naiven" GSC um das Zweifache erhöht war (8,8 % bzw. 4,31 %). Im Gegensatz dazu wiesen TMZ-selektierte unbestrahlte GSC eine 2-fache Verringerung des Promotor-Peaks-Anteils im Vergleich zur entsprechenden Referenzlinie #1051\_DMSO auf (1,18 bzw. 2,39). Die Gesamtzahl der offenen Chromatin-Peaks und der Anteil der Promotor-Peaks waren bei TMZ-behandelten und bestrahlten GSC (Linie #1051\_IR\_TMZ) und der Referenzlinie #1051\_IR\_DMSO ähnlich (2,27 bzw. 2,13). In

Anbetracht der Tatsache, dass eine Strahlenbehandlung zu einem starken Anstieg der Promotor-Peaks führt (8,8 % bzw. 4,31 %), deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass sich das Spektrum der durch Strahlung verursachten Chromatinveränderungen von denen durch TMZ verursachten unterscheidet.

Bioinformatische Analysen lieferten wichtige Erkenntnisse über die funktionelle Bedeutung der in FAIRE-DNA-Proben angereicherten Promotor-Peaks. Es wurden zwei Arten von FAIREseq-Datenanalysen durchgeführt. Ein Ansatz zielte darauf ab, offene Chromatinregionen mit Hilfe der GeneOntology (GO)-Datenbank funktionell zu annotieren. Da die Gene, die sich in der Nähe von Promotor-Peaks befinden, aufgrund der offenen Chromatinstruktur potenziell aktiv sind, ist ihre Funktion ein Hinweis auf einen Prozess, der unter einer bestimmten Bedingung, z. B. einer Medikamentenbehandlung, aktiviert wird. Die Ergebnisse der GO-Analyse enthüllten einige interessante Unterschiede in den funktionellen Kategorien, die entweder in bestrahlungs- oder TMZ-selektierten GSC angereichert wurden (Abbildung 32, A-C). In bestrahlungselektierten GSC gab es einzigartige funktionelle Gruppen, die mit dem Nucleinsäurestoffwechsel zusammenhängen (Abbildung 32, A). Die Anreicherung dieser Kategorien in bestrahlten GSC steht im Einklang mit den Auswirkungen der Strahlung auf die DNA-Replikation, -Reparatur und -Rekombination, die die wichtigsten Prozesse des DNA-Stoffwechsels umfassen. In Übereinstimmung mit der Schlussfolgerung, dass der „Nucleinsäurestoffwechsel“ ein Merkmal ist, das mit der Strahlenbehandlung in Verbindung steht, war er weder in den TMZ-selektierten (#1051\_TMZ) noch in den Referenzlinien (#1051 "naiv" oder #1051\_DMSO) angereichert (Abbildung 32, A+B)

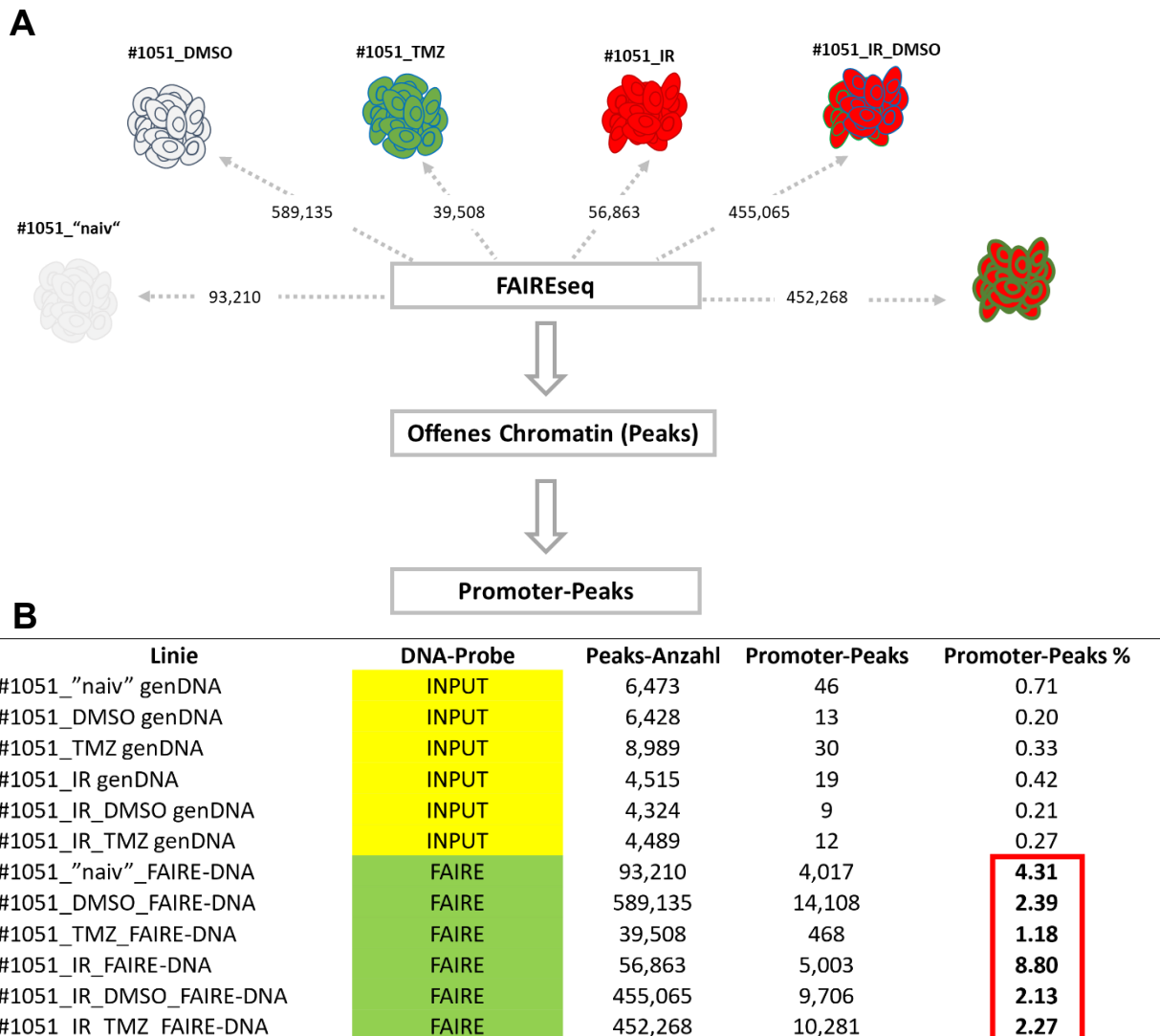


Abbildung 31: Zusammenfassung der FAIRE-Analysen - Überblick

**A:** Schematischer Überblick über die FAIRE-Analysen. Die Zahlen geben die Gesamtzahl der offenen Chromatin-Peaks an. **B:** Zusammenfassung der Ergebnisse. "Input-DNA", Kontrollproben der gesamten genomischen DNA. "FAIRE-DNA", offene Chromatinfractionen, die durch FAIRE erhalten wurden. "Peaks-Anzahl", Gesamtzahl der Peaks. "Promoter-Peaks": Anzahl der Peaks, die sich in Promotorregionen befinden. "Promotor-Peaks %": Prozentsatz der mit Promotor assoziierten Peaks. Der rote Kasten hebt die in den FAIRE-Proben identifizierten Promotorfraktionen hervor. Quelle: Eigene Darstellung

In TMZ-selektierten GSC waren Gene, die mit der Neurogenese zusammenhängen, unter den 10 wichtigsten funktionellen Kategorien vorherrschend. Die Tatsache, dass diese Kategorien weder in den Strahlungs-selektierten GSC noch in den Referenzproben angereichert waren (Abbildung 32, A+B) deutet darauf hin, dass Veränderungen in Genen, die an der Regulierung neurodevelopmentaler Prozesse beteiligt sind, ein spezifisches Merkmal für TMZ-selektierte GSC sind. Interessanterweise wurden TMZ-spezifische Merkmale in der Linie #1051\_IR\_TMZ, die den bestrahlten GSC nach der Behandlung mit TMZ entspricht, nicht mehr nachgewiesen. Hier waren die angereicherten GO-Kategorien denen sehr ähnlich, die in der mit DMSO allein behandelten Referenzlinie #1051\_IR\_DMSO identifiziert wurden (Abbildung 32, C). Das Fehlen offensichtlicher Unterschiede zwischen den Linien #1051\_IR\_TMZ und #1051\_IR\_DMSO, die durch die funktionelle Annotation von FAIRE-DNA aufgedeckt wurden, spiegelt die Ergebnisse der Promotoranalyse wider, die ebenfalls keine Unterschiede zwischen diesen Linien zeigte (Abbildung 31, B).

# Ergebnisse

## A

#1051\_“naiv”



TermID	Term	Enrichment	logP
GO:0044237	cellular metabolic process	7.69E-31	-69.3401
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	1.63E-25	-57.0732
GO:0008152	metabolic process	3.52E-21	-47.0952
GO:0071704	organic substance metabolic process	1.59E-19	-43.2877
GO:0044238	primary metabolic process	3.38E-19	-42.5316
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	9.89E-18	-39.1548
GO:0043170	macromolecule metabolic process	6.65E-17	-37.2488
GO:1901576	organic substance biosynthetic process	1.68E-16	-36.3254
GO:0009058	biosynthetic process	4.69E-16	-35.2965
GO:0044249	cellular biosynthetic process	5.27E-16	-35.1798

#1051\_IR



TermID	Term	Enrichment	logP
GO:0044237	cellular metabolic process	1.12E-49	-112.717
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	3.80E-44	-99.9779
GO:0008152	metabolic process	3.37E-33	-74.7702
GO:0044238	primary metabolic process	6.66E-33	-74.0898
GO:0071704	organic substance metabolic process	4.50E-32	-72.1791
<b>GO:0090304</b>	<b>nucleic acid metabolic process</b>	<b>5.34E-32</b>	<b>-72.0074</b>
GO:0043170	macromolecule metabolic process	3.61E-31	-70.0958
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	8.58E-30	-66.9284
<b>GO:0006139</b>	<b>nucleobase-containing compound metabolic process</b>	<b>1.97E-29</b>	<b>-66.0968</b>
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	1.26E-28	-64.2408

## B

#1051\_DMSO



Term ID	Term	Enrichment	logP
GO:0044237	cellular metabolic process	7.50E-48	-108.509
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	1.49E-35	-80.1935
GO:0008152	metabolic process	7.86E-29	-64.7126
GO:0071704	organic substance metabolic process	1.44E-23	-52.5965
GO:0009058	biosynthetic process	3.35E-23	-51.7495
GO:0044238	primary metabolic process	5.59E-23	-51.2379
GO:0044249	cellular biosynthetic process	1.97E-22	-49.9797
GO:1901576	organic substance biosynthetic process	2.04E-22	-49.9436
GO:0031323	regulation of cellular metabolic process	8.42E-21	-46.2243
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	7.92E-20	-43.9827

#1051\_TMZ



TermID	Term	Enrichment	logP
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	7.15E-16	-34.8736
<b>GO:0048699</b>	<b>generation of neurons</b>	<b>8.89E-16</b>	<b>-34.6566</b>
<b>GO:0073399</b>	<b>nervous system development</b>	<b>3.34E-15</b>	<b>-33.3316</b>
GO:0048468	cell development	4.02E-15	-33.1478
<b>GO:0022008</b>	<b>neurogenesis</b>	<b>1.26E-14</b>	<b>-32.0018</b>
<b>GO:0030182</b>	<b>neuron differentiation</b>	<b>5.85E-14</b>	<b>-30.4701</b>
GO:0120036	plasma membrane bounded cell projection organization	7.48E-14	-30.2238
GO:0000902	cell morphogenesis	7.86E-14	-30.1742
<b>GO:0048812</b>	<b>neuron projection morphogenesis</b>	<b>8.56E-14</b>	<b>-30.089</b>
GO:0030030	cell projection organization	1.07E-13	-29.8637

## C

#1051\_IR\_DMSO



TermID	Term	Enrichment	logP
GO:0044237	cellular metabolic process	1.33E-37	-84.9119
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	1.31E-25	-57.2957
GO:0008152	metabolic process	2.33E-20	-45.2057
GO:0009058	biosynthetic process	2.99E-18	-40.3518
GO:1901576	organic substance biosynthetic process	4.50E-18	-39.9421
GO:0044249	cellular biosynthetic process	3.33E-17	-37.9396
GO:0071704	organic substance metabolic process	9.36E-17	-36.907
GO:0043412	macromolecule modification	1.92E-16	-36.1877
GO:0044238	primary metabolic process	2.95E-15	-33.457
GO:0036211	protein modification process	4.95E-15	-32.9396

#1051IR\_TMZ



TermID	Term	Enrichment	logP
GO:0044237	cellular metabolic process	4.39E-36	-81.413
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	3.54E-26	-58.6043
GO:0008152	metabolic process	2.73E-20	-45.0457
GO:0009058	biosynthetic process	3.09E-19	-42.6211
GO:1901576	organic substance biosynthetic process	8.38E-19	-41.6236
GO:0044249	cellular biosynthetic process	3.79E-18	-40.1136
GO:0071704	organic substance metabolic process	1.58E-15	-34.0824
GO:0044238	primary metabolic process	9.39E-15	-32.2992
GO:0016043	cellular component organization	1.52E-14	-31.8185
GO:0031323	regulation of cellular metabolic process	1.54E-14	-31.8039

## D

#1051\_DMSO



TermID	Term	Enrichment	logP
WP437	EGF/EGFR Signaling Pathway	0.000372341	-7.8957
WP481	Insulin Signaling	0.000469653	-7.66352
WP2446	Retinoblastoma (RB) in Cancer	0.001681839	-6.38787
WP179	Cell Cycle	0.002175515	-6.13049
WP1984	Integrated Breast Cancer Pathway	0.002754601	-5.89448
WP306	Focal Adhesion	0.003748963	-5.58628
WP3594	Circadian rhythm related genes	0.004723381	-5.35523
WP51	Regulation of Actin Cytoskeleton	0.008375846	-4.7824
WP2377	Integrated Pancreatic Cancer Pathway	0.008446318	-4.77402
WP465	Tryptophan metabolism	0.010711522	-4.53644

#1051\_TMZ



TermID	Term	Enrichment	logP
<b>WP2858</b>	<b>Ectoderm Differentiation</b>	<b>5.26E-05</b>	<b>-9.85271</b>
WP35	G Protein Signaling Pathways	0.000185542	-8.59223
WP465	Tryptophan metabolism	0.000828779	-7.09556
WP536	Calcium Regulation in the Cardiac Cell	0.001711318	-6.37049
<b>WP3584</b>	<b>MECP2 and Associated Rett Syndrome</b>	<b>0.004303271</b>	<b>-5.44838</b>
WP289	Myometrial Relaxation and Contraction Pathways	0.006057744	-5.10642
WP437	EGF/EGFR Signaling Pathway	0.006103196	-5.09894
WP306	Focal Adhesion	0.009119925	-4.69729
WP2380	Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) signaling pathway	0.009383069	-4.66885
WP2853	Endoderm Differentiation	0.00940326	-4.6667

## E

#1051\_IR\_DMSO



TermID	Term	Enrichment	logP
WP51	Regulation of Actin Cytoskeleton	0.000574	-7.46216
WP481	Insulin Signaling	0.001307	-6.64034
WP3594	Circadian rhythm related genes	0.002101	-6.16539
WP2446	Retinoblastoma (RB) in Cancer	0.003257	-5.72705
WP437	EGF/EGFR Signaling Pathway	0.003554	-5.63959
WP2380	Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) signaling pathway	0.004104	-5.49578
WP23	B Cell Receptor Signaling Pathway	0.006951	-4.96882
WP2637	Structural Pathway of Interleukin 1 (IL-1)	0.010985	-4.51121
WP465	Tryptophan metabolism	0.015785	-4.14868
WP179	Cell Cycle	0.016485	-4.10529

#1051IR\_TMZ



TermID	Term	Enrichment	logP
WP2118	Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy	0.000884178	-7.03085
WP481	Insulin Signaling	0.001021426	-6.88656
WP437	EGF/EGFR Signaling Pathway	0.002821358	-5.87054
WP2380	Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) signaling pathway	0.003322076	-5.70717
WP3594	Circadian rhythm related genes	0.004237044	-5.46389
WP306	Focal Adhesion	0.007886487	-4.8426
WP24	Peptide GPCRs	0.00876241	-4.73728
WP2637	Structural Pathway of Interleukin 1 (IL-1)	0.009914839	-4.61372
WP2446	Retinoblastoma (RB) in Cancer	0.013341388	-4.31688
WP465	Tryptophan metabolism	0.014365065	-4.24296

### Abbildung 32: Zusammenfassung der FAIRE-Analysen – Funktionelle und Signalweg-Analyse

**A-C:** Funktionelle GeneOntology-Annotation von Genen in der Nähe von Promotor-Peaks von GSC mit A) Strahlensektion und naiver #1051-Linie, B) TMZ-Selektion und DMSO-Referenzlinie, C) TMZ-Selektion nach Bestrahlung und entsprechender DMSO-Referenzlinie. Die 10 wichtigsten funktionellen GO-Kategorien sind dargestellt. Hervorgehoben sind die Kategorien, die in einer oder in beiden Gruppen angereichert sind. **D-E:** Signalweg-Assoziation (über WikiPathways-Datenbank) von Genen in der Nähe von Promoter-Peaks von GSC mit D) TMZ-Selektion und DMSO-Referenzlinie und E) TMZ-Selektion nach Bestrahlung und entsprechender DMSO-Referenzlinie. Quelle: Eigene Darstellung

Im zweiten Ansatz wurden Gene, die sich in der Nähe von Promotor-Peaks befinden, mit Hilfe der WikiPathways-Datenbank im Hinblick auf ihre Assoziation mit einem bestimmten Signalweg charakterisiert. Ähnlich wie bei den GO-Analysen zeigten die Ergebnisse der funktionellen Annotation durch Signalwege, dass sich die mit TMZ assoziierten Merkmale zwischen unbestrahlten und bestrahlten GSC unterscheiden. In unbestrahlten GSC waren die Ektoderm-Differenzierungs- und MECP2-Signalwege, die an der Neurogenese beteiligt sind, nach TMZ-Behandlung angereichert (Abbildung 32, D), nicht aber in bestrahlten GSC, die ein ähnliches Anreicherungsprofil wie die Referenzprobe aufwiesen (Abbildung 32, E). Das Ektoderm wird auch subspezialisiert, um das neurale Ektoderm zu bilden, aus dem das Neuralrohr und die Neuralleiste hervorgehen, aus denen sich später das Gehirn, das Rückenmark und die peripheren Nerven entwickeln. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind für die funktionelle Neurotransmission im gesamten zentralen Nervensystem notwendig und steuern neurophysiologische Prozesse, die von der Bewegung bis zur Stimmung reichen.

Somit stimmen sowohl GO- als auch WikiPathways-Analysen der FAIRE-seq-Daten mit der Schlussfolgerung überein, dass sich die Auswirkungen von TMZ auf den Zustand des Chromatins sowohl hinsichtlich des Anteils als auch des Funktionsspektrums der offenen Chromatinregionen zwischen unbestrahlten und bestrahlten GSC unterscheiden. In unbestrahlten GSC führt die TMZ-Behandlung zu einer Verringerung der Gesamtzahl der offenen Chromatin-Peaks sowie des Anteils der mit Promotoren assoziierten Peaks (Abbildung 31, B) was mit einer globalen Chromatinverdichtung vereinbar ist. Andererseits umfassen die Auswirkungen von TMZ auf die Chromatinstruktur auch eine regionale Öffnung (Dekondensation) innerhalb bestimmter Regionen, einschließlich derjenigen, die Gene beherbergen, die an der neuronalen Entwicklung beteiligt sind. In bestrahlten GSC ist das Chromatin weniger anfällig für die durch TMZ induzierten strukturellen Veränderungen. Dies wird durch das Fehlen signifikanter Veränderungen des Gesamtgrades der Chromatinöffnung oder des Anteils der mit Promotor assoziierten Peaks in bestrahlten GSC nach der Behandlung mit TMZ belegt.

## 6 Diskussion

Glioblastom-Stammzellen nehmen eine Schlüsselrolle in der nahezu unumgänglichen Rezidivierung von Glioblastomen trotz multimodaler Therapie ein, da sie ein vielfältiges Repertoire an inhärenten wie erworbenen Resistenzmechanismen gegen die alkylierende Therapie mittels Temozolomid und gegen Strahlentherapie aufweisen und hierdurch den Progress von GB vermitteln. Zur Rekapitulation der therapieinduzierten Veränderungen auf GSC auf zellulärer Ebene wurde in der folgenden Arbeit ein experimentelles Modell etabliert, um die Auswirkungen der Behandlung mittels TMZ, Bestrahlung und deren Kombination auf unterschiedlichen Ebenen untersuchen zu können. Hierzu wurden die Zelllinie #1051 und ihr vorbestrahtes Äquivalent #1051\_IR in einem mehrschrittigen Selektionsprozess mehrfach mit TMZ in klinisch relevanter Dosis behandelt und anschließend hinsichtlich ihrer Kapazität zur Selbsterneuerung, Differenzierung wie Proliferation sowie hinsichtlich ihrer Chromatin-Struktur charakterisiert.

### 6.1 Vorteile und Limitationen des experimentellen Modells

Als Kernbestandteil des experimentellen Designs wurde die aus einer GB-Primärkultur gewonnene Tumorstammzell-angereicherte Linie #1051 ausgewählt, um die Grundlage für ein experimentelles zellkulturbasiertes Modell zu legen. Dies aus dem Grund, dass GB-abgeleitete Tumorstammzellen einerseits eine bemerkenswerte phänotypische Ähnlichkeit mit physiologischen Neuralstammzellen aufweisen und andererseits in vivo die Kennzeichen ihres Primärtumors hinsichtlich genetischer Aberrationen, Genexpression und Phänotyp widerspiegeln [286, 465]. Von der Verwendung von etablierten (kommerziell erhältlichen) GB-Zelllinien wurde abgesehen, da diese hinsichtlich beider Aspekte eine geringe Verlässlichkeit aufweisen: Sie verlieren während ihrer langfristigen Kultivierung unter differenzierungsinduzierenden Bedingungen (in einem serumhaltigen Medium) ihre Stammzellkapazität und divergieren hinsichtlich Gen-Expressionsprofil und genomischen Veränderungen von ihren Primärkulturen [286, 466, 467]. Ein entscheidender Faktor in der Kultivierung von GB-abgeleiteten Tumorstammzelllinien für die Bewahrung ihrer phäno- und genotypischen Charakteristika ist die Verwendung von serumfreiem Medium unter Zusatz von Wachstumsfaktoren (wie bFGF und EGF), wie in dieser Arbeit berücksichtigt [286, 468]. Ähnliche GSC-Modelle wurden in anderen Arbeiten wie [315, 352, 428, 469] etabliert.

Das vorliegende experimentelle Modell ermöglichte die direkte Untersuchung der Auswirkungen einzelner Behandlungen aus TMZ und Strahlentherapie wie ihrer Kombination unter Verwendung klinisch-relevanter Dosen. Die verwendete TMZ-Dosis von 100  $\mu\text{M}$  liegt dabei geringgradig oberhalb der im Hirnparenchym von GB-Patienten gemessenen Konzentration von 30-50  $\mu\text{M}$  [144, 458]. Von GSC, die eine solche TMZ-Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  überleben, ist eine akkurate Rekapitulation der pathophysiologischen Tumorresistenz gegenüber TMZ zu erwarten gewesen. Zur Anwendung kommende TMZ-Konzentrationen oberhalb dieser Dosis (bis hin zu 4000  $\mu\text{M}$ ) in einigen Studien stellen keine physiologischen Begebenheiten dar und können damit ein nicht-repräsentatives Bild der TMZ-Wirkung beinhalten [449]. Das Dosierungsschema wurde mit 6 Zyklen ausgewählt, um den klinischen Standard einer adjuvanten TMZ-Therapie bei primären GB zu imitieren, die sich ebenso auf 6 Zyklen beläuft. Da die zelluläre Antwort nicht nur von der TMZ-Konzentration, sondern auch vom Dosierungsschema abhängt, ist die multiple TMZ-Applikation einer einmaligen hohen Dosis überlegen und näher an der physiologisch-klinischen TMZ-Antwort [449].

Als wichtiger Bestandteil dieser Arbeit wurden parallel zur TMZ-Selektion DMSO-Referenzlinien etabliert, die synchron mit TMZ-freiem DMSO behandelt wurden, da DMSO als Dissoziationsmedium für TMZ diene. Damit konnten in dieser Arbeit charakterisierte Veränderungen eindeutig der TMZ-Behandlung zugeordnet und von der DMSO-Wirkung differenziert werden. Nicht selten fehlen solche DMSO-Referenzlinien in experimentellen Studien zur TMZ-Wirkung in GB, sodass als TMZ-induziert deklarierte Effekte mit der toxischen Wirkung von DMSO vermischt werden können [449]. Allgemein ist die bisher fehlende Etablierung von standardisierten experimentellen Protokollen für TMZ-Behandlungen

anzumerken, weshalb jede Studie, so auch diese, einen individuellen Ansatz wählt, was den Vergleich der Ergebnisse erschwert.

Zusätzlich zur allgemeinen Charakterisierung der TMZ-Wirkung in GSC konnten diese dynamischen Veränderungen anhand des vorliegenden Modells zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Zuständen beschrieben werden. So war eine Beobachtung der dynamischen TMZ-Response und -Zytotoxizität zur Anfang der TMZ-Behandlung und ihre Entwicklung im Verlauf des mehrschrittigen Selektionsprozesses anhand der Zellviabilität (s. 5.2) möglich. Ferner konnten die TMZ-Behandlungsreaktion und die beschriebenen TMZ-induzierten Veränderungen durch die Verwendung von #1051 und #1051\_IR sowohl in unbestrahlten als auch in bestrahlten GSC modelliert werden. Dies ermöglichte eine Differenzierung von TMZ- und bestrahlungsspezifischen Effekten, die teilweise entgegengesetzt und teilweise konkordant waren. Auch konnte hiermit ein entsprechendes Äquivalent von bestrahlten und TMZ-behandelten GB erzeugt werden.

Das verwendete experimentelle Modell ermöglichte darüber hinaus eine direkte Analyse der durch die unterschiedlichen Behandlungen induzierten Veränderungen der Chromatinstruktur. Dies ermöglichte die Charakterisierung von therapieinduzierten longitudinalen epigenetischen Veränderungen in der vorliegenden GSC-Linie. Diese sind in rekurrenten GB bzw. GSC bisher wenig systematisch erforscht und können anhand des vorliegenden Modells näher beleuchtet werden. Die Auswirkungen dieser epigenetischen Evolution, anhand der Chromatinstruktur und -öffnung untersucht, konnten in der vorliegenden Arbeit direkt mit Veränderungen auf zellulärer Ebene wie Proliferation und Stammzellkapazität korreliert werden.

Limitierend für das verwendete experimentelle Modell ist insbesondere die unzureichende Modellierung des pathophysiologischen Tumormicroenvironment von GSC. Es liegt nahe, dass GSC ihr vollkommenes geno- und phänotypisches Potenzial in ihrer spezifischen Nischenumgebung ausschöpfen können, da das hier vorliegende komplexe und verzweigte Netzwerk vielfältig mit GSC wechselwirkt und ihr molekulares Profil beeinflusst (s. 2.5.4). Im vorliegenden Modell fehlen diese (und weitere) Komponenten des TME, das von relevanter Bedeutung für die Pathophysiologie und Therapieresistenz von GB ist. Das experimentelle Design dieser Arbeit (durch Kultivierung als Tumorsphären) ist für die Modellierung dieser funktionellen Einheiten nicht geeignet, sodass der Status der verwendeten GSC in vivo mutmaßlich von dem in vitro divergiert [470]. Der Umstand der eingeschränkten Modellierbarkeit des TME selbst und der Behandlungseffekte auf das TME muss bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit berücksichtigt werden.

Für zukünftige Studien ist damit eine Optimierung und Standardisierung von experimentellen Behandlungsprotokollen mittels TMZ (und Bestrahlung) notwendig. Zur Inkludierung und realitätsnahen Modellierung des TME im vorliegenden experimentellen Modell können in zukünftigen Arbeiten solche TMZ- und bestrahlungsresistenten GSC-Linien orthotop in Mäusen transplantiert werden, um den Einfluss von TME zu eruieren. Alternativ und näher an den pathophysiologischen Begebenheiten können solche GSC, die aus primären Glioblastomen isoliert wurden, orthotop in Mäuse transplantiert werden und in vivo mittels TMZ und Bestrahlung mehrschrittig behandelt werden, ähnlich wie in [432] umgesetzt. Hierdurch kann auch der Einfluss des TME bei der TMZ-Resistenzentwicklung näher beschrieben werden.

Zusammenfassend bietet das vorliegende Modell in Anbetracht der Tatsache, dass die Therapieresistenz von GB und das Wachstum nach der Therapie in erster Linie von GSC bestimmt werden, die Möglichkeit, (molekulare) Schlüsselprozesse zu identifizieren, die an der Resistenz von GB gegen Radiochemotherapie und der Rezidivbildung nach der Therapie beteiligt sind.

### 6.2 Zeitliche Dynamik und bestrahlungsvermitteltes Konterkarieren der TMZ-Zytotoxizität

Zur Entwicklung des experimentellen Modells wurde die GSC-Linie #1051 in unbestrahlter und bestrahlter Form mehrschrittig mit TMZ-haltigem DMSO und TMZ-freiem DMSO behandelt. Die währenddessen erhobenen Viabilitätsdaten zeigten allgemein einen biphasischen Erholungstrend, der eine initial betonte Reduktion der Viabilität der Zelllinien und eine zunehmende Erholung im weiteren Verlauf anzeigte, bis auf ein hohes, konstantes Niveau (s. 5.2). Dies weist darauf hin, dass die zytotoxische Wirkung von TMZ auf die GSC-Linie sich auf die Anfangsphase der Behandlung (bis zu 4 Behandlungsrunden) beschränkt. Dies deckt sich mit dem klinischen Nutzen von TMZ zu Beginn der antitumoralen Therapie für GB und Wirkverlust bei verlängerter Applikation der adjuvanten TMZ-Therapie bei primären GB mit IDH-Wildtyp [471]. Diese Entwicklung bestätigt die Überlegenheit einer multiplen TMZ-Applikation zur Rekapitulation des Therapieansprechens wie der therapieassoziierten Veränderung in GB anhand eines experimentellen Modells gegenüber einer einmaligen hochdosierten TMZ-Applikation [449]. Ferner ist bei progredienter Viabilitätszunahme eine zunehmende Robustheit der GSC gegenüber TMZ anzunehmen, was den dem Modell zugrundeliegenden Grundgedanken der Erzeugung eines TMZ-Resistenzmodells bestätigt. Für diesen Verlauf bieten sich mehrere Erklärungen. Naheliegend ist, dass die graduelle Abnahme der Viabilitätsreduktion durch eine graduelle Zunahme von TMZ-assoziierten Veränderungen begleitet wird, die die GSC weniger empfindlich für die Zytotoxizität von TMZ sein lassen. Diese könnten die hier beschriebene Zunahme der Proliferationsaktivität (Abbildung 25) wie zunehmende Abnahme der Chromatinzugänglichkeit (Abbildung 31) und andersartige Ausbildung von Resistenzmechanismen beinhalten. Andererseits zeigt die reine DMSO-Behandlung eine ähnliche Reduktion der Viabilität an, sodass eine zunehmende Toleranz gegenüber DMSO ursächlich für den Verlauf sein könnte. Für erstgenannte Erklärung einer vorrangig TMZ-vermittelten Toxizität und TMZ-assoziierten Veränderungen spricht eine größere Reduktion der Viabilität zu Beginn und eine schnellere Regeneration (in #1051\_TMZ gegenüber #1051\_DMSO) unter TMZ-Behandlung. Ferner konnte bereits in GB-Zelllinien der sukzessive Erwerb von resistenzvermittelnden molekularen Veränderungen durch wiederholte TMZ-Behandlung experimentell simuliert werden [264, 472]. Auch die hier dargestellte zeitliche Limitation der TMZ-Zytotoxizität und Viabilitätszunahme von TMZ-behandelten GB-Zelllinien bei zunehmender Behandlungsdauer konnte in anderen Arbeiten ebenso gezeigt werden [473].

Die bestrahlten GSC der Linie #1051 zeigten unabhängig von der Behandlung eine stets höhere Viabilität, insbesondere in den ersten Behandlungszyklen. Dennoch war eine DMSO-/TMZ-vermittelte Toxizität nachweisbar, die sich nach den ersten Behandlungszyklen anhand einer zunehmenden Viabilität abgeschwächt zeigte. Dies deutet daraufhin, dass bestrahlte GSC grundsätzlich eine geringere Empfindlichkeit gegenüber (zyto-)toxischen Effekten aufweisen. Als Ursache hierfür können eine allgemein erhöhte Robustheit und Resistenzkapazität postuliert werden, die durch strahleninduzierte Veränderungen erworben wurden, wie eine höhere Kapazität zur Selbsterneuerung und zur Proliferation (s. 5.3 und 5.5). Als konkurrierende Ursache kann die Bestrahlung selbst die GSC unempfindlicher gegenüber TMZ machen, was experimentelle Daten nahelegen. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, wie eine Co-Behandlung von TMZ und Bestrahlung nur dann einen zusätzlichen zytotoxischen Effekt hatte, wenn die TMZ-Behandlung vor der Bestrahlung erfolgt ist; eine TMZ-Nachbehandlung hatte kaum einen Effekt [474, 475]. Daher wird TMZ als Radiosensibilisator angesehen, wenn die Behandlung mit TMZ vor der Bestrahlung erfolgt [474]. Dies erklärt, wieso die bestrahlten GSC in dieser Arbeit deutlich unempfindlicher gegenüber der TMZ-Zytotoxizität waren. Als molekulare Ursache wird hypothetisiert, dass die Bestrahlung bekanntermaßen einen Zellzyklus-Arrest auslöst wie eine Herabregulierung der MMR-Gene *in vitro* (MSH2 und MSH6) [474]. Diese Faktoren sind maßgeblich für die TMZ-vermittelte Zytotoxizität, da diese sich auf sich replizierende Zellen begrenzt und funktionsfähige MMR-Mechanismen voraussetzt [474].

Klinische Implikation dieser Erkenntnisse ist, dass zum einen die Behandlung mit TMZ (bei aktuell paralleler Gabe bei neudiagnostiziertem GB) grundsätzlich der Strahlentherapie vorangehen und bei konkomitierender Gabe vorangestellt sein sollte, um die zytotoxische TMZ-Wirkung nicht zu konterkarieren [474]. Zum anderen kann ein verbesserter Nutzen der TMZ-Behandlung bei intensivierter TMZ-Therapie zu Beginn postuliert werden, da hier die Suszeptibilität von GSC gegenüber TMZ am höchsten ist, zumindest bei der vorliegenden Linie. Bisherige alternative Therapieschemata mittels verlängerter adjuvanter TMZ-Therapie oder mittels hoher TMZ-Dosis konnten allerdings keinen klinischen Nutzen im Sinne eines Überlebensvorteils zeigen [95, 471]. Möglicher Grund ist neben der generellen Limitation des TMZ-Nutzens die oben erwähnte bestrahlungsvermittelte Abschwächung der TMZ-Wirkung, da erwähnte Studien alternative TMZ-Schemata in paralleler Gabe zur Bestrahlung untersucht haben.

### 6.3 Selbsterneuerungskapazität unter TMZ

Als inhärente Charakteristik nimmt die (unlimitierte) Selbsterneuerung eine grundlegende Rolle in der Pathophysiologie von GSC ein. Sie ist die Grundlage für die Erhaltung ihres Stammzellstatus wie für ihr tumorigenes Potenzial. Um den Einfluss einer TMZ-Resistenz hierauf zu untersuchen, wurde die Selbsterneuerungs- und Stammzellkapazität der (selektierten) Zelllinien mittels Extreme Limited Dilution Assay untersucht und die Stammzellfrequenz bestimmt. Hier zeigte sich eine TMZ-vermittelte Erhöhung der Selbsterneuerungskapazität von sowohl naiven wie vorbestrahlten GSC. Vorbestrahlte GSC wiesen allgemein eine höhere Stammzellfrequenz gegenüber unbestrahlten GSC auf. DMSO hemmte die Selbsterneuerung allein in bestrahlten GSC durch Reduktion der Stammzellfrequenz.

#### 6.3.1 Vorteile und Limitationen des ELDA

Üblicherweise wird zur Bestimmung der Selbsterneuerungskapazität das Neurosphären-Assay (auch sphere-forming assay genannt) angewandt, das als Standard-in-vitro-Methode zur Identifizierung von GSC und anderen Tumorstammzellen gilt [476]. Es wird in den verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Modifikationen durchgeführt; gemein ist die Ausplattierung von Einzelzell-Suspensionen in einem serumfreien Medium auf einer nicht-adhärenen Platte [476]. So sehen die meisten Studien eine einmalige Durchführung vor, wie in [461, 477, 478], während einige wie [415] eine serielle Durchführung bis zu sechs Passagen vornehmen. Die Stammzellhäufigkeit wird je nach Modifikation unterschiedlich anhand der durchschnittlichen Sphärengröße und/oder der Anzahl der gebildeten Sphären berechnet [461, 477-480].

Die hier durchgeführte ELDA-Methode weist gegenüber dem Neurosphären-Assay mehrere Vorteile auf. Zum einen erfolgte die Ausplattierung einer im Vergleich sehr geringen Zellzahl (bis zu einer Zelle/Well), die eine akkuratere Beurteilung der Klonalität der einzelnen Zelle ermöglicht als eine Neurosphären-Bildung bei tausenden zugrundeliegenden Zellen. Insbesondere ist die Aggregation und Fusion von Neurosphären ein häufig beobachtetes Phänomen, sodass individuelle Sphären nicht klonalen Ursprungs sein müssen, sondern eher chimäre Gebilde darstellen [476]. Dies schränkt entscheidend die Aussagekraft der Bewertungsgrundlage mittels Sphärengröße und -anzahl ein. Das ELDA wirkt diesem Artefakt entgegen, da ferner die Sphärenfusion keinen Einfluss auf die Auswertung des Experiments besitzt (als Alles-oder-nichts-Reaktion, s. 4.4.1). Zum anderen scheint die anhand eines etablierten Modells nach [451] berechnete Stammzellfrequenz im ELDA ein überlegeneres Maß für die Selbsterneuerungskapazität als die Berechnung der Stammzellhäufigkeit anhand der Sphärenanzahl zu sein. Dies, da die Schätzung der Stammzellhäufigkeit anhand der Sphärenhäufigkeit die allgemein akzeptierte Prämisse einer Eins-zu-Eins-Beziehung zwischen Neurosphären und (Tumor-) Stammzellen voraussetzt (d.h. jede Sphäre würde von einer Stammzelle abstammen) [481]. Hierfür besteht jedoch kein experimenteller Beweis und diese Annahme ist ungültig, sodass hierdurch die Stammzellfrequenz überschätzt wird [481].

Trotz der verbreiteten Anwendung von solchen in vitro-Methoden zum Nachweis und zur Anreicherung von (Tumor-)Stammzellen bestehen grundsätzliche Bedenken bezüglich des Designs dieser Methoden. So könnten (im Neurosphären-Assay und ELDA) entstehende Neurosphären auf die Versuchsbedingungen selbst zurückzuführen und ein Artefakt dieser sein, anstatt ein (patho-)physiologisches Ereignis widerzuspiegeln [476]. Da das TME und die GSZ-spezifischen Nischen unzulänglich modelliert werden, können ihr Einfluss und ihre Wechselwirkung nicht reflektiert werden (s. 6.1) [476]. Weiterhin stellen Neurosphären komplexe, heterogene Zellcluster aus Stammzellen, Progenitorzellen und differenzierten Zellen dar, von denen nicht nur Stamm-, sondern auch Progenitorzellen begrenzte Kapazität zur Selbsterneuerung via Bildung von Neurosphären aufweisen [476]. Die Grenze von Letztgenannten scheint bei sechs seriellen Passagen zu liegen, nur Stammzellen weisen eine darüberhinausgehende (uneingeschränkte) Kapazität zur Selbsterneuerung auf [482, 483]. Um diese beiden Voraussetzungen zu berücksichtigen, bietet sich ein weiterentwickeltes Modell zur spezifischeren Identifizierung von GSC und Darstellung ihres Selbsterneuerungspotenzials an. Dieses sieht die orthotope Transplantation von Glioma- bzw. Tumorsphären von GB in (immunsupprimierten) Mäusen vor und die serielle Passagierung (und damit Durchführung eines in vivo-Neurosphären-Assays) der Tumorsphären über 6 Passagen (in Mäusehirnen), wie in [483] durchgeführt. Eine Alternative ist die Durchführung eines in vivo-ELDA durch die orthotope Transplantation einer Einzelzell-Verdünnungsreihe in Mäusen, wie in [246] angewandt.

### 6.3.2 TMZ-vermittelte Verstärkung der Stammzellkapazität von GSC

Die beobachtete TMZ-induzierte Erhöhung der Stammzellfrequenz in der GSC-Linie #1051 stellt eine Vergrößerung der GSC-Population und der Selbsterneuerungskapazität dar. Sie zeigt eine Verstärkung der Stammzellkapazität als Konsequenz einer mittelfristigen TMZ-Behandlung auf, die mutmaßlich zu einer verstärkten Therapieresistenz führt und Bestandteil der Rezidivbildung von GB ist. Dies lag sowohl in unbestrahlten als auch bestrahlten GSC der Linie #1051 vor. In bestrahlten GSC scheint die DMSO-Toxizität potenziert zu sein, was der naheliegende Grund dafür ist, dass die Stammzellfrequenz von TMZ-Klonen geringfügig unterhalb der elterlichen #1051\_IR-Linie lag. Diese Beobachtung ist nicht spezifisch für die vorliegende GSC-Linie, sondern konnte in anderen GSC-Linien in vitro wie in vivo rekapituliert werden, wo eine TMZ-vermittelte Expansion der GSC-Population und eine Erhöhung der Selbsterneuerungsaktivität festgestellt werden konnten [473, 484, 485]. Dies ist wie oben in 5.2 dargestellt und [486] beschrieben von einer abnehmenden Suszeptibilität gegenüber TMZ begleitet als Korrelat für eine zunehmende TMZ-Resistenz.

Als Ursache dieser Entwicklung lassen sich drei Szenarien vermuten, die separat oder synchron vorliegen können. Zum einen kann eine therapieinduzierte Selektion von GSC vorliegen, die ein größeres inhärentes Resistenzpotenzial inmitten der intratumoralen Heterogenität (innerhalb der #1051-Linie) aufweisen, sodass sie positiv selektiert werden und sich der Stammzellanteil erhöht. Zum anderen kann eine therapieinduzierte Dedifferenzierung vorliegen, bei der differenzierte Nicht-GSC dedifferenzieren und GSC-ähnliche Charakteristiken erwerben und dadurch den Stammzellanteil erhöhen [485]. Zuletzt ist eine Expansion der GSC-Subpopulation möglich, durch einen therapeutischen Stimulus zum selektiven Wachstum von GSC [485].

Es lässt sich eine zunehmende experimentelle Evidenz konstatieren über eine TMZ-getriebene Konversion von Nicht-GSC zu GSC. So wurde eine TMZ-vermittelte Hochregulierung von phänotypischen GSC-Markern wie CD133, CD44 und SOX2 nachgewiesen, die anhand von Abstammungsanalysen auf eine Konversion von Nicht-GSC in GSC zurückgeführt werden konnte [484-486]. Diese phänotypische Konversion hin zu einer undifferenzierten GSC-Population ist durch einen funktionalen Erwerb von stammzellähnlichen Eigenschaften wie der Selbsterneuerungskapazität begleitet, und von einer zunehmenden Resistenz gegenüber TMZ [486]. Als mögliche Erklärung auf molekularer Ebene für diese Entwicklung wird ein TMZ-induzierter hypoxischer Stress vermutet, der die Hypoxie-induzierten Faktoren HIF-1 und -2 hochreguliert und wie in 2.5.4 und 2.4.2.2.1 beschrieben zu einer vermehrten Stammzellkapazität und Therapieresistenz führt [487].

Demnach kann die TMZ-Behandlung der #1051-Linie eine Dedifferenzierung in differenzierten GB- und Progenitorzellen und eine Konversion in GSC ausgelöst haben, welche die erhöhte Stammzellkapazität posttherapeutisch erklärt. Ein entsprechendes phänotypisches Korrelat lässt sich hierzu in der TMZ-vermittelten Verringerung des Differenzierungspotenzials und der GFAP-Expression (s. Abbildung 24) finden. Ferner wurde neben obigem Konversionsmechanismus eine TMZ-vermittelte Amplifikation von GSC-Populationen berichtet [484]. Demnach kann die Erhöhung der Stammzellfrequenz der #1051-Linie auch teilweise durch eine Expansion von elterlichen GSC erklärt werden, wie es die verstärkte Proliferation von GSC (anhand der Ki-67-Expression) nach TMZ-Behandlung aufzeigte (s. Abbildung 25).

### 6.3.3 Erhöhung der Selbsterneuerungskapazität von GSC durch Strahlentherapie

Ein gleichgerichteter Effekt auf die Stammzellkapazität lässt sich auch nach der Bestrahlung der GSC der Linie #1051 feststellen. Ähnlich wie nach TMZ-Behandlung zeigt sich auch hier die Stammzellfrequenz erhöht und damit die Selbsterneuerungskapazität verstärkt, wie bereits für die #1051-Linie in [1] beschrieben. Dies ist mutmaßlich ein inhärentes Charakteristikum und allgemeine Folge der Radioresistenz von GSC, da ein gleichgerichteter Zusammenhang zwischen ionisierender Bestrahlung und Stammzellkapazität von GSC in vielen Arbeiten rekapituliert werden konnte. So hatte eine fraktionierte Strahlenbehandlung von GB-Zelllinien sowohl in vivo wie in vitro eine Anreicherung der GSC-Subpopulation zur Folge [1, 34, 488-490].

Prinzipiell lassen sich als Ursache dieser Wechselwirkung die oben genannten Szenarien vermuten, nämlich eine therapieinduzierte Selektion von GSC, eine proliferative Expansion von GSC und eine therapieinduzierte Dedifferenzierung von Nicht-GSC hin zu GSC unter Erwerb von Stammzeleigenschaften. Tatsächlich sind hier alle drei Entwicklungen wahrscheinlich. Zum einen weisen GSC eine inhärent, größere Resistenzkapazität gegenüber ionisierender Strahlung als differenzierte GB-Zellen auf, wie in 2.5.8.1 beschrieben, u.a. durch ihre größere DNA-Reparaturkapazität, ihr Tumormicroenvironment und Hochregulierung von diversen Radioresistenz-vermittelnden Signalwegen, infolge derer eine geringe Zytotoxizität und Apoptoserate unter Bestrahlung eintreten [34]. Zum anderen beschrieben Gao et al. (2013) anhand einer experimentell gestützten Simulation, dass allein die Selektion von GSC nicht ausreicht, um die beobachtete Frequenzerhöhung von GSC zu erklären [491]. Vielmehr sind eine zusätzliche Zellzyklusprogression und eine Verstärkung der proliferativen Aktivität von GSC vonnöten, sodass ebenso eine Expansion der GSC-Subpopulation unter der Bestrahlungsbehandlung stattfindet, wie in [489] nachgewiesen. Zuletzt ist in experimentellen zellbasierten Modellen nicht nur eine TMZ-assoziierte, sondern auch eine bestrahlungsinduzierte Dedifferenzierung und Konversion von differenzierten GB-Zellen in GSC beschrieben, die mit einer Hochregulierung von Stammzellmarkern und einer Herabregulierung von neuronalen Differenzierungsmarkern einhergeht [109, 420, 488, 490].

Zusammengefasst stützen die aus den ELDA gewonnenen Erkenntnisse die Validität und Reliabilität des implementierten, TMZ- und bestrahlungresistenten GSC-Modells in dieser Arbeit, das eine Verstärkung der Stammzellkapazität der GSC-Linie #1051 nach TMZ- und Strahlentherapie aufzeigt. Dies liefert zusätzliche experimentelle Evidenz für eine therapievermittelte Erhöhung der Stammzellkapazität von GSC, die Teil der TMZ-Resistenz ist und vorrangig durch die Konversion von Nicht-GSC in GSC und den Erwerb stammzellähnlicher Eigenschaften begründet zu sein scheint. Für zukünftige Arbeiten steht insbesondere die Korrelation der Ergebnisse hinsichtlich erhöhter Selbsterneuerungskapazität der GSC nach Bestrahlung und/oder TMZ mit ihrer Tumorigenität in vivo (durch orthotope Transplantation) aus. Kalasauskas et al. (2020) konnten entgegen der allgemeinen Annahme, dass Selbsterneuerung das tumorigene Potenzial von GSC widerspiegelt, keine Korrelation zwischen Selbsterneuerungskapazität und Tumorwachstumsraten feststellen [1].

### 6.4 Negative Korrelation zwischen TMZ- und Strahlungsresistenz und Differenzierungsgrad

Zur Multipotenz von physiologischen Neuralstammzellen wie Glioblastom-Stammzellen gehört ihre Fähigkeit zur Erhaltung eines undifferenzierten Zustandes wie zeitgleich die Bildung von Tochterzellen, die einen funktionell wie morphologisch differenzierten Zustand einnehmen. Dies schafft die Grundlage für die markante intratumorale Heterogenität von GB und hält diese aufrecht. Zur Untersuchung der TMZ-Wirkung auf die Differenzierungskapazität der selektierten Zelllinien erfolgte eine immunfluoreszente Visualisierung und Bestimmung der GFAP-Expression. Hier zeigte sich eine fehlende GFAP-Expression unter selbsterneuerungsfördernden Bedingungen in allen Zelllinien, während differenzierungsfördernde Bedingungen eine GFAP-Expression induzierten. Der unterschiedlich stark ausgeprägte Anstieg der GFAP-Expression in differenzierungsfördernden Bedingungen steht repräsentativ für das multipotente und Differenzierungspotenzial der vorliegenden GSC-Linien. Das Ausmaß der Differenzierung bleibt dennoch beschränkt, was wohl den grundsätzlich dedifferenzierten Zustand der Zelllinie #1051 widerspiegelt [396].

Sowohl in unbestrahlten wie bestrahlten GSC hatte DMSO auf die GFAP-Expression einen fördernden Effekt, während TMZ diese verringerte. Die TMZ-vermittelte Reduktion der GFAP-Bildung spiegelt eine Reduktion des Differenzierungspotenzials der behandelten GSC wider. Dies zeigt an, dass eine mehrfache Behandlung mit TMZ und eine Resistenz gegen dieses in GSC mit einem verringerten Differenzierungspotenzial und -grad einhergehen. In der Literatur wird eine gegenläufige Wechselwirkung zwischen der TMZ-Resistenz und dem Differenzierungsgrad von GSC beschrieben. So bewirkt eine Behandlung von GSC mit verschiedenen Wirkstoffen (u.a. Calcitriol und  $\beta$ -Elemen) eine höhere Suszeptibilität dieser GSC gegenüber TMZ und geringere Viabilität über die Stimulation einer verstärkten Differenzierung dieser GSC und Hochregulierung der GFAP-Expression [492-496]. Damit nimmt die TMZ-Resistenz von GSC mit zunehmender Differenzierung ab. Eine solche differenzierungsinduzierende antitumorale Therapie wurde für GSC bereits untersucht; eine zunehmende Beeinträchtigung der Tumorigenität und Therapieresistenz wurde beobachtet [497]. Ebenso bewirkte die reine Kultivierung von GSC unter differenzierungsfördernden Bedingungen (ohne weitere Behandlung) eine größere Suszeptibilität gegenüber TMZ [498]. Diese Beobachtungen sind kongruent mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Dies aus dem Grund, dass eine zunehmende TMZ-Suszeptibilität durch einen zunehmenden Differenzierungsgrad im Umkehrschluss einen abnehmenden Differenzierungsgrad bei zunehmender TMZ-Resistenz bedeutet, wie in dieser Arbeit bei der GSC-Linie #1051 beobachtet wurde.

Konträr zu diesen Beobachtungen und angeführten Arbeiten stehen die Ergebnisse von Beier et al. (2008). Sie berichteten von einer selektiven TMZ-Zytotoxizität, da die TMZ-Behandlung von GSC-angereicherten GB-Zelllinien selektiv (CD133-positive) GSC dezimierte, während der Anteil an differenzierten (CD133-negative) Nicht-GSC unverändert blieb [430]. Sie postulierten daher, dass TMZ entweder selektiv gegen GSC zytotoxisch ist (und differenzierte GB-Zellen verschont) oder eine Differenzierung von GSC induziert [430]. Mehrere Faktoren schränken dabei die Aussagekraft dieser Arbeit ein. Zum einen haben die Autoren die Wirkung von Temozolomid nicht unter vollständig differenzierenden Bedingungen (FBS-haltiges Medium) untersucht [498]. Zum anderen stützt sich die Schlussfolgerung der selektiven Dezimierung von GSC auf den konstant bleibenden Anteil an CD133-negativen Zellen und der verminderten Kapazität zur Tumorsphärenbildung, wobei Ersteres als Äquivalent für differenzierte Nicht-GSC und Zweiteres als Äquivalent für GSC betrachtet wurde. Allerdings können Tumorsphären, wie in 5.2 erläutert, nicht nur von GSC, sondern auch von Nicht-GSC gebildet werden. Da hier keine serielle Durchführung stattfand, kann der Schluss auf eine GSC-spezifische Dezimierung nicht gezogen werden. Ebenso ist ein negativer CD133-Status kein definitives Ausschlusskriterium für einen GSC-Status, da eine hohe Falsch-Negativ-Rate vorliegt (s. 2.5.5). Demnach kann in der obig erwähnten Arbeit, in der kein anderes Kriterium

herangezogen wurde, die Dezimierung der Zellzahl durch TMZ nicht auf eine bestimmte Subpopulation spezifiziert werden.

Als Erklärung für das dargelegte Verhältnis zwischen Differenzierungsgrad und TMZ-Resistenz von GSC lässt sich vermuten, dass es ein Ausdruck einer TMZ-induzierten Dedifferenzierung von Nicht-GSC hin zu einem GSC-ähnlichen Zustand ist, wie in 6.3.2 dargelegt, die zu einer Verringerung der Nicht-GSC-Population führt und damit zu einer Verminderung des GFAP-Expressionsgrades führt. Alternativ ist zu hypothetisieren, dass TMZ das inhärente Differenzierungspotenzial reduziert, indem es Differenzierungsmechanismen blockiert und GSC und/oder GB-Zellen auf dem Differenzierungspfad hin zu einem undifferenzierten Zustand bewegt. Die TMZ-vermittelte Erhöhung der Stammzellkapazität aus Abbildung 23 wäre damit vereinbar. Ferner ist für TMZ eine hemmende Wirkung auf die neuronale Differenzierung bekannt, die die verminderte Differenzierungskapazität erklären könnte [499-502].

Auch nach Bestrahlungsbehandlung der „naiven“ #1051-Linie zeigte sich eine Verringerung der GFAP-Expression als Abbild einer verringerten Differenzierungskapazität. Ähnlich wie in 6.3.3 scheint auch hier eine im Vergleich zur TMZ-Therapie gleichgerichtete Beziehung zwischen der Bestrahlung(-sresistenz) und dem Differenzierungsgrad von GSC bzw. GB-Zellen zu bestehen. So geht auch hier eine zunehmende Differenzierung von GSC mit einer abnehmenden Radioresistenz einher: Bei experimenteller Förderung der Differenzierungskaskade in GSC durch verschiedene Wirkstoffe und erhöhter Expression von Differenzierungsmarkern nimmt die Radiosensitivität der behandelten GSC zu [503-505]. Mögliche Erklärungen für diese entgegengesetzte Beziehung decken sich mit obigen Überlegungen (einer behandlungsinduzierten Dedifferenzierung von GB-Zellen (s. 6.3.3) bzw. Reduktion des inhärenten Differenzierungspotenzials).

### 6.5 Proliferationsfördernde Wirkung der TMZ- und Strahlenresistenz

Die Untersuchung der Proliferationskapazität der selektierten GSC erfolgte anhand der Bestimmung des Ki67-Index nach immunfluoreszenter Färbung. Eine starke Erhöhung der proliferativen Aktivität wurde durch Bestrahlung bewirkt. Die TMZ-Behandlung hatte auf unbestrahlte GSC einen bescheidenen proliferationsfördernden Effekt unter differenzierungsfördernden Bedingungen, während sie eine starke, mehrfache Erhöhung der Proliferationsaktivität auf bestrahlte GSC unter differenzierungs- und selbsterneuerungsfördernde Bedingungen hatte. Die DMSO-vermittelte Proliferationsreduktion aufgrund seiner Toxizität kam vor allem in bestrahlten GSC zu tragen.

Als Alternative zur Ki67-Färbung zur Bewertung von Zellproliferation werden in einigen Studien das sog. MTT-Assay (wie in [477, 479]) oder das BrdU-Assay (wie in [1, 290]) angewandt. Das Erstere stellt eine farbmetrische Methode zur Messung der Viabilität und metabolischen Aktivität von Zellen dar [506]. Dies erfolgt durch die Quantifizierung der Farbreaktion, die durch zelluläre Aufnahme und metabolische Umsetzung des MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Substrats entsteht [506]. Dies stellt eine sensitive Methode zur Messung der Viabilität dar, jedoch werden im Gegensatz zur Ki67-Färbung metabolisch aktive Zellen auch dann markiert, wenn sie proliferativ nicht aktiv sind [506]; dies ist bei der Bewertung zu beachten, da sie die Spezifität womöglich einschränkt. Das BrdU-Assay stellt ebenso eine farbmetrische Methode dar. Hierbei erfolgt die Gabe des synthetischen Nukleosid-Analogons BrdU (Bromdesoxyuridin), das proliferierende und damit DNA-replizierende Zellen die neu synthetisierte DNA einbauen [506]. Durch die immunfluoreszente Markierung des integrierten BrdU kann die Proliferationsbestimmung der Zellen erfolgen. Dies stellt eine sensitive wie spezifische Nachweismethode dar. Sie weist gegenüber der Ki67-Immunmarkierung den Vorteil auf, dass spezifisch Zellen in der Replikationsphase markiert werden, während die Intensität der Ki67-Färbung von der spezifischen Zellzyklus-Phase abhängt und variiert [460]. Während BrdU damit ein binärer Marker ist, scheint Ki67 eher ein gradueller Marker zu sein [460].

Trotz der zytotoxischen Wirkung des alkylierenden TMZ (zu Beginn der Behandlung) wird die proliferative Kapazität der behandelten GSC bei mehrfacher Behandlung erhöht. Nach überwindener Suszeptibilität der GSC kehrt sich also die Auswirkung des TMZ um, von einem auf proliferative Zellen beschränkt wirkendem zytotoxischen Agens, das Zellen depletiert, hin zu einer TMZ-vermittelten Steigerung der Proliferationsfähigkeit. Dabei wurde die initiale depletierende und proliferationsvermindernde Wirkung von TMZ (ersichtlich anhand verminderter Ki67-Expression) von GB-Zellen und GSC nach einmaliger Behandlung in mehreren Arbeiten gezeigt ([430, 477, 507, 508]) ebenso wie eine Erhöhung der proliferativen Aktivität (mit erhöhter Ki67-Expression) nach mehrschrittiger Behandlung und der Erwerb einer TMZ-Resistenz wie in dieser Arbeit gezeigt ([486, 509]). Auch die beschriebene Verstärkung der proliferativen Aktivität und Ki67-Expression nach Strahlentherapie (in [1, 510]) deckt sich mit den hiesigen Ergebnissen. Hierin ist diese TMZ-assoziierte Hochregulation der Proliferation entweder als Konsequenz TMZ-vermittelter molekularer Veränderungen oder als zelluläre Adaptation auf die TMZ-Therapie zu begründen.

Im Zusammenschau mit der dargestellten Erhöhung der Stammzellfrequenz in Abbildung 23 liegt die Vermutung nahe, dass die proliferationssteigernde Wirkung der TMZ-Behandlung Ausdruck einer vermehrten Proliferation der behandelten GSC und damit Expansion der GSC-Population ist. Damit würde der allgemein von GSC angenommene ruhende (englisch quiescent) Zustand durch TMZ hin zu einem proliferativen Phänotyp beeinflusst werden. Alternativ könnte die erhöhte Ki67-Expression darauf zurückgeführt werden, dass die (postulierte) neue Subpopulation an dedifferenzierten konvertierten GSC einen stärker proliferativen Phänotyp als elterliche GSC aufweisen, wie in [485, 486] hypothetisiert.

Bemerkenswerterweise waren der Stammzellanteil und der Ki67-Index auch in GSC erhöht, die aus rekurrenten GB nach klinischer TMZ- und Strahlentherapie gewonnen wurden ([511]), kongruent zu den Ergebnissen des hier verwendeten Modells therapieresistenter GSC. Dies weist darauf hin, dass GSC, die eine Radiochemotherapie überleben (in vitro wie in dieser Arbeit und in vivo wie in [511]), zu einem proliferativen GSC-Phänotyp wechseln und den Rezidivtumor bilden, wie die Autoren in [511] darlegen.

Auffällig ist die deutliche Betonung der Proliferationserhöhung nach TMZ-Behandlung in bestrahlten GSC im Vergleich zu unbestrahlten GSC. Demnach kommt die TMZ-vermittelte Proliferationsverstärkung in GSC mit strahlungsinduzierten Veränderungen deutlich stärker zu tragen als in unbestrahlten. Allgemein ist die komplexe Wechselwirkung zwischen TMZ- und Strahlentherapie kaum erforscht [474]. Es bleibt hier nur zu vermuten, dass die TMZ- und Strahlenbehandlung die Proliferationsfähigkeit von GSC über proliferationsfördernde molekulare Veränderungen in kooperativer Weise verstärken. Dies könnte synergistisch wirkende und sich gegenseitig potenzierende Veränderungen erfolgen.

Diese Wechselwirkung muss weiter erforscht werden, über bspw. eine dezidierte Untersuchung der hochregulierten (proliferationsbetreffenden) Signalwege in GSC nach TMZ- und Strahlentherapie, die Aufschluss darüber geben kann, inwieweit sich beide Resistenzen überschneiden und synergistisch wirken. [397]. Ferner müssen die hier gewonnenen Erkenntnisse über Einfluss von Bestrahlung und TMZ auf die Differenzierung wie Proliferationsaktivität von GSC und ihre Implikationen in zukünftigen Arbeiten weiter evaluiert werden, insbesondere durch ihre Korrelation mit dem in vivo-Verhalten von GSC und ihrer Tumorigenität.

### 6.6 Verlängerte Zellzyklusdauer nach TMZ-Selektion

Zur Bestätigung der erhöhten Proliferationskapazität unter TMZ-Einfluss erfolgte die Ermittlung der Verdopplungszeit der selektierten Zelllinien mittels Live-Cell Imaging-Mikroskopie. Sie ist ein Maß für die Dauer des Zellzyklus. Als Alternative hierzu kann das Wachstumsassay aus [509] betrachtet werden, wo eine gleiche Zellzahl unter verschiedenen Konditionen ausplattiert wird und in regelmäßigen Intervallen gezählt wird. Hieraus kann eine Wachstumskurve erstellt

werden, die Aufschluss über die Proliferationsgeschwindigkeit gibt und aus der die Verdopplungszeit der Gesamtpopulation bestimmt werden kann. Ihm liegt also eine Gesamtbetrachtung der Zellkultur zugrunde und keine Einzelzellbetrachtung wie bei der Live-Cell-Imaging-Mikroskopie.

Die bestrahlten Zelllinien zeigten nach Behandlung im Vergleich zu den unbestrahlten Linien eine kürzere Verdopplungszeit auf. Dagegen wiesen TMZ-behandelte GSC (unabhängig von ihrem Bestrahlungsstatus) verlängerte Verdopplungszeiten auf. Dies überrascht, da anhand der in Abbildung 25 dargestellten Verstärkung der Proliferationsaktivität durch TMZ eine verkürzte Verdopplungszeit zu erwarten war, wie bei den bestrahlten GSC bestehend. Diese Verlängerung der Verdopplungszeit und damit des Zellzyklus ist anhaltend, da sie lange Zeit nach Beendigung der TMZ-Behandlung festgestellt werden konnte. Eine naheliegende Erklärung hierfür ist in der beschriebenen Auswirkung des TMZ auf den Zellzyklus zu vermuten. Die Zytotoxizität von TMZ wird über einen G2/M-Zellzyklusarrest von proliferierenden Zellen (über die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen) vermittelt [129, 259, 462]. Die mehrfache Behandlung der GSC mit TMZ in dieser Arbeit führte zu einer zunehmenden Viabilität und Abschwächung der zytotoxischen Wirkung, sodass auch eine abnehmende Effizienz dieses Zyklusarrests anzunehmen ist. Demnach ist es naheliegend zu vermuten, dass die selektierten GSC diesen G2/M-Arrest überwinden konnten, sodass keine Apoptose oder Autophagie aktiviert wird, und weiterhin proliferieren; die verlängerte Zyklusdauer bliebe demnach als Konsequenz dieses initialen Zyklusarrests erhalten. Die Ki67-Expression ist hierdurch nicht beeinflusst, da es in allen Zellzyklusphasen außer der G0-Ruhephase exprimiert wird [398].

Unterstützend hierfür zeigten Lin et al. (2018) sowohl eine Zunahme des G2/M-Arrests wie zeitgleich eine Abnahme der Apoptoserate in GB-Zelllinien mit experimentell erworbener TMZ-Resistenz auf, die eine langsamere Proliferation und damit eine längere Zellzyklusdauer aufwies [479]. Die Autoren vermuteten, dass der durch TMZ ausgelöste G2/M-Arrest nicht nur ein zerstörerischer, sondern auch ein rekonstruktiver Prozess für Glioblastomzellen ist, wo beispielsweise die DNA-Reparatur intensiviert werden kann. Tiek et al. (2018) wiesen konträr hierzu einen fehlenden G2/M-Arrest als Charakteristikum für TMZ-selektierte GB-Zelllinien nach, der bei erneuter TMZ-Behandlung wesentlich geringfügiger zu induzieren war (als bei TMZ-nativen Zellen) [509]. Diese offenbar widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich nach Yamashiro et al. (2020) mit einer unterschiedlichen Reaktion von TMZ-selektierten Glioblastomzellen erklären, da in ihrer Arbeit einige GB-Zellen nach TMZ-Selektion einen transienten G2/M-Arrest aufwiesen, während bei anderen kein Zellzyklus-Arrest beobachtet wurde [259]. Demnach kann die beobachtete Verlängerung der Zellzyklus-Dauer bei TMZ-selektierten Zelllinien in dieser Arbeit vielmehr einen linienspezifischen Effekt darstellen als ein universales Charakteristikum einer TMZ-Resistenz. Die bestrahlten GSC zeigten (im Vergleich zur Kontrollgruppe) eine relativ geringere Verlängerung der Verdopplungszeit nach TMZ-Behandlung als die unbestrahlten GSC. Dies könnte durch den kooperativen proliferationsfördernden Effekt beider Therapien begründet sein (s. 6.5), sodass die Verlängerung des Zellzyklus ein geringes Ausmaß annimmt. Ebenso ist die bestrahlungsvermittelte Abschwächung der zytotoxischen Wirkung des TMZ als Grund hierfür möglich (s. 6.2).

Da die „naive“ Zelllinie #1051 und ihr bestrahltes Korrelat #1051\_IR nicht in diesem Experiment inkludiert waren, kann nicht der direkte Vergleich zwischen ihnen und die Quantifizierung der bestrahlungsinduzierten Wirkung erfolgen. Jedoch können die bestrahlten und unbestrahlten Linien retrospektiv nach erfolgter TMZ- bzw. DMSO-Behandlung miteinander verglichen werden und damit auf die Wirkung der Bestrahlung geschlossen werden. Die bestrahlten Linien zeigten hierbei (unabhängig von der weiteren Behandlung) eine signifikant kürzere Verdopplungszeit auf, die auf eine Beschleunigung der Zellzyklusprogression als Effekt der mehrfachen fraktionierten Bestrahlung schließen lässt.

Der Einfluss ionisierender Strahlung auf den Zellzyklus von Glioblastomzellen wurde mehrfach untersucht, hier jedoch fast ausschließlich der Effekt einer einmaligen Bestrahlung

beschrieben. Er lässt sich wie folgt zusammenfassen: Erstens: Sowohl GSC wie differenzierte GB-Zellen zeigen einen bestrahlungsinduzierten Zellzyklus-Arrest in der G2/M-Phase auf ([512-514]), der typischerweise in bestrahlten Zellen aufgrund der Induktion von DNA-DSB auftritt [515]. Zweitens ist dieser G2/M-Arrest in GSC weniger häufig auftretend als in differenzierten GB-Zellen und hält bis mindestens 72 h nach Bestrahlung an [516, 517]. Drittens scheint der G2/M-Arrest Teil der Radioresistenz von GB zu sein, da hierauf die Reparatur von DNA-DSB durch die homologe Rekombination beruht und effizienter stattfindet [518]. Eine Blockade dieses G2/M-Arrestes führte zu einer erhöhten Radiosensitivität in differenzierten GB-Zellen und erhöhter Radiozytotoxizität [518]. Zuletzt ging eine zunehmende Radioresistenz mit einem abgeschwächten Zellzyklusarrest einher [519].

In Relation dieser Erkenntnisse zu den vorliegenden Ergebnissen lässt sich eine Wechselwirkung zwischen der fraktionierten Bestrahlung und der Zellzyklusprogression (der #1051-GSC-Linie) vermuten, die positiv korrelieren. Eine spezifische Aussage zur Beeinflussung der Zellzyklusphasen ist an dieser Stelle bei fehlender Untersuchung dieser nicht möglich. Es lässt sich zum einen vermuten, dass kein wesentlicher G2/M-Arrest ausgelöst wurde (da dieser mit einer verlängerten Zellzyklusdauer einhergehen würde), bedingt durch eine mutmaßliche Radioresistenz der #1051-Linie. Zum anderen ist es möglich, dass der beschriebene G2/M-Arrest vielmehr Folge einer einmaligen Bestrahlung ist (wie fast ausschließlich in der Literatur zu finden), während eine mehrfache fraktionierte Bestrahlung (wie hier vorliegend) mit einer veränderten Umstrukturierung des Zellzyklus von GSC einhergehen kann. Denkbar ist ein initialer G2/M-Arrest zur Mobilisierung der DNA-Reparaturmaschinerie, die infolge hochreguliert wird, wie anhand der hier gezeigten Chromatinöffnung in Promotorregionen von Genen, die mit dem Nukleinsäurestoffwechsel verbunden sind (s. Abbildung 32), vermutet werden kann. Diese Hochregulierung der DNA-Reparatur könnte im Verlauf der mehrfachen Bestrahlung zu einem Verzicht auf den G2/M-Arrest führen und damit eine Zellzyklusverlängerung verhindern. Weiterhin geht die Verkürzung der Verdopplungszeit konform mit der bestrahlungsinduzierten Erhöhung der Ki67-Expression (s. Abbildung 25) als übereinstimmendes Korrelat für eine bestrahlungsinduzierte Verstärkung der proliferativen Aktivität und Zellzyklusprogression.

### **6.7 Globale Chromatinkondensation und locusspezifische Chromatinöffnung unter TMZ**

Die vorangehenden Untersuchungen zeigen einen kooperativen Effekt von Bestrahlung und TMZ auf die Proliferationsfähigkeit von (behandlungsresistenten) GSC auf. Um mögliche Veränderungen von Signalwegregulationen über epigenetische Alterationen und Chromatinstrukturveränderungen durch beide Behandlungen zu untersuchen, wurden die selektierten Zelllinien durch die FAIRE-Methode charakterisiert und transkriptionell aktive Regionen im Chromatin identifiziert. Hiermit erfolgte erstmal eine Optimierung der FAIRE-Methode für humane GSC-Linien. Die Vor- und Nachteile der Methode wurden bereits in 2.5.7.2 diskutiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Bestrahlung wie TMZ genomweite Veränderungen der Chromatinstruktur bewirken. Hier lässt sich zum einen konstatieren, dass diese Veränderungen anhaltend sind, da sie noch lange Zeit nach Abschluss der Behandlungen festgestellt werden können. Zum anderen lässt sich ein divergierender epigenetischer Effekt beobachten, da Bestrahlung und TMZ die Chromatinstruktur in unbestrahlten GSC unterschiedlich beeinflussten. Dies wird durch die gegensätzlichen Auswirkungen dieser Behandlungen auf den Anteil des offenen Chromatins, insbesondere in den regulatorischen Promotorregionen, belegt. Die Bestrahlung führte zu einem starken Anstieg der offenen Promotorregionen, was eine verstärkte Transkription von Genen bedeutet, die von diesen Promotoren aus reguliert werden. Im Gegensatz dazu führte TMZ zu einer allgemeinen Verringerung des offenen Chromatins in den Promotorregionen, was mit einer allgemeinen Verringerung der Transkriptionsaktivität vereinbar ist. Während die epigenetischen Effekte von

TMZ auf die Chromatinstruktur in GSC experimentell bisher kaum untersucht wurden, deckt sich die obere Schlussfolgerung mit den Ergebnissen von Belter et al. (2020). Sie zeigten eine hypermethylierende Wirkung des TMZ auf GB-Zelllinien, da der 5mC-Gehalt der DNA dosisabhängig (bei TMZ-Konzentrationen von 10-50  $\mu\text{M}$ ) und mit wiederholter TMZ-Behandlung zunahm [520]. Diese TMZ-vermittelte Hypermethylierung steht im Einklang mit einer allgemeinen Chromatinverdichtung, wie sie hier beobachtet wurde. Hinsichtlich der Chromatinuntersuchungen von rekurrenten GB wiesen diese nach Radiochemotherapie eine allgemeine Verringerung des offenen Chromatins auf im Vergleich zu primären GB [385]. Prinzipiell vereinbar mit der hier gezeigten TMZ-Wirkung ist ein Vergleich dennoch nicht möglich, da zum einen hier spezifisch GSC untersucht wurden und zum anderen das klinische Regime der Therapiekombination aus TMZ und Bestrahlung von dem in dieser Arbeit abweicht (bei konkomitierender TMZ-Gabe zur Bestrahlung anstatt einer sequentiellen TMZ-Gabe nach Bestrahlung). Dies hat wahrscheinlich Einfluss auf die Interaktion zwischen TMZ und Strahlentherapie und deren epigenetischen Effekt, der in Bezug auf TMZ in dieser Arbeit (bei der Linie #1051\_IR\_TMZ) mutmaßlich eingeschränkt wurde.

Bei genauerer Untersuchung der Genloci mit veränderter Chromatinstruktur lässt sich feststellen, dass sowohl Bestrahlung wie auch TMZ zu einer Veränderung des Spektrums offener Promotoren in bestimmten Regionen führen. Das Spektrum der durch Bestrahlung verursachten Chromatinveränderungen unterscheidet sich von denen, die durch TMZ verursacht werden, sowie zwischen nicht- und vorbestrahlten GSC. In nicht-bestrahlten GSC führte die TMZ-Behandlung zu einer Anreicherung offener Promotoren in der Nähe von Genen, die an der Neurogenese und neuralen Differenzierung beteiligt sind, und ist damit mit ihrer Hochregulierung vereinbar (Abbildung 32, B). Dies erscheint konträr zur allgemeinen hemmenden Wirkung von TMZ auf die Neurogenese (in gesundem Hirnparenchym) zu sein [499-502]. Eine mögliche Erklärung ist, dass die hier beschriebene divergierende TMZ-Wirkung spezifisch im Kontext der gestörten Tumorphysiologie von GB und von GSC zu sehen ist. Möglich ist auch, dass eine mehrfache TMZ-Behandlung mit zunehmender TMZ-Resistenz in GSC mit einer entgegengesetzten reaktiven Hochregulierung dieser Gene einhergeht.

Abweichend von der TMZ-Wirkung ist die Bestrahlungsbehandlung mit einer Chromatinöffnung innerhalb von Promotoren von Genen verbunden, die mit dem Nukleinsäurestoffwechsel assoziiert sind (Abbildung 32, A). Die erwähnten TMZ-assoziierten Veränderungen wurden in vorbestrahlten GSC nicht mehr festgestellt, bei denen die Wirkungen von TMZ denen von DMSO allein ähnlich waren (Abbildung 32, C). Obwohl unklar ist, warum vorbestrahlte GSC nach TMZ-Behandlung nicht ähnliche Veränderungen in der Chromatinstruktur zeigen wie nicht-bestrahlte GSC, ist eine logische Erklärung, dass die Strahlenbehandlung (vor der TMZ-Behandlung) GSC allgemein weniger anfällig für Störungen in der Chromatinstruktur macht. Eine weitere Erklärung ist, wie in 6.2 angeführt, dass die Bestrahlung GSC unempfindlicher gegenüber der TMZ-Wirkung (auf epigenetischer Ebene) macht durch ihren Effekt des Zellzyklus-Arrests und der Herabregulierung der MMR-Gene, sodass daher TMZ-assoziierte Chromatinveränderungen nicht induziert werden können. Alternativ ist es möglich, dass die Bestrahlung eine Selektion von bestimmten Klonen bewirkt, die resistenter gegen die durch TMZ verursachten Chromatinstörungen sind. Aus klinischer Sicht könnte die geringere Anfälligkeit bestrahlter GSC für TMZ bedeuten, dass strahleninduzierte Veränderungen des Chromatins der Wirksamkeit von TMZ in Bezug auf Chromatinveränderungen entgegenwirken, was einer der Gründe für die unbefriedigende Wirksamkeit von TMZ als Therapie für rezidivierende GB sein könnte.

### 6.8 Breites Wirkungsspektrum von Dimethylsulfoxid

Diese Studie zeigt, wie wichtig es ist, die Auswirkungen von DMSO, einem Lösungsvermittler für TMZ, zu berücksichtigen. In Übereinstimmung mit den zuvor gezeigten Wirkungen von DMSO in verschiedenen Zelltypen wurde auch in dieser Studie ein tiefgreifender Einfluss von

DMSO festgestellt. So verringerte DMSO die Stammzellfrequenz insbesondere in vorbestrahlten GSC als Hinweis für eine potenzierte Zytotoxizität bei vorangehender Bestrahlungsbehandlung (Abbildung 23). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass ionisierende Strahlung zum einen über ROS zur Schädigung von Zellmembranen führt und zum anderen Permeabilitätsänderungen von Zellmembranen bewirkt [521-523]. Da DMSO hauptsächlich seine Zytotoxizität durch die Beeinträchtigung der Zellmembranfunktion vermittelt ([459]), könnte die membranverändernde Wirkung der vorherigen Bestrahlung der GSC der Grund für die potenzierte Wirkung von DMSO sein. Dieser Umstand kann ebenso als Erklärung für die selektive proliferationshemmende Wirkung des DMSO dienen, da DMSO insbesondere in vorbestrahlten GSC eine erhebliche Reduktion der Proliferationsrate verursachte, während sie in nicht-bestrahlten GSC nur geringfügig reduziert war (Abbildung 25). Dieser proliferationshemmende Effekt von DMSO steht im Einklang mit der vorbeschriebenen, proliferations- wie viabilitätshemmenden zytotoxischen Wirkung von DMSO, teilweise apoptosefördernde Signalwege umfassend, die in verschiedenen, physiologischen wie tumorösen Zelltypen nachgewiesen werden konnte [524-528].

Dagegen zeigte DMSO eine Erhöhung der Differenzierungskapazität der behandelten GSC unabhängig von ihrem Bestrahlungsstatus auf (Abbildung 24). Diese differenzierungsinduzierende Wirkung des DMSO korrespondiert mit der vielfach charakterisierten differenzierungsfördernden des DMSO in verschiedenen Zelltypen und auch in Astrozyten (über Verstärkung der GFAP-Expression) [528-530]. Dabei ist die Erhöhung des Differenzierungspotenzials in humanen embryonalen Stammzellen mit einer Herabregulierung von Stammzell- und Pluripotenzmarkern verbunden, korrespondierend zur reduzierten Stammzellfrequenz aus Abbildung 23 [529, 531, 532]. Dies kann eine Ursache für eine reduzierte Tumorigenität von GB-Zelllinien nach DMSO-Behandlung darstellen [533].

Auch auf epigenetischer Ebene war ein Effekt der DMSO-Behandlung nachzuweisen (Abbildung 32, B). Hier zeigte sich das größte Maß an offenem Chromatin unter den mit DMSO behandelten Linien jedoch mit einem verringerten Anteil an Promotor-assoziierten Peaks verbunden, sodass die meisten DMSO-assoziierten Peaks außerhalb von transkriptionell regulatorischen Elementen liegen. Dies zeigt auf, dass DMSO auf epigenetischer Ebene nicht inert ist, sondern mit tiefgreifender Veränderung einhergeht [449]. Dabei scheint ein starker gewebsspezifischer Faktor eine wichtige Rolle in der Ausprägung der epigenetischen Veränderung zu spielen. Während in osteoblastischen Zelllinien eine globale DNA-Demethylierung u. a. über eine Herabregulierung von DNMT-Enzymen als Folge der DMSO-Behandlung von Thaler et al. (2012) beschrieben wurde, wurde von Verheijen et al. (2019) in iPSC-abgeleiteten Herzzellen der gegenteilige Effekt mit einer genomischen Hypermethylierung über Hochregulierung der DNMT-Enzymaktivität beschrieben [534, 535]. Dagegen blieb in derselben Arbeit das Methylom in Leberzellen unverändert durch die DMSO-Behandlung [535]. Während also die erstgenannte Arbeit mit einer globalen Chromatinöffnung zu vereinbar ist und mit den Ergebnissen dieser Arbeit korrespondiert, geht aus der zweitgenannten Arbeit sowohl eine Chromatinverdichtung als auch ein unverändertes Methylom als Folge der DMSO-Behandlung einher. Dies zeigt zum einen das Spektrum von DMSO-induzierten epigenetischen Veränderungen auf und zum anderen den gewebsspezifischen Charakter dieser.

Insgesamt wird damit die Wichtigkeit der Betrachtung der spezifischen Auswirkungen wie Zytotoxizität des DMSO untermauert. Dies dient in experimentellen Studien häufig als Dissoziationsmedium für Chemotherapeutika wie TMZ, ist jedoch nicht inert, sondern weist ein breites Wirkungsspektrum auf phänotypischer, genetischer wie epigenetischer Ebene auf.

## 6.9 Schlussfolgerungen

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Selbsterneuerungs-, Differenzierungs- und Proliferationsanalysen, dass TMZ wie Bestrahlung zumindest auf die in der Studie verwendete GSC-Linie wachstums- und selbsterneuerungsfördernde Effekte hat, die nach TMZ-

Behandlung mit einer verlängerten und nach Bestrahlung mit einer verkürzten Zellzyklusdauer einhergehen. Auf epigenetischer Ebene führte TMZ zu einer allgemeinen Chromatinverdichtung mit locuspezifischer Chromatinöffnung in Genregionen, die an der Neurogenese und neuralen Differenzierung beteiligt sind, während Bestrahlung eine promotor-spezifische Chromatinöffnung bewirkt, insbesondere in Genregionen, die am Nucleinsäurestoffwechsel beteiligt sind. Ferner bestehen Hinweise für ein strahlungsvermitteltes Konterkarieren der TMZ-Wirkung bei partieller Beschränkung der beschriebenen Effekte in vorbestrahlten GSC.

Diese charakterisierten TMZ- und Bestrahlungsvermittelten Veränderungen können einen linienspezifischen Effekt darstellen und aufgrund der ausgeprägten intertumoralen Heterogenität von Glioblastomen allgemein und GSC speziell sich in anderen GSC-Linien in einer anderen Ausprägung und zu einem anderen Ausmaß darstellen, insbesondere da uneinheitliche Veränderungen in GSC auf Behandlungsmodalitäten festgestellt werden konnten [1]. Es besteht daher die Notwendigkeit, systematische Untersuchungen unter Verwendung unterschiedlicher Arten von GSC aus verschiedenen Tumoren wie Tumornischen zu etablieren, um das Wirkungsspektrum von TMZ wie Resistenz-assoziierten Veränderungen auf breiterer Ebene abbilden zu können. Ebenso ist eine Korrelation der hier und zukünftig erhobenen Ergebnisse mit der *in vivo*-Charakterisierung von GSC mit und ohne Behandlung vonnöten, um ein pathophysiologisch näheres Abbild des Tumornetzwerkes und -microenvironments zu erreichen.

### 7 Zusammenfassung

Glioblastom-Stammzellen (GSC) stehen im Zentrum der heterogenen Tumorarchitektur von Glioblastomen und sind von zentraler Bedeutung für die Tumorpathophysiologie durch ihre unlimitierte Selbsterneuerungsfähigkeit und multipotente Kapazität. Durch ihr breites Repertoire an inhärenten wie erworbenen Resistenzmechanismen wird die Therapieresistenz von Glioblastomen gegenüber dem etablierten Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) und der Strahlentherapie wie ihre Rezidivbildung und ihr Progress in erster Linie durch GSC bestimmt. Das Ziel dieser Studie war die Rekapitulation der therapieinduzierten Veränderungen in GSC für die TMZ- und Strahlentherapie wie ihrer Kombination auf zellulärer, phänotypischer und epigenetischer Ebene. Hierdurch wird eine Identifizierung von Schlüsselprozessen ermöglicht, die an der Resistenz von Glioblastomen gegenüber der Radiochemotherapie beteiligt sind.

Hierzu wurde ein experimentelles Modell für TMZ-resistente GSC etabliert, indem die GSC-Linie #1051 und ihr vorbestrahltes Äquivalent #1051\_IR mit einer klinisch relevanten Dosis von 100 µM an TMZ in sechs Zyklen behandelt wurden und für eine Gesamtzeit von ca. 16 Wochen in Anwesenheit von TMZ gehalten wurden. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der TMZ- und bestrahlungsinduzierten Veränderungen auf Ebene der Stammzellkapazität über das Extreme Limited Dilution Assay, während das Differenzierungs- und Proliferationspotenzial über die Immunfluoreszenz-gestützte Auswertung der GFAP- bzw. Ki67-Expression quantifiziert wurde. Ergänzend wurde die Verdopplungszeit der Zellen über Live-Mikroskopie bestimmt. Zur Untersuchung der epigenetischen und Chromatin-Veränderungen wurde die FAIRE-Methode in dieser Studie erstmalig für humane GSC etabliert. Als Referenzkontrolle wurden parallel dazu DMSO-behandelte Sublinien verwendet, da DMSO als Dissoziationsmedium für TMZ diene.

Während der Behandlungszyklen mit TMZ zeichnete sich ein biphasischer Erholungstrend ab mit initial betonter Zytotoxizität und zunehmender Resistenz der GSC gegenüber TMZ. Vorbestrahlte GSC zeigten eine geringere Suszeptibilität gegenüber der TMZ-Zytotoxizität, die sich mit experimentellen Daten einer sequentiell beschränkten Wirkung der TMZ-Zytotoxizität deckt, die sich nur vor (und nicht nach) einer Bestrahlung entfaltet [474, 475]. Als Folge der mehrschrittigen Behandlung der GSC zeigte sich eine TMZ- wie Bestrahlungs-vermittelte Erhöhung der Stammzellfrequenz als Maß für eine verstärkte Selbsterneuerungskapazität, welche die vorhandene Evidenz über den Einfluss der Behandlungsmodalitäten auf die Stammzellkapazität rekapituliert [1, 34, 473, 484, 485, 489]. Dabei scheint dieser bekannte Behandlungseffekt nach aktuellem Wissensstand vorrangig durch eine Expansion der (therapieresistenten) GSC-Subpopulation und einer de novo-Bildung von (undifferenzierten) GSC durch die Induktion einer Konversion von differenzierten GB-Zellen begründet zu sein [484-486, 488].

Parallel zu diesem Therapieeffekt zeigte sich eine proliferationssteigernde Wirkung der TMZ- und Strahlenbehandlung. Ersteres bewirkte dabei eine drei- bis vierfache Erhöhung und Letzteres eine dreifache des Ki67-Index. Der Effekt beider Behandlungen wirkt damit initial depletierend für proliferierende Zellen und im Verlauf konträr hierzu verstärkend für die proliferative Aktivität, eine duale Wirkung, die in anderen Arbeiten nachvollzogen werden kann [1, 430, 477, 486, 507-510]. Erwähnenswert ist die deutliche Betonung der TMZ-vermittelten Proliferationssteigerung in vorbestrahlten GSC (im Vergleich zu unbestrahlten), die eine kooperative Proliferationssteigerung beider Therapiemodalitäten vermuten lässt. Interessanterweise konnten auch in GSC aus GB-Rezidiven nach Radiochemotherapie eine erhöhte Stammzell- und Proliferationskapazität festgestellt werden, als Hinweis für einen therapieinduzierten Wechsel von einem ruhenden zu einem proliferativen GSC-Phänotyp, der in dieser Arbeit in vitro rekapituliert werden konnte [500]. Auch hinsichtlich des Differenzierungsgrades ließ sich eine zur erhöhten Stammzellkapazität korrelierende Veränderung feststellen. Sowohl die TMZ- wie Strahlenbehandlung hatte eine verringerte GFAP-Expression und damit eine Reduktion des Differenzierungspotenzials zur Folge. Dies liefert neue Evidenz für den direkten inhibtiven Effekt beider Behandlungsmodalitäten auf das

Differenzierungspotenzial von GSC und steht im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen gegenläufigen Wechselwirkung zwischen der TMZ- und Radioresistenz und dem Differenzierungsgrad von GSC. Ihr nach nimmt die Therapieresistenz von GSC mit zunehmendem Differenzierungsgrad ab und bedeutet im Umkehrschluss einen abnehmenden Differenzierungsgrad bei zunehmender TMZ- und Strahlenresistenz [492-496, 504, 505]. Hinsichtlich der Proliferationsgeschwindigkeit zeigten die TMZ- und Strahlenbehandlung einen gegensätzlichen Effekt. Während die TMZ-selektierten GSC eine Verlängerung der Verdopplungszeit um ca. 6 bis 12 % zeigten, wiesen die vorbestrahlten GSC unabhängig von ihrer weiteren Behandlung eine verkürzte Verdopplungszeit (im Vergleich zu unbestrahlten GSC) auf. In Zusammenhang mit der vorhandenen Literatur lässt sich als Ursache der TMZ-vermittelten Verlängerung ein G2/M-Zellzyklusarrest vermuten, der bei TMZ-Resistenz eine rekonstruktive Rolle für Glioblastomzellen einnehmen kann [476]. Jedoch scheint die Beeinflussung des Zellzyklusarrests (und damit -dauer) durch TMZ einer heterogenen Antwort zu unterliegen und damit vielmehr einen linienspezifischen Effekt als einen universalen Teil der TMZ-Resistenz darzustellen [248].

Zuletzt erfolgte in dieser Arbeit erstmalig eine Optimierung und Etablierung der FAIRE-Methode für humane GSC-Linien zur Charakterisierung therapieinduzierter Chromatinveränderungen hinsichtlich transkriptionell aktiver Regionen. Hier zeigten sich divergierende Effekte der Behandlungsmodalitäten in regulatorischen Promotorregionen, wobei TMZ zu einer allgemeinen Kondensation und damit Gen-Silencing und Bestrahlung entgegengesetzt zu einer Chromatinöffnung ebendort und damit vermehrter Genexpression führte. Im spezifischen Kontext der Genregionen bewirkte TMZ eine Chromatinöffnung und damit Anreicherung von Promotoren, deren Gene mit der neuralen Differenzierung und Neurogenese verbunden sind, während die Bestrahlung hiervon abweichend zu einer Chromatinöffnung von Promotoren führte, deren Gene an dem Nukleinsäurestoffwechsel beteiligt sind. Dies bietet neue Einblicke in die TMZ- und bestrahlungsvermittelten epigenetischen Veränderungen in GSC als Abbild der epigenetischen Dysregulation in rekurrenten GB, die eine Schlüsselrolle in der Progression von Glioblastomen einnehmen und bisher kaum systematisch untersucht wurden. Interessanterweise konnten die TMZ-assoziierten epigenetischen Veränderungen in vorbestrahlten GSC nicht mehr festgestellt werden. Dies ist als einer von mehreren Hinweisen in dieser Arbeit eine neue deskriptive Evidenz für ein entweder allgemeines Konterkarieren von zytotoxischen Wirkungen oder spezifisches Konterkarieren der TMZ-Wirkung (auf GSC) durch eine vorherige Bestrahlung, eine Wechselwirkung, die bisher kaum erforscht ist [474, 475].

Die vorliegende Arbeit etabliert ein experimentelles Modell, das die Möglichkeit bietet, das Wirkungsspektrum und die Resistenzmechanismen von Behandlungsmodalitäten in zukünftigen Arbeiten systematisch in unterschiedlichen GSC zu charakterisieren sowie durch eine in vivo-Etablierung des Modells die gewonnenen Erkenntnisse mit der Tumorigenität der GSC zu korrelieren und den externen Einfluss des Tumormicroenvironments hierauf zu untersuchen.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Kalasauskas D, Sorokin M, Sprang B, Elmasri A, Viehweg S, Salinas G, et al. Diversity of Clinically Relevant Outcomes Resulting from Hypofractionated Radiation in Human Glioma Stem Cells Mirrors Distinct Patterns of Transcriptomic Changes. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3).
- [2] Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta neuropathologica*. 2015;129(6):829-48.
- [3] Alves ALV, Gomes INF, Carloni AC, Rosa MN, da Silva LS, Evangelista AF, et al. Role of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance: a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):206-.
- [4] Wen PY, Weller M, Lee EQ, Alexander BM, Barnholtz-Sloan JS, Barthel FP, et al. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-Oncology*. 2020;22(8):1073-113.
- [5] Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current molecular pharmacology*. 2012;5(1):102-14.
- [6] Kim H, Zheng S, Amini SS, Virk SM, Mikkelsen T, Brat DJ, et al. Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome Res*. 2015;25(3):316-27.
- [7] Zimmer N, Kim E, Sprang B, Leukel P, Khafaji F, Ringel F, et al. GARP as an Immune Regulatory Molecule in the Tumor Microenvironment of Glioblastoma Multiforme. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(15):3676.
- [8] Villano JL, Seery TE, Bressler LR. Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2009;64(4):647-55.
- [9] Simon JM, Giresi PG, Davis IJ, Lieb JD. Using formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) to isolate active regulatory DNA. *Nat Protoc*. 2012;7(2):256-67.
- [10] Berg JM, Tymoczko JL, Gatto jr. GJ, Stryer L. Kontrolle der Genexpression bei Eukaryoten. *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 1115-37.
- [11] Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Hu Y, GK. S. ELDA: Extreme Limiting Dilution Analysis [Internet] Letzte Aktualisierung: 24.10.2014. Zitiert am: 14.04.2021. URL: <http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/2014>.
- [12] Davis PK, Brachmann RK. Chromatin Remodeling and Cancer. *Cancer biology & therapy*. 2003;2(1):23-30.
- [13] Koch S. Multiple Immunochemical Staining Techniques. *Immunohistochemistry and Immunocytochemistry 2017*. p. 103-22.
- [14] Weber K-J, Wenz F. Strahlenbiologische Grundlagen. In: Wannemacher M, Wenz F, Debus J, editors. *Strahlentherapie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 47-85.
- [15] Kim J, Lee I-H, Cho Hee J, Park C-K, Jung Y-S, Kim Y, et al. Spatiotemporal Evolution of the Primary Glioblastoma Genome. *Cancer cell*. 2015;28(3):318-28.
- [16] Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*. 2011;21(3):381-95.
- [17] Institute NHGR. NUCLEOSOME [Internet] Letzte Aktualisierung 01.02.2023. Zitiert am 03.02.2023. URL: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Nucleosome2023>.
- [18] Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol*. 2019;21(Suppl 5):v1-v100.
- [19] Oronsky B, Reid TR, Oronsky A, Sandhu N, Knox SJ. A Review of Newly Diagnosed Glioblastoma. *Frontiers in oncology*. 2020;10:574012.
- [20] Nabors LB, Portnow J, Ahluwalia M, Baehring J, Brem H, Brem S, et al. Central Nervous System Cancers, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. 2020;18(11):1537.
- [21] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005;352(10):987-96.

- [22] Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, et al. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2014;23(10):1985-96.
- [23] Muscat AM, Wong NC, Drummond KJ, Algar EM, Khasraw M, Verhaak R, et al. The evolutionary pattern of mutations in glioblastoma reveals therapy-mediated selection. *Oncotarget*. 2018;9(8):7844-58.
- [24] Johnson BE, Mazar T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, et al. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science (New York, NY)*. 2014;343(6167):189-93.
- [25] Rheinbay E, Suvà Mario L, Gillespie Shawn M, Wakimoto H, Patel Anoop P, Shahid M, et al. An Aberrant Transcription Factor Network Essential for Wnt Signaling and Stem Cell Maintenance in Glioblastoma. *Cell Reports*. 2013;3(5):1567-79.
- [26] Shahcheraghi SH, Tchokonte-Nana V, Lotfi M, Lotfi M, Ghorbani A, Sadeghnia HR. Wnt/beta-catenin and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways in Glioblastoma: Two Main Targets for Drug Design: A Review. *Current pharmaceutical design*. 2020;26(15):1729-41.
- [27] Ali MY, Oliva CR, Noman ASM, Allen BG, Goswami PC, Zakharia Y, et al. Radioresistance in Glioblastoma and the Development of Radiosensitizers. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9).
- [28] Golding SE, Morgan RN, Adams BR, Hawkins AJ, Povirk LF, Valerie K. Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells. *Cancer biology & therapy*. 2009;8(8):730-8.
- [29] Ou A, Yung WKA, Majd N. Molecular Mechanisms of Treatment Resistance in Glioblastoma. *International journal of molecular sciences*. 2020;22(1).
- [30] Noch EK, Ramakrishna R, Magge R. Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance. *World neurosurgery*. 2018;116:505-17.
- [31] Piccirillo Sara GM, Colman S, Potter Nicola E, van Delft Frederik W, Lillis S, Carnicer M-J, et al. Genetic and Functional Diversity of Propagating Cells in Glioblastoma. *Stem Cell Reports*. 2015;4(1):7-15.
- [32] Rennert RC, Achrol AS, Januszyk M, Kahn SA, Liu TT, Liu Y, et al. Multiple Subsets of Brain Tumor Initiating Cells Coexist in Glioblastoma. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2016;34(6):1702-7.
- [33] Polyak K, Hahn W. Polyak K, Hahn WC.. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* 11: 296-300. *Nature medicine*. 2006;12:296-300.
- [34] Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-60.
- [35] Ahmed AU, Auffinger B, Lesniak MS. Understanding glioma stem cells: rationale, clinical relevance and therapeutic strategies. *Expert Rev Neurother*. 2013;13(5):545-55.
- [36] Prager BC, Bhargava S, Mahadev V, Hubert CG, Rich JN. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. *Trends in cancer*. 2020;6(3):223-35.
- [37] Biserova K, Jakovlevs A, Uljanovs R, Strumfa I. Cancer Stem Cells: Significance in Origin, Pathogenesis and Treatment of Glioblastoma. *Cells*. 2021;10(3).
- [38] Beier D, Schulz JB, Beier CP. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected. *Mol Cancer*. 2011;10:128.
- [39] Malta TM, Sabedot TS, Datta I, Garofano L, Vallentgoed W, Varn FS, et al. The epigenetic evolution of gliomas is determined by their IDH1 mutation status and treatment regimen. *bioRxiv*. 2021.
- [40] Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol*. 2013;15 Suppl 2(Suppl 2):ii1-56.
- [41] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*. 2007;114(2):97-109.
- [42] Leece R, Xu J, Ostrom QT, Chen Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. Global incidence of malignant brain and other central nervous system tumors by histology, 2003-2007. *Neuro Oncol*. 2017;19(11):1553-64.

- [43] Burnet NG, Jefferies SJ, Benson RJ, Hunt DP, Treasure FP. Years of life lost (YLL) from cancer is an important measure of population burden--and should be considered when allocating research funds. *British journal of cancer*. 2005;92(2):241-5.
- [44] Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64(1):9-29.
- [45] Yabroff KR, Harlan L, Zeruto C, Abrams J, Mann B. Patterns of care and survival for patients with glioblastoma multiforme diagnosed during 2006. *Neuro Oncol*. 2012;14(3):351-9.
- [46] Ostrom QT, Adel Fahmideh M, Cote DJ, Muskens IS, Schraw JM, Scheurer ME, et al. Risk factors for childhood and adult primary brain tumors. *Neuro Oncol*. 2019;21(11):1357-75.
- [47] Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol*. 2002;4(4):278-99.
- [48] Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurologic clinics*. 2007;25(4):867-90, vii.
- [49] Hochberg F, Toniolo P, Cole P, Salcman M. Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults. *Journal of neuro-oncology*. 1990;8(1):55-60.
- [50] Lee M, Wrensch M, Miike R. Dietary and tobacco risk factors for adult onset glioma in the San Francisco Bay Area (California, USA). *Cancer causes & control : CCC*. 1997;8(1):13-24.
- [51] Frei P, Poulsen AH, Johansen C, Olsen JH, Steding-Jessen M, Schüz J. Use of mobile phones and risk of brain tumours: update of Danish cohort study. *BMJ (Clinical research ed)*. 2011;343:d6387.
- [52] Lagorio S, Rööslü M. Mobile phone use and risk of intracranial tumors: a consistency analysis. *Bioelectromagnetics*. 2014;35(2):79-90.
- [53] Swerdlow AJ, Feychting M, Green AC, Leeka Kheifets LK, Savitz DA, International Commission for Non-Ionizing Radiation Protection Standing Committee on E. Mobile phones, brain tumors, and the interphone study: where are we now? *Environ Health Perspect*. 2011;119(11):1534-8.
- [54] Akhtar S, Vranic S, Cyprian FS, Al Moustafa A-E. Epstein-Barr Virus in Gliomas: Cause, Association, or Artifact? *Frontiers in oncology*. 2018;8(123).
- [55] Ranger AM, Patel YK, Chaudhary N, Anantha RV. Familial syndromes associated with intracranial tumours: a review. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2014;30(1):47-64.
- [56] Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science*. 2009;100(12):2235-41.
- [57] Scheurer ME, Etzel CJ, Liu M, Barnholtz-Sloan J, Wiklund F, Tavelin B, et al. Familial aggregation of glioma: a pooled analysis. *American journal of epidemiology*. 2010;172(10):1099-107.
- [58] Blumenthal DT, Cannon-Albright LA. Familiality in brain tumors. *Neurology*. 2008;71(13):1015-20.
- [59] Jonsson P, Lin AL, Young RJ, DiStefano NM, Hyman DM, Li BT, et al. Genomic Correlates of Disease Progression and Treatment Response in Prospectively Characterized Gliomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2019;25(18):5537-47.
- [60] Andersson U, Schwartzbaum J, Wiklund F, Sjöström S, Liu Y, Tsavachidis S, et al. A comprehensive study of the association between the EGFR and ERBB2 genes and glioma risk. *Acta Oncologica*. 2010;49(6):767-75.
- [61] Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, Dobbins SE, Sanson M, Malmer B, et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nature genetics*. 2009;41(8):899-904.
- [62] Kinnersley B, Labussière M, Holroyd A, Di Stefano AL, Broderick P, Vijayakrishnan J, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for glioma. *Nature communications*. 2015;6:8559.
- [63] Rajaraman P, Melin BS, Wang Z, McKean-Cowdin R, Michaud DS, Wang SS, et al. Genome-wide association study of glioma and meta-analysis. *Human Genetics*. 2012;131(12):1877-88.

- [64] Melin BS, Barnholtz-Sloan JS, Wrensch MR, Johansen C, Il'yasova D, Kinnersley B, et al. Genome-wide association study of glioma subtypes identifies specific differences in genetic susceptibility to glioblastoma and non-glioblastoma tumors. *Nature genetics*. 2017;49(5):789-94.
- [65] Wrensch M, Jenkins RB, Chang JS, Yeh RF, Xiao Y, Decker PA, et al. Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nature genetics*. 2009;41(8):905-8.
- [66] Labreche K, Kinnersley B, Berzero G, Di Stefano AL, Rahimian A, Detrait I, et al. Diffuse gliomas classified by 1p/19q co-deletion, TERT promoter and IDH mutation status are associated with specific genetic risk loci. *Acta neuropathologica*. 2018;135(5):743-55.
- [67] Wu WY, Johansson G, Wibom C, Brännström T, Malmström A, Henriksson R, et al. The Genetic Architecture of Gliomagenesis-Genetic Risk Variants Linked to Specific Molecular Subtypes. *Cancers (Basel)*. 2019;11(12).
- [68] Jiang Y, Uhrbom L. On the origin of glioma. *Ups J Med Sci*. 2012;117(2):113-21.
- [69] DeAngelis LM, Mellinghoff IK. Virchow 2011 or how to ID(H) human glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(34):4473-4.
- [70] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica*. 2016;131(6):803-20.
- [71] Brat DJ, Van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2004;84(4):397-405.
- [72] Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, 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):98-110.
- [73] Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, et al. International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2014;24(5):429-35.
- [74] Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine*. 2009;360(8):765-73.
- [75] Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Bäcklund LM, Chan R, Jones DT, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol*. 2009;11(4):341-7.
- [76] Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(19):6002-7.
- [77] Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer research*. 2004;64(19):6892-9.
- [78] Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(4):764-72.
- [79] Grant R. Overview: brain tumour diagnosis and management/Royal College of Physicians guidelines. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2004;75(suppl 2):ii18-ii23.
- [80] CRA C. Neurological diseases. In: Parveen J Kumar MLC, editor. *Kumar & Clark clinical medicine 6th edition ed*. Edinburgh: Elsevier W.B. Saunders; 2005. p. p. 1244–45.
- [81] Stefan Oberndorfer EL-P, Heinz Lahrman, Walter Struhal, Peter Hitzenberger, Wolfgang Grisold. The End-of-Life Hospital Setting in Patients with Glioblastoma. *Journal of Palliative Medicine*. 2008;11(1):26-30.
- [82] Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *The Lancet Oncology*. 2017;18(6):e315-e29.
- [83] Yuile P, Dent O, Cook R, Biggs M, Little N. Survival of glioblastoma patients related to presenting symptoms, brain site and treatment variables. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2006;13(7):747-51.

- [84] Ly KI, Wen PY, Huang RY. Imaging of Central Nervous System Tumors Based on the 2016 World Health Organization Classification. *Neurologic clinics*. 2020;38(1):95-113.
- [85] Holzgreve H. Ein bösartiger Schmetterling im Kopf. *MMW - Fortschritte der Medizin*. 2018;160(5):36-.
- [86] Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. *Handbook of clinical neurology*. 2016;134:381-97.
- [87] Chakrabarti I, Cockburn M, Cozen W, Wang Y-P, Preston-Martin S. A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974–1999. *Cancer*. 2005;104(12):2798-806.
- [88] Marcus HJ, Vakharia VN, Ourselin S, Duncan J, Tisdall M, Aquilina K. Robot-assisted stereotactic brain biopsy: systematic review and bibliometric analysis. *Child's Nervous System*. 2018;34(7):1299-309.
- [89] McGirt MJ, Villavicencio AT, Bulsara KR, Friedman AH. MRI-guided stereotactic biopsy in the diagnosis of glioma: comparison of biopsy and surgical resection specimen. *Surgical Neurology*. 2003;59(4):279-83.
- [90] Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, et al. Molecular Predictors of Progression-Free and Overall Survival in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma: A Prospective Translational Study of the German Glioma Network. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(34):5743-50.
- [91] Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-Repair Gene MGMT and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents. *New England Journal of Medicine*. 2000;343(19):1350-4.
- [92] Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(10):997-1003.
- [93] Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goepfert M, et al. Prognostic Significance of Molecular Markers and Extent of Resection in Primary Glioblastoma Patients. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(21):6683-93.
- [94] Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013;155(2):462-77.
- [95] Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi ME, Jaeckle KA, et al. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(32):4085-91.
- [96] Labussière M, Boisselier B, Mokhtari K, Di Stefano A-L, Rahimian A, Rossetto M, et al. Combined analysis of TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prognostic glioblastoma classes. *Neurology*. 2014;83(13):1200-6.
- [97] Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta neuropathologica*. 2013;126(6):931-7.
- [98] Simon M, Hosen I, Gousias K, Rachakonda S, Heidenreich B, Gessi M, et al. TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neuro-Oncology*. 2014;17(1):45-52.
- [99] Li XZ, Li YB, Cao Y, Li PL, Liang B, Sun JD, et al. Prognostic implications of resection extent for patients with glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *Journal of neurosurgical sciences*. 2017;61(6):631-9.
- [100] Mohammadi AM, Sullivan TB, Barnett GH, Recinos V, Angelov L, Kamian K, et al. Use of high-field intraoperative magnetic resonance imaging to enhance the extent of resection of enhancing and nonenhancing gliomas. *Neurosurgery*. 2014;74(4):339-48; discussion 49; quiz 49-50.
- [101] Obermueller T, Schaeffner M, Shiban E, Droese D, Negwer C, Meyer B, et al. Intraoperative neuromonitoring for function-guided resection differs for supratentorial motor eloquent gliomas and metastases. *BMC Neurology*. 2015;15(1):211.
- [102] Senders JT, Muskens IS, Schnoor R, Karhade AV, Cote DJ, Smith TR, et al. Agents for fluorescence-guided glioma surgery: a systematic review of preclinical and clinical results. *Acta Neurochirurgica*. 2017;159(1):151-67.

- [103] Chambless LB, Kistka HM, Parker SL, Hassam-Malani L, McGirt MJ, Thompson RC. The relative value of postoperative versus preoperative Karnofsky Performance Scale scores as a predictor of survival after surgical resection of glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology*. 2015;121(2):359-64.
- [104] Park JK, Hodges T, Arko L, Shen M, Dello Iacono D, McNabb A, et al. Scale to predict survival after surgery for recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(24):3838-43.
- [105] Chan JL, Lee SW, Fraass BA, Normolle DP, Greenberg HS, Junck LR, et al. Survival and Failure Patterns of High-Grade Gliomas After Three-Dimensional Conformal Radiotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(6):1635-42.
- [106] Falk AT, Moncharmont C, Guilbert M, Guy JB, Alphonse G, Trone JC, et al. [Radiation-induced increased tumor cell aggressiveness of tumors of the glioblastomas?]. *Bulletin du cancer*. 2014;101(9):876-80.
- [107] Rhomberg W, Zint C. Strahlentherapie. In: Margulies A, Fellingner K, Kroner T, Gaisser A, editors. *Onkologische Krankenpflege*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1997. p. 104-45.
- [108] Hartmann G, Schlegel W. Physikalische Grundlagen. In: Wannemacher M, Wenz F, Debus J, editors. *Strahlentherapie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 11-46.
- [109] Chédeville AL, Madureira PA. The Role of Hypoxia in Glioblastoma Radiotherapy Resistance. *Cancers (Basel)*. 2021;13(3).
- [110] Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2017;58(5):235-63.
- [111] Hill R, Leidal AM, Madureira PA, Gillis LD, Waisman DM, Chiu A, et al. Chromium-mediated apoptosis: involvement of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) and differential induction of p53 target genes. *DNA repair*. 2008;7(9):1484-99.
- [112] Mann J, Ramakrishna R, Magge R, Wernicke AG. Advances in Radiotherapy for Glioblastoma. *Frontiers in neurology*. 2017;8:748.
- [113] Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13(9):916-26.
- [114] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, 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. *The Lancet Oncology*. 2009;10(5):459-66.
- [115] Cabrera AR, Kirkpatrick JP, Fiveash JB, Shih HA, Koay EJ, Lutz S, et al. Radiation therapy for glioblastoma: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *Practical radiation oncology*. 2016;6(4):217-25.
- [116] Kristiansen K, Hagen S, Kollevold T, Torvik A, Holme I, Nesbakken R, et al. Combined modality therapy of operated astrocytomas grade III and IV. Confirmation of the value of postoperative irradiation and lack of potentiation of bleomycin on survival time: a prospective multicenter trial of the Scandinavian Glioblastoma Study Group. *Cancer*. 1981;47(4):649-52.
- [117] Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2002;64(3):259-73.
- [118] Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E, Jr., Batzdorf U, Brooks WH, et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *The New England journal of medicine*. 1980;303(23):1323-9.
- [119] Bleehen NM, Stenning SP. A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. The Medical Research Council Brain Tumour Working Party. *British journal of cancer*. 1991;64(4):769-74.
- [120] Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2017;376(11):1027-37.

- [121] Roa W, Brasher PM, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, et al. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(9):1583-8.
- [122] Roa W, Kepka L, Kumar N, Sinaika V, Matiello J, Lomidze D, et al. International Atomic Energy Agency Randomized Phase III Study of Radiation Therapy in Elderly and/or Frail Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(35):4145-50.
- [123] Corp. MSD, Administration UFaD. TEMODAR (temozolomide) Label [Internet] Zuletzt aktualisiert am: 01.02.2016. Zitiert am: 16.05.2021. URL: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/021029s021,022277s005lbl.pdf.2016](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/021029s021,022277s005lbl.pdf.2016).
- [124] Information NCfB. PubChem Compound Summary for CID 5394, Temozolomide [Internet] Zuletzt aktualisiert am: 15.05.2021. Zitiert am: 16.05.2021. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Temozolomide.2021>.
- [125] Newlands ES, Blackledge GR, Slack JA, Rustin GJ, Smith DB, Stuart NS, et al. Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *British journal of cancer*. 1992;65(2):287-91.
- [126] Baker SD, Wirth M, Statkevich P, Reidenberg P, Alton K, Sartorius SE, et al. Absorption, metabolism, and excretion of <sup>14</sup>C-temozolomide following oral administration to patients with advanced cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1999;5(2):309-17.
- [127] Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry*. 1994;33(31):9045-51.
- [128] Patel M, McCully C, Godwin K, Balis F, editors. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of temozolomide. *Proc Am Soc Clin Oncol*; 1995.
- [129] Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer treatment reviews*. 1997;23(1):35-61.
- [130] Tisdale MJ. Antitumor imidazotetrazines--XV. Role of guanine O6 alkylation in the mechanism of cytotoxicity of imidazotetrazinones. *Biochemical pharmacology*. 1987;36(4):457-62.
- [131] Tentori L, Graziani G. Pharmacological strategies to increase the antitumor activity of methylating agents. *Current medicinal chemistry*. 2002;9(13):1285-301.
- [132] Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, et al. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA repair*. 2004;3(11):1389-407.
- [133] Hombach-Klonisch S, Mehrpour M, Shojaei S, Harlos C, Pitz M, Hamai A, et al. Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. *Pharmacology & therapeutics*. 2018;184:13-41.
- [134] Horton JK, Wilson SH. Hypersensitivity phenotypes associated with genetic and synthetic inhibitor-induced base excision repair deficiency. *DNA repair*. 2007;6(4):530-43.
- [135] Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F, De Vecchis L. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacological research*. 2007;56(4):275-87.
- [136] Fukui K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *Journal of nucleic acids*. 2010;2010.
- [137] Bignami M, O'Driscoll M, Aquilina G, Karran P. Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. *Mutation research*. 2000;462(2-3):71-82.
- [138] Kaina B, Ziouta A, Ochs K, Coquerelle T. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutation research*. 1997;381(2):227-41.

- [139] Stojic L, Mojas N, Cejka P, Di Pietro M, Ferrari S, Marra G, et al. Mismatch repair-dependent G2 checkpoint induced by low doses of SN1 type methylating agents requires the ATR kinase. *Genes & development*. 2004;18(11):1331-44.
- [140] Cejka P, Stojic L, Mojas N, Russell AM, Heinimann K, Cannavó E, et al. Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *The EMBO journal*. 2003;22(9):2245-54.
- [141] D'Atri S, Tentori L, Lacal PM, Graziani G, Pagani E, Benincasa E, et al. Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. *Molecular pharmacology*. 1998;54(2):334-41.
- [142] Bull VL, Tisdale MJ. Antitumour imidazotetrazines--XVI. Macromolecular alkylation by 3-substituted imidazotetrazinones. *Biochemical pharmacology*. 1987;36(19):3215-20.
- [143] Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, et al. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA repair*. 2004;3(11):1389-407.
- [144] Strobel H, Baisch T, Fitzel R, Schilberg K, Siegelin MD, Karpel-Massler G, et al. Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. *Biomedicines*. 2019;7(3).
- [145] Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(11):1027-37.
- [146] Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13(9):916-26.
- [147] Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13(7):707-15.
- [148] Roa W, Brasher PMA, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, et al. Abbreviated Course of Radiation Therapy in Older Patients With Glioblastoma Multiforme: A Prospective Randomized Clinical Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;22(9):1583-8.
- [149] Herrlinger U, Tzaridis T, Mack F, Steinbach JP, Schlegel U, Sabel M, 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 (London, England)*. 2019;393(10172):678-88.
- [150] Lopes Abath Neto O, Aldape K. Morphologic and Molecular Aspects of Glioblastomas. *Neurosurgery clinics of North America*. 2021;32(2):149-58.
- [151] Louis DN, Wesseling P, Aldape K, Brat DJ, Capper D, Cree IA, et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2020;30(4):844-56.
- [152] Little SE, Popov S, Jury A, Bax DA, Doey L, Al-Sarraj S, et al. Receptor tyrosine kinase genes amplified in glioblastoma exhibit a mutual exclusivity in variable proportions reflective of individual tumor heterogeneity. *Cancer research*. 2012;72(7):1614-20.
- [153] Paulus W, Peiffer J. Intratumoral histologic heterogeneity of gliomas. A quantitative study. *Cancer*. 1989;64(2):442-7.
- [154] Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(10):4009-14.
- [155] Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta neuropathologica*. 2009;118(4):469-74.
- [156] Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (New York, NY)*. 2008;321(5897):1807-12.

- [157] National Center for Biotechnology Information, Medicine USNLo. IDH2 isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2 [ Homo sapiens (human) ] [Internet] Zuletzt aktualisiert am: 21.04.2012. Zitiert am: 21.04.2012. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3418.2021>.
- [158] Tang X, Fu X, Liu Y, Yu D, Cai SJ, Yang C. Blockade of Glutathione Metabolism in IDH1-Mutated Glioma. *Molecular cancer therapeutics*. 2020;19(1):221-30.
- [159] Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462(7274):739-44.
- [160] Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer cell*. 2010;17(3):225-34.
- [161] Christensen BC, Smith AA, Zheng S, Koestler DC, Houseman EA, Marsit CJ, et al. DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(2):143-53.
- [162] Duncan CG, Barwick BG, Jin G, Rago C, Kapoor-Vazirani P, Powell DR, et al. A heterozygous IDH1R132H/WT mutation induces genome-wide alterations in DNA methylation. *Genome Res*. 2012;22(12):2339-55.
- [163] Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer cell*. 2010;17(5):510-22.
- [164] Sasaki M, Knobbe CB, Itsumi M, Elia AJ, Harris IS, Chio, II, et al. D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. *Genes & development*. 2012;26(18):2038-49.
- [165] Loenarz C, Schofield CJ. Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nature chemical biology*. 2008;4(3):152-6.
- [166] Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology*. 2007;170(5):1445-53.
- [167] Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 1996;6(3):217-23; discussion 23-4.
- [168] Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Jr., et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(15):6021-6.
- [169] Liu X-Y, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang D-A, Fontebasso AM, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta neuropathologica*. 2012;124(5):615-25.
- [170] Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget*. 2012;3(7):709-22.
- [171] Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1994;53(1):11-21.
- [172] Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2000;80(1):65-72.
- [173] Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science (New York, NY)*. 2013;339(6122):959-61.
- [174] Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science (New York, NY)*. 2013;339(6122):957-9.
- [175] Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, et al. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene*. 1998;16(9):1217-22.

- [176] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (New York, NY)*. 1994;266(5193):2011-5.
- [177] Amorim JP, Santos G, Vinagre J, Soares P. The Role of ATRX in the Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) Phenotype. *Genes (Basel)*. 2016;7(9):66.
- [178] Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science (New York, NY)*. 2011;333(6041):425.
- [179] von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Hoell T, Chung RY, et al. Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *Journal of neurosurgery*. 1992;77(2):295-301.
- [180] Hurtt MR, Moossy J, Donovan-Peluso M, Locker J. Amplification of epidermal growth factor receptor gene in gliomas: histopathology and prognosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1992;51(1):84-90.
- [181] Schlegel J, Merdes A, Stumm G, Albert FK, Forsting M, Hynes N, et al. Amplification of the epidermal-growth-factor-receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma. *International journal of cancer*. 1994;56(1):72-7.
- [182] Gan HK, Cvrljevic AN, Johns TG. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *The FEBS journal*. 2013;280(21):5350-70.
- [183] Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer research*. 2000;60(5):1383-7.
- [184] Schwechheimer K, Huang S, Cavenee WK. EGFR gene amplification--rearrangement in human glioblastomas. *International journal of cancer*. 1995;62(2):145-8.
- [185] Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD, et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem*. 1997;272(5):2927-35.
- [186] Nagane M, Levitzki A, Gazit A, Cavenee WK, Huang HJ. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(10):5724-9.
- [187] Narita Y, Nagane M, Mishima K, Huang HJ, Furnari FB, Cavenee WK. Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer research*. 2002;62(22):6764-9.
- [188] McLendon R, Friedman A, Bigner D, Van Meir EG, Brat DJ, M. Mastrogiannis G, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061-8.
- [189] Montmayeur JP, Valius M, Vandenheede J, Kazlauskas A. The platelet-derived growth factor beta receptor triggers multiple cytoplasmic signaling cascades that arrive at the nucleus as distinguishable inputs. *J Biol Chem*. 1997;272(51):32670-8.
- [190] Valius M, Kazlauskas A. Phospholipase C-gamma 1 and phosphatidylinositol 3 kinase are the downstream mediators of the PDGF receptor's mitogenic signal. *Cell*. 1993;73(2):321-34.
- [191] Cancer Genome Atlas Research Network, Lynda Chin, Meyerson M. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061-8.
- [192] National Center for Biotechnology Information, Medicine USNLo. PDGFRA platelet derived growth factor receptor alpha [ Homo sapiens (human) ] [Internet] Zuletzt aktualisiert am: 04.04.2021. Zitiert am: 26.04.2021. URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5156](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5156).2021.
- [193] National Center for Biotechnology Information, Medicine USNLo. NF1 neurofibromin 1 [ Homo sapiens (human) ] [Internet] Zuletzt aktualisiert am: 18.04.2021. Zitiert am: 26.04.2021. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=4763>.2021.
- [194] Kaelin WG, Jr. Functions of the retinoblastoma protein. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1999;21(11):950-8.

- [195] National Center for Biotechnology Information, Medicine USNLo. RB1 RB transcriptional corepressor 1 [ Homo sapiens (human) ] [Internet] Zuletzt aktualisiert am: 21.04.2021. Zitiert am: 26.04.2021. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5925.2021>.
- [196] Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(3):859-67.
- [197] National Center for Biotechnology Information, Medicine USNLo. CDKN2A cyclin dependent kinase inhibitor 2A [ Homo sapiens (human) ] [Internet] Zuletzt aktualisiert am: 21.04.2021. Zitiert am: 26.04.2021. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1029.2021>.
- [198] National Center for Biotechnology Information, Medicine USNLo. CDKN2B cyclin dependent kinase inhibitor 2B [ Homo sapiens (human) ] [Internet] Zuletzt aktualisiert am: 18.04.2021. Zitiert am: 26.04.2021. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1030.2021>.
- [199] Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International journal of cancer*. 2012;130(8):1715-25.
- [200] National Center for Biotechnology Information, Medicine USNLo. CDK6 cyclin dependent kinase 6 [ Homo sapiens (human) ] [Internet] Zuletzt aktualisiert am: 21.04.2021. Zitiert am: 26.04.2021. URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1021.2021](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1021.2021).
- [201] National Center for Biotechnology Information USNLoM. CDK4 cyclin dependent kinase 4 [ Homo sapiens (human) ] [Internet] Zuletzt aktualisiert am: 18.04.2021. Zitiert am: 26.04.2021. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1019.2021>.
- [202] National Center for Biotechnology Information, Medicine USNLo. TP53 tumor protein p53 [ Homo sapiens (human) ] [Internet] Zuletzt aktualisiert am: 21.04.2021. Zitiert am: 26.04.2021. URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157.2021](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157.2021).
- [203] Network CGAR. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061-8.
- [204] Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer cell*. 2006;9(3):157-73.
- [205] Sidaway P. Glioblastoma subtypes revisited. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2017;14(10):587-.
- [206] Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer cell*. 2017;32(1):42-56.e6.
- [207] Orzan F, Pagani F, Cominelli M, Triggiani L, Calza S, De Bacco F, et al. A simplified integrated molecular and immunohistochemistry-based algorithm allows high accuracy prediction of glioblastoma transcriptional subtypes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2020;100(10):1330-44.
- [208] Mao P, Joshi K, Li J, Kim SH, Li P, Santana-Santos L, et al. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(21):8644-9.
- [209] Audureau E, Chivet A, Ursu R, Corns R, Metellus P, Noel G, et al. Prognostic factors for survival in adult patients with recurrent glioblastoma: a decision-tree-based model. *Journal of neuro-oncology*. 2018;136(3):565-76.
- [210] Lamborn KR, Yung WK, Chang SM, Wen PY, Cloughesy TF, DeAngelis LM, et al. Progression-free survival: an important end point in evaluating therapy for recurrent high-grade gliomas. *Neuro Oncol*. 2008;10(2):162-70.
- [211] Weller M, Cloughesy T, Perry JR, Wick W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? *Neuro-oncology*. 2013;15(1):4-27.
- [212] Wu W, Lamborn KR, Buckner JC, Novotny PJ, Chang SM, O'Fallon JR, et al. Joint NCCTG and NABTC prognostic factors analysis for high-grade recurrent glioma. *Neuro Oncol*. 2010;12(2):164-72.
- [213] Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, et al. Updated Response Assessment Criteria for High-Grade Gliomas: Response Assessment in Neuro-Oncology Working Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(11):1963-72.

- [214] Hart MG, Garside R, Rogers G, Stein K, Grant R. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013(4).
- [215] Hochberg FH, Pruitt A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology*. 1980;30(9):907-11.
- [216] Piper RJ, Senthil KK, Yan J-L, Price SJ. Neuroimaging classification of progression patterns in glioblastoma: a systematic review. *Journal of neuro-oncology*. 2018;139(1):77-88.
- [217] Wann A, Tully PA, Barnes EH, Lwin Z, Jeffree R, Drummond KJ, et al. Outcomes after second surgery for recurrent glioblastoma: a retrospective case-control study. *Journal of neuro-oncology*. 2018;137(2):409-15.
- [218] Nieder C, Andratschke NH, Grosu AL. Re-irradiation for Recurrent Primary Brain Tumors. *Anticancer research*. 2016;36(10):4985-95.
- [219] Mayer R, Sminia P. Reirradiation tolerance of the human brain. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2008;70(5):1350-60.
- [220] Perry JR, Bélanger K, Mason WP, Fulton D, Kavan P, Easaw J, et al. Phase II trial of continuous dose-intense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(12):2051-7.
- [221] Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *The Lancet Oncology*. 2014;15(9):e395-e403.
- [222] Mattei V, Santilli F, Martellucci S, Delle Monache S, Fabrizi J, Colapietro A, et al. The Importance of Tumor Stem Cells in Glioblastoma Resistance to Therapy. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(8).
- [223] Chen W, Wang Y, Zhao B, Liu P, Liu L, Wang Y, et al. Optimal Therapies for Recurrent Glioblastoma: A Bayesian Network Meta-Analysis. *Frontiers in oncology*. 2021;11:641878.
- [224] Lombardi G, De Salvo GL, Brandes AA, Eoli M, Rudà R, Faedi M, et al. Regorafenib compared with lomustine in patients with relapsed glioblastoma (REGOMA): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2019;20(1):110-9.
- [225] Bao Z, Wang Y, Wang Q, Fang S, Shan X, Wang J, et al. Intratumor heterogeneity, microenvironment, and mechanisms of drug resistance in glioma recurrence and evolution. *Frontiers of medicine*. 2021.
- [226] Liebner S, Fischmann A, Rascher G, Duffner F, Grote EH, Kalbacher H, et al. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta neuropathologica*. 2000;100(3):323-31.
- [227] Virtuoso A, Giovannoni R, De Luca C, Gargano F, Cerasuolo M, Maggio N, et al. The Glioblastoma Microenvironment: Morphology, Metabolism, and Molecular Signature of Glial Dynamics to Discover Metabolic Rewiring Sequence. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(7).
- [228] Barthel FP, Johnson KC, Varn FS, Moskalik AD, Tanner G, Kocakavuk E, et al. Longitudinal molecular trajectories of diffuse glioma in adults. *Nature*. 2019;576(7785):112-20.
- [229] Wagener C. *Molekulare Onkologie : Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3., komplett aktualisierte und erw. Aufl. ed. Stuttgart u.a.2010.
- [230] Körber V, Yang J, Barah P, Wu Y, Stichel D, Gu Z, et al. Evolutionary Trajectories of IDH(WT) Glioblastomas Reveal a Common Path of Early Tumorigenesis Instigated Years ahead of Initial Diagnosis. *Cancer cell*. 2019;35(4):692-704.e12.
- [231] Draaisma K, Chatzipli A, Taphoorn M, Kerkhof M, Weyerbrock A, Sanson M, et al. Molecular Evolution of IDH Wild-Type Glioblastomas Treated With Standard of Care Affects Survival and Design of Precision Medicine Trials: A Report From the EORTC 1542 Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2020;38(1):81-99.
- [232] Wang J, Cazzato E, Ladewig E, Frattini V, Rosenbloom DI, Zairis S, et al. Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nature genetics*. 2016;48(7):768-76.
- [233] Wang J, Cazzato E, Ladewig E, Frattini V, Rosenbloom DIS, Zairis S, et al. Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nature genetics*. 2016;48(7):768-76.

- [234] Schäfer N, Gielen GH, Rauschenbach L, Kebir S, Till A, Reinartz R, et al. Longitudinal heterogeneity in glioblastoma: moving targets in recurrent versus primary tumors. *Journal of translational medicine*. 2019;17(1):96.
- [235] Birzu C, French P, Caccese M, Cerretti G, Idbaih A, Zagonel V, et al. Recurrent Glioblastoma: From Molecular Landscape to New Treatment Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2020;13(1):47.
- [236] van den Bent MJ, Gao Y, Kerkhof M, Kros JM, Gorlia T, van Zwieten K, et al. Changes in the EGFR amplification and EGFRvIII expression between paired primary and recurrent glioblastomas. *Neuro-Oncology*. 2015;17(7):935-41.
- [237] Kim EL, Sorokin M, Kantelhardt SR, Kalasauskas D, Sprang B, Fauss J, et al. Intratumoral Heterogeneity and Longitudinal Changes in Gene Expression Predict Differential Drug Sensitivity in Newly Diagnosed and Recurrent Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2).
- [238] Torrisi F, Vicario N, Spitale FM, Cammarata FP, Minafra L, Salvatorelli L, et al. The Role of Hypoxia and SRC Tyrosine Kinase in Glioblastoma Invasiveness and Radioresistance. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10).
- [239] Bullitt E, Zeng D, Gerig G, Aylward S, Joshi S, Smith JK, et al. Vessel tortuosity and brain tumor malignancy: a blinded study. *Academic radiology*. 2005;12(10):1232-40.
- [240] Plate KH, Mennel HD. Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 1995;47(2):89-94.
- [241] Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2006;65(6):529-39.
- [242] Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell*. 2010;40(2):294-309.
- [243] Ebert BL, Bunn HF. Regulation of Transcription by Hypoxia Requires a Multiprotein Complex That Includes Hypoxia-Inducible Factor 1, an Adjacent Transcription Factor, and p300/CREB Binding Protein. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(7):4089-96.
- [244] Chédeville AL, Lourdasamy A, Monteiro AR, Hill R, Madureira PA. Investigating Glioblastoma Response to Hypoxia. *Biomedicines*. 2020;8(9).
- [245] Han X, Xue X, Zhou H, Zhang G. A molecular view of the radioresistance of gliomas. *Oncotarget*. 2017;8(59):100931-41.
- [246] Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer cell*. 2009;15(6):501-13.
- [247] Marampon F, Gravina GL, Zani BM, Popov VM, Fratticci A, Cerasani M, et al. Hypoxia sustains glioblastoma radioresistance through ERKs/DNA-PKcs/HIF-1 $\alpha$  functional interplay. *International journal of oncology*. 2014;44(6):2121-31.
- [248] Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science (New York, NY)*. 1956;123(3191):309-14.
- [249] Clark PM, Mai WX, Cloughesy TF, Nathanson DA. Emerging Approaches for Targeting Metabolic Vulnerabilities in Malignant Glioma. *Current neurology and neuroscience reports*. 2016;16(2):17.
- [250] Burris HA, 3rd. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2013;71(4):829-42.
- [251] Kim Y, Kim KH, Lee J, Lee YA, Kim M, Lee SJ, et al. Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2012;92(3):466-73.
- [252] Coulter R, Blandino M, Tomlinson JM, Pauly GT, Krajewska M, Moschel RC, et al. Differences in the rate of repair of O6-alkylguanines in different sequence contexts by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Chemical research in toxicology*. 2007;20(12):1966-71.
- [253] Johannessen TC, Bjerkvig R. Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Expert review of anticancer therapy*. 2012;12(5):635-42.
- [254] Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, et al. MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nature Reviews Neurology*. 2014;10(7):372-85.

- [255] Jovčevska I. Next Generation Sequencing and Machine Learning Technologies Are Painting the Epigenetic Portrait of Glioblastoma. *Frontiers in oncology*. 2020;10:798.
- [256] Danam RP, Qian XC, Howell SR, Brent TP. Methylation of selected CpGs in the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter region as a marker of gene silencing. *Molecular carcinogenesis*. 1999;24(2):85-9.
- [257] Brandes AA, Franceschi E, Paccapelo A, Tallini G, De Biase D, Ghimenton C, et al. Role of MGMT Methylation Status at Time of Diagnosis and Recurrence for Patients with Glioblastoma: Clinical Implications. *The Oncologist*. 2017;22(4):432-7.
- [258] Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, Hentschel B, Sabel MC, Westphal M, et al. Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *International journal of cancer*. 2011;129(3):659-70.
- [259] Yamashiro K, Nakao K, Ohba S, Hirose Y. Human Glioma Cells Acquire Temozolomide Resistance After Repeated Drug Exposure Via DNA Mismatch Repair Dysfunction. *Anticancer research*. 2020;40(3):1315-23.
- [260] Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell research*. 2008;18(1):85-98.
- [261] Karran P. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis*. 2001;22(12):1931-7.
- [262] Meyers M, Hwang A, Wagner MW, Boothman DA. Role of DNA mismatch repair in apoptotic responses to therapeutic agents. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2004;44(4):249-64.
- [263] O'Brien V, Brown R. Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. *Carcinogenesis*. 2006;27(4):682-92.
- [264] Zhang J, Stevens MF, Laughton CA, Madhusudan S, Bradshaw TD. Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications. *Oncology*. 2010;78(2):103-14.
- [265] Friedland HS, Johnson SP, Dong Q, Schold SC, Rasheed BK, Bigner SH, et al. Methylator resistance mediated by mismatch repair deficiency in a glioblastoma multiforme xenograft. *Cancer research*. 1997;57(14):2933-6.
- [266] Yip S, Miao J, Cahill DP, Iafrate AJ, Aldape K, Nutt CL, et al. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(14):4622-9.
- [267] Hunter C, Smith R, Cahill DP, Stephens P, Stevens C, Teague J, et al. A Hypermutation Phenotype and Somatic MSH6 Mutations in Recurrent Human Malignant Gliomas after Alkylator Chemotherapy. *Cancer research*. 2006;66(8):3987-91.
- [268] Jiapaer S, Furuta T, Tanaka S, Kitabayashi T, Nakada M. Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. *Neurologia medico-chirurgica*. 2018;58(10):405-21.
- [269] Hunter C, Smith R, Cahill DP, Stephens P, Stevens C, Teague J, et al. A hypermutation phenotype and somatic MSH6 mutations in recurrent human malignant gliomas after alkylator chemotherapy. *Cancer research*. 2006;66(8):3987-91.
- [270] Touat M, Li YY, Boynton AN, Spurr LF, Iorgulescu JB, Bohrson CL, et al. Mechanisms and therapeutic implications of hypermutation in gliomas. *Nature*. 2020;580(7804):517-23.
- [271] Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, Codd PJ, Romany CA, Reavie LB, et al. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(7):2038-45.
- [272] Blomquist MR, Ensign SF, D'Angelo F, Phillips JJ, Ceccarelli M, Peng S, et al. Temporospatial genomic profiling in glioblastoma identifies commonly altered core pathways underlying tumor progression. *Neuro-oncology advances*. 2020;2(1):vdaa078.
- [273] Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer cell*. 2017;32(1):42-56.e6.

- [274] Bozic I, Reiter JG, Allen B, Antal T, Chatterjee K, Shah P, et al. Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. *eLife*. 2013;2:e00747.
- [275] Choi S, Yu Y, Grimmer MR, Wahl M, Chang SM, Costello JF. Temozolomide-associated hypermutation in gliomas. *Neuro Oncol*. 2018;20(10):1300-9.
- [276] Lee JK, Wang J, Sa JK, Ladewig E, Lee HO, Lee IH, et al. Spatiotemporal genomic architecture informs precision oncology in glioblastoma. *Nature genetics*. 2017;49(4):594-9.
- [277] Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-13.
- [278] Chien CH, Hsueh WT, Chuang JY, Chang KY. Dissecting the mechanism of temozolomide resistance and its association with the regulatory roles of intracellular reactive oxygen species in glioblastoma. *Journal of biomedical science*. 2021;28(1):18.
- [279] Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-60.
- [280] Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & development*. 2015;29(12):1203-17.
- [281] Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2004;51(1):1-28.
- [282] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*. 1997;3(7):730-7.
- [283] Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 2002;39(3):193-206.
- [284] Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(25):15178-83.
- [285] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*. 2003;63(18):5821-8.
- [286] Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer cell*. 2006;9(5):391-403.
- [287] Lee JS, Lee HJ, Moon BH, Song SH, Lee MO, Shim SH, et al. Generation of cancerous neural stem cells forming glial tumor by oncogenic stimulation. *Stem cell reviews and reports*. 2012;8(2):532-45.
- [288] Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. 2011;469(7330):314-22.
- [289] Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.
- [290] Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*. 2012;488(7412):522-6.
- [291] Vidal SJ, Rodriguez-Bravo V, Galsky M, Cordon-Cardo C, Domingo-Domenech J. Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. *Oncogene*. 2014;33(36):4451-63.
- [292] Brown DV, Stylli SS, Kaye AH, Mantamadiotis T. Multilayered Heterogeneity of Glioblastoma Stem Cells: Biological and Clinical Significance. *Advances in experimental medicine and biology*. 2019;1139:1-21.
- [293] Brown DV, Filiz G, Daniel PM, Hollande F, Dworkin S, Amiridis S, et al. Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intra-tumor heterogeneity. *PloS one*. 2017;12(2):e0172791.
- [294] Sugimori M, Hayakawa Y, Boman BM, Fields JZ, Awaji M, Kozano H, et al. Discovery of Power-Law Growth in the Self-Renewal of Heterogeneous Glioma Stem Cell Populations. *PloS one*. 2015;10(8):e0135760.
- [295] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
- [296] Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013;501(7467):328-37.

- [297] Piccirillo SGM, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature*. 2006;444(7120):761-5.
- [298] Stricker SH, Feber A, Engström PG, Carén H, Kurian KM, Takashima Y, et al. Widespread resetting of DNA methylation in glioblastoma-initiating cells suppresses malignant cellular behavior in a lineage-dependent manner. *Genes & development*. 2013;27(6):654-69.
- [299] Suvà ML, Tirosch I. The Glioma Stem Cell Model in the Era of Single-Cell Genomics. *Cancer cell*. 2020;37(5):630-6.
- [300] Suvà ML, Rheinbay E, Gillespie SM, Patel AP, Wakimoto H, Rabkin SD, et al. Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*. 2014;157(3):580-94.
- [301] Gimple RC, Bhargava S, Dixit D, Rich JN. Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes & development*. 2019;33(11-12):591-609.
- [302] Tanay A, Regev A. Scaling single-cell genomics from phenomenology to mechanism. *Nature*. 2017;541(7637):331-8.
- [303] Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, et al. An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma. *Cell*. 2019;178(4):835-49. e21.
- [304] Weng Q, Wang J, Wang J, He D, Cheng Z, Zhang F, et al. Single-Cell Transcriptomics Uncovers Glial Progenitor Diversity and Cell Fate Determinants during Development and Gliomagenesis. *Cell Stem Cell*. 2019;24(5):707-23. e8.
- [305] Bhaduri A, Di Lullo E, Jung D, Müller S, Crouch EE, Espinosa CS, et al. Outer Radial Glia-like Cancer Stem Cells Contribute to Heterogeneity of Glioblastoma. *Cell Stem Cell*. 2020;26(1):48-63. e6.
- [306] Lan X, Jörg DJ, Cavalli FMG, Richards LM, Nguyen LV, Vanner RJ, et al. Fate mapping of human glioblastoma reveals an invariant stem cell hierarchy. *Nature*. 2017;549(7671):227-32.
- [307] Patel AP, Tirosch I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science (New York, NY)*. 2014;344(6190):1396-401.
- [308] Furusawa C, Kaneko K. Chaotic expression dynamics implies pluripotency: when theory and experiment meet. *Biology Direct*. 2009;4(1):17.
- [309] Gupta Piyush B, Fillmore Christine M, Jiang G, Shapira Sagi D, Tao K, Kuperwasser C, et al. Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells. *Cell*. 2011;146(4):633-44.
- [310] MacArthur BD, Lemischka IR. Statistical Mechanics of Pluripotency. *Cell*. 2013;154(3):484-9.
- [311] Ho IAW, Shim WSN. Contribution of the Microenvironmental Niche to Glioblastoma Heterogeneity. *BioMed Research International*. 2017;2017:9634172.
- [312] Hambardzumyan D, Bergers G. Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends in cancer*. 2015;1(4):252-65.
- [313] Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle*. 2009;8(20):3274-84.
- [314] Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 $\alpha$ . *Brain*. 2010;133(4):983-95.
- [315] Guardia GDA, Correa BR, Araujo PR, Qiao M, Burns S, Penalva LOF, et al. Proneural and mesenchymal glioma stem cells display major differences in splicing and lncRNA profiles. *npj Genomic Medicine*. 2020;5(1):2.
- [316] Binello E, Germano IM. Targeting glioma stem cells: A novel framework for brain tumors. *Cancer Science*. 2011;102(11):1958-66.
- [317] Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, et al. Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer cell*. 2009;15(6):501-13.

- [318] Cheng L, Wu Q, Guryanova OA, Huang Z, Huang Q, Rich JN, et al. Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;406(4):643-8.
- [319] Tunici P, Bissola L, Lualdi E, Pollo B, Cajola L, Broggi G, et al. Genetic alterations and in vivo tumorigenicity of neurospheres derived from an adult glioblastoma. *Molecular Cancer*. 2004;3(1):25.
- [320] Kim J, Woo AJ, Chu J, Snow JW, Fujiwara Y, Kim CG, et al. A Myc network accounts for similarities between embryonic stem and cancer cell transcription programs. *Cell*. 2010;143(2):313-24.
- [321] Ligon KL, Huillard E, Mehta S, Kesari S, Liu H, Alberta JA, et al. Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron*. 2007;53(4):503-17.
- [322] McCord AM, Jamal M, Williams ES, Camphausen K, Tofilon PJ. CD133+ glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(16):5145-53.
- [323] Son MJ, Woolard K, Nam DH, Lee J, Fine HA. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell*. 2009;4(5):440-52.
- [324] Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA, Fusco D, Lopez K, Ellis JA, et al. Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery*. 2008;62(2):505-14; discussion 14-5.
- [325] Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, Wang J, Eyster CE, Macsworlds J, et al. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6(5):421-32.
- [326] Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer research*. 2007;67(9):4010-5.
- [327] Sun Y, Liou B, Quinn B, Ran H, Xu YH, Grabowski GA. In vivo and ex vivo evaluation of L-type calcium channel blockers on acid beta-glucosidase in Gaucher disease mouse models. *PloS one*. 2009;4(10):e7320.
- [328] Gan C, Pierscianek D, El Hindy N, Ahmadipour Y, Keyvani K, Sure U, et al. The predominant expression of cancer stem cell marker ALDH1A3 in tumor infiltrative area is associated with shorter overall survival of human glioblastoma. *BMC Cancer*. 2020;20(1):672.
- [329] Sullivan KE, Rojas K, Cerione RA, Nakano I, Wilson KF. The stem cell/cancer stem cell marker ALDH1A3 regulates the expression of the survival factor tissue transglutaminase, in mesenchymal glioma stem cells. *Oncotarget*. 2017;8(14):22325-43.
- [330] Li G, Li Y, Liu X, Wang Z, Zhang C, Wu F, et al. ALDH1A3 induces mesenchymal differentiation and serves as a predictor for survival in glioblastoma. *Cell Death Dis*. 2018;9(12):1190.
- [331] Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta neuropathologica*. 2010;120(6):707-18.
- [332] Miller JJ, Shih HA, Andronesi OC, Cahill DP. Isocitrate dehydrogenase-mutant glioma: Evolving clinical and therapeutic implications. *Cancer*. 2017;123(23):4535-46.
- [333] Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes & Cancer*. 2011;2(6):607-17.
- [334] Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*. 2005;2(1):S4-S11.
- [335] Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008;66(4):596.
- [336] Nagarajan RP, Costello JF. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. *Seminars in Cancer Biology*. 2009;19(3):188-97.
- [337] Bogdanović O, Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*. 2009;118(5):549-65.

- [338] Du Q, Luu PL, Stirzaker C, Clark SJ. Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics*. 2015;7(6):1051-73.
- [339] Neidhart M. Chapter 1 - DNA Methylation – Introduction. In: Neidhart M, editor. *DNA Methylation and Complex Human Disease*. Oxford: Academic Press; 2016. p. 1-8.
- [340] Zhu K, Xie V, Huang S. Epigenetic regulation of cancer stem cell and tumorigenesis. *Advances in cancer research*. 2020;148:1-26.
- [341] Brock MV, Herman JG, Baylin SB. Cancer as a manifestation of aberrant chromatin structure. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2007;13(1):3-8.
- [342] Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006;7(6):437-47.
- [343] Qureshi IA, Mehler MF. Epigenetics, Nervous System Tumors, and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2011;3(3):3525-56.
- [344] Cadieux B, Ching T-T, VandenBerg SR, Costello JF. Genome-wide Hypomethylation in Human Glioblastomas Associated with Specific Copy Number Alteration, Methylene-tetrahydrofolate Reductase Allele Status, and Increased Proliferation. *Cancer research*. 2006;66(17):8469-76.
- [345] Nagarajan RP, Costello JF. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. *Semin Cancer Biol*. 2009;19(3):188-97.
- [346] Etcheverry A, Aubry M, de Tairac M, Vauleon E, Boniface R, Guenot F, et al. DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genomics*. 2010;11(1):701.
- [347] Nagarajan RP, Zhang B, Bell RJ, Johnson BE, Olshen AB, Sundaram V, et al. Recurrent epimutations activate gene body promoters in primary glioblastoma. *Genome Res*. 2014;24(5):761-74.
- [348] Rajendran G, Shanmuganandam K, Bendre A, Mujumdar D, Goel A, Shiras A. Epigenetic regulation of DNA methyltransferases: DNMT1 and DNMT3B in gliomas. *Journal of neuro-oncology*. 2011;104(2):483-94.
- [349] Amatya VJ, Naumann U, Weller M, Ohgaki H. TP53 promoter methylation in human gliomas. *Acta neuropathologica*. 2005;110(2):178-84.
- [350] Baeza N, Weller M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. PTEN methylation and expression in glioblastomas. *Acta neuropathologica*. 2003;106(5):479-85.
- [351] Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2001;81(1):77-82.
- [352] Pangeni RP, Zhang Z, Alvarez AA, Wan X, Sastry N, Lu S, et al. Genome-wide methylomic and transcriptomic analyses identify subtype-specific epigenetic signatures commonly dysregulated in glioma stem cells and glioblastoma. *Epigenetics*. 2018;13(4):432-48.
- [353] Gussyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. *Semin Cancer Biol*. 2018;51:50-8.
- [354] Allen BK, Stathias V, Maloof ME, Vidovic D, Winterbottom EF, Capobianco AJ, et al. Epigenetic pathways and glioblastoma treatment: insights from signaling cascades. *Journal of cellular biochemistry*. 2015;116(3):351-63.
- [355] Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer research*. 1996;56(10):2405-10.
- [356] Mure H, Matsuzaki K, Kitazato KT, Mizobuchi Y, Kuwayama K, Kageji T, et al. Akt2 and Akt3 play a pivotal role in malignant gliomas. *Neuro Oncol*. 2010;12(3):221-32.
- [357] Xue J, Gao HX, Sang W, Cui WL, Liu M, Zhao Y, et al. Identification of core differentially methylated genes in glioma. *Oncology letters*. 2019;18(6):6033-45.
- [358] Skiriute D, Vaitkiene P, Saferis V, Asmoniene V, Skauminas K, Deltuva VP, et al. MGMT, GATA6, CD81, DR4, and CASP8 gene promoter methylation in glioblastoma. *BMC Cancer*. 2012;12(1):218.
- [359] Mellai M, Monzeglio O, Piazzini A, Caldera V, Annovazzi L, Cassoni P, et al. MGMT promoter hypermethylation and its associations with genetic alterations in a series of 350 brain tumors. *Journal of neuro-oncology*. 2012;107(3):617-31.

- [360] Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis*. 2001;22(10):1715-9.
- [361] Montella L, Cuomo M, Del Gaudio N, Buonaiuto M, Costabile D, Visconti R, et al. Epigenetic alterations in glioblastomas: Diagnostic, prognostic and therapeutic relevance. *International journal of cancer*. 2022.
- [362] Phillips RE, Soshnev AA, Allis CD. Epigenomic Reprogramming as a Driver of Malignant Glioma. *Cancer cell*. 2020;38(5):647-60.
- [363] Chaligne R, Gaiti F, Silverbush D, Schiffman JS, Weisman HR, Kluegel L, et al. Epigenetic encoding, heritability and plasticity of glioma transcriptional cell states. *Nature genetics*. 2021;53(10):1469-79.
- [364] Pangeni RP, Zhang Z, Alvarez AA, Wan X, Sastry N, Lu S, et al. Genome-wide methylomic and transcriptomic analyses identify subtype-specific epigenetic signatures commonly dysregulated in glioma stem cells and glioblastoma. *Epigenetics*. 2018;13(4):432-48.
- [365] Lucio-Eterovic AKB, Cortez MAA, Valera ET, Motta FJN, Queiroz RGP, Machado HR, et al. Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoeexpressed in glioblastomas. *BMC Cancer*. 2008;8(1):243.
- [366] Ciechomska IA, Jayaprakash C, Maleszewska M, Kaminska B. Histone Modifying Enzymes and Chromatin Modifiers in Glioma Pathobiology and Therapy Responses. In: Barańska J, editor. *Glioma Signaling*. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 259-79.
- [367] Uddin MS, Mamun AA, Alghamdi BS, Tewari D, Jeandet P, Sarwar MS, et al. Epigenetics of glioblastoma multiforme: From molecular mechanisms to therapeutic approaches. *Semin Cancer Biol*. 2022;83:100-20.
- [368] Häyry V, Tanner M, Blom T, Tynninen O, Roselli A, Ollikainen M, et al. Copy number alterations of the polycomb gene BMI1 in gliomas. *Acta neuropathologica*. 2008;116(1):97-102.
- [369] Valor LM, Hervás-Corpión I. The Epigenetics of Glioma Stem Cells: A Brief Overview. *Frontiers in oncology*. 2020;10:602378.
- [370] Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Bumber Y, Charo C, et al. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nature genetics*. 2008;40(6):741-50.
- [371] Fang K, Liu P, Dong S, Guo Y, Cui X, Zhu X, et al. Magnetofection based on superparamagnetic iron oxide nanoparticle-mediated low lncRNA HOTAIR expression decreases the proliferation and invasion of glioma stem cells. *International journal of oncology*. 2016;49(2):509-18.
- [372] Lee J, Son MJ, Woolard K, Donin NM, Li A, Cheng CH, et al. Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer cell*. 2008;13(1):69-80.
- [373] Yoo S, Bieda MC. Differences among brain tumor stem cell types and fetal neural stem cells in focal regions of histone modifications and DNA methylation, broad regions of modifications, and bivalent promoters. *BMC Genomics*. 2014;15(1):724.
- [374] Morgan MA, Shilatifard A. Chromatin signatures of cancer. *Genes & development*. 2015;29(3):238-49.
- [375] Nabils NH, Deleyrolle LP, Darst RP, Riva A, Reynolds BA, Kladde MP. Multiplex mapping of chromatin accessibility and DNA methylation within targeted single molecules identifies epigenetic heterogeneity in neural stem cells and glioblastoma. *Genome Res*. 2014;24(2):329-39.
- [376] Stępnia K, Machnicka MA, Mieczkowski J, Macioszek A, Wojtaś B, Gielniewski B, et al. Mapping chromatin accessibility and active regulatory elements reveals pathological mechanisms in human gliomas. *Nature communications*. 2021;12(1):3621.
- [377] Huang Y-C, Lai JC-Y, Peng P-H, Wei K-C, Wu K-J. Chromatin accessibility analysis identifies GSTM1 as a prognostic marker in human glioblastoma patients. *Clinical epigenetics*. 2021;13(1):201.

- [378] Guilhamon P, Chesnelong C, Kushida MM, Nikolic A, Singhal D, MacLeod G, et al. Single-cell chromatin accessibility profiling of glioblastoma identifies an invasive cancer stem cell population associated with lower survival. *eLife*. 2021;10:e64090.
- [379] Tome-Garcia J, Erfani P, Nudelman G, Tsankov AM, Katsyv I, Tejero R, et al. Analysis of chromatin accessibility uncovers TEAD1 as a regulator of migration in human glioblastoma. *Nature communications*. 2018;9(1):4020.
- [380] Lu X, Maturi NP, Jarvius M, Yildirim I, Dang Y, Zhao L, et al. Cell-lineage controlled epigenetic regulation in glioblastoma stem cells determines functionally distinct subgroups and predicts patient survival. *Nature communications*. 2022;13(1):2236.
- [381] Chu T, Rice EJ, Booth GT, Salamanca HH, Wang Z, Core LJ, et al. Chromatin run-on and sequencing maps the transcriptional regulatory landscape of glioblastoma multiforme. *Nature genetics*. 2018;50(11):1553-64.
- [382] Mack SC, Singh I, Wang X, Hirsch R, Wu Q, Villagomez R, et al. Chromatin landscapes reveal developmentally encoded transcriptional states that define human glioblastoma. *The Journal of experimental medicine*. 2019;216(5):1071-90.
- [383] Klughammer J, Kiesel B, Roetzer T, Fortelny N, Nemc A, Nanning KH, et al. The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space. *Nature medicine*. 2018;24(10):1611-24.
- [384] Kraboth Z, Kalman B. Longitudinal Characteristics of Glioblastoma in Genome-Wide Studies. *Pathology & Oncology Research*. 2020;26(4):2035-47.
- [385] Garrett MC, Albano R, Carnwath T, Shah S, Woo D, Lamba M, et al. Chromatin structure predicts survival in glioma patients. *Scientific reports*. 2022;12(1):8221.
- [386] Jiménez VG, Doval MB, Bellvert CG, Goliney VG, Asencio OS, Martín AG, et al. Quantitative analysis of MGMT promoter methylation status changes by pyrosequencing in recurrent glioblastoma. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2022.
- [387] O'Regan CJ, Kearney H, Beausang A, Farrell MA, Brett FM, Cryan JB, et al. Temporal stability of MGMT promoter methylation in glioblastoma patients undergoing STUPP protocol. *Journal of neuro-oncology*. 2018;137(2):233-40.
- [388] Park CK, Kim JE, Kim JY, Song SW, Kim JW, Choi SH, et al. The Changes in MGMT Promoter Methylation Status in Initial and Recurrent Glioblastomas. *Translational oncology*. 2012;5(5):393-7.
- [389] Glioma through the looking GLASS: molecular evolution of diffuse gliomas and the Glioma Longitudinal Analysis Consortium. *Neuro Oncol*. 2018;20(7):873-84.
- [390] Oshima RG. Intermediate filaments: A historical perspective. *Experimental Cell Research*. 2007;313(10):1981-94.
- [391] Guadagno E, Borrelli G, Califano M, Cali G, Solari D, Del Basso De Caro M. Immunohistochemical expression of stem cell markers CD44 and nestin in glioblastomas: Evaluation of their prognostic significance. *Pathology - Research and Practice*. 2016;212(9):825-32.
- [392] Zottel A, Jovčevska I, Šamec N, Komel R. Cytoskeletal proteins as glioblastoma biomarkers and targets for therapy: A systematic review. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2021;160:103283.
- [393] Lépinoux-Chambaud C, Eyer J. Review on intermediate filaments of the nervous system and their pathological alterations. *Histochemistry and Cell Biology*. 2013;140(1):13-22.
- [394] Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2011;93(3):421-43.
- [395] Jurga AM, Paleczna M, Kadluczka J, Kuter KZ. Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. *Biomolecules*. 2021;11(9):1361.
- [396] Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current opinion in cell biology*. 2015;32:121-30.
- [397] Chen WJ, He DS, Tang RX, Ren FH, Chen G. Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2015;16(2):411-20.

- [398] Alkhaibary A, Alassiri AH, AlSufiani F, Alharbi MA. Ki-67 labeling index in glioblastoma; does it really matter? *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*. 2019;12(2):82-8.
- [399] Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*. 2000;182(3):311-22.
- [400] Mehrmohamadi M, Sepehri MH, Nazer N, Norouzi MR. A Comparative Overview of Epigenomic Profiling Methods. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:714687.
- [401] Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*. 2016;5(1).
- [402] Li Y. Modern epigenetics methods in biological research. *Methods*. 2021;187:104-13.
- [403] Rauluseviciute I, Drabløs F, Rye MB. DNA methylation data by sequencing: experimental approaches and recommendations for tools and pipelines for data analysis. *Clinical epigenetics*. 2019;11(1):193.
- [404] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(5):1827-31.
- [405] Vlassenbroeck I, Califice S, Diserens A-C, Migliavacca E, Straub J, Di Stefano I, et al. Validation of Real-Time Methylation-Specific PCR to Determine O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene Promoter Methylation in Glioma. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2008;10(4):332-7.
- [406] Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(18):9821-6.
- [407] Park PJ. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(10):669-80.
- [408] Minnoye L, Marinov GK, Krausgruber T, Pan L, Marand AP, Secchia S, et al. Chromatin accessibility profiling methods. *Nature Reviews Methods Primers*. 2021;1(1):10.
- [409] Grandi FC, Modi H, Kampman L, Corces MR. Chromatin accessibility profiling by ATAC-seq. *Nat Protoc*. 2022;17(6):1518-52.
- [410] Boeger H, Griesenbeck J, Strattan JS, Kornberg RD. Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Molecular cell*. 2003;11(6):1587-98.
- [411] Gross DS, Garrard WT. Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annual review of biochemistry*. 1988;57:159-97.
- [412] Klein DC, Hainer SJ. Genomic methods in profiling DNA accessibility and factor localization. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*. 2020;28(1):69-85.
- [413] Giresi PG, Kim J, McDaniell RM, Iyer VR, Lieb JD. FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. *Genome Res*. 2007;17(6):877-85.
- [414] Song L, Zhang Z, Grasfeder LL, Boyle AP, Giresi PG, Lee BK, et al. Open chromatin defined by DNaseI and FAIRE identifies regulatory elements that shape cell-type identity. *Genome Res*. 2011;21(10):1757-67.
- [415] Schmid RS, Simon JM, Vitucci M, McNeill RS, Bash RE, Werneke AM, et al. Core pathway mutations induce de-differentiation of murine astrocytes into glioblastoma stem cells that are sensitive to radiation but resistant to temozolomide. *Neuro Oncol*. 2016;18(7):962-73.
- [416] Fidoamore A, Cristiano L, Antonosante A, d'Angelo M, Di Giacomo E, Astarita C, et al. Glioblastoma Stem Cells Microenvironment: The Paracrine Roles of the Niche in Drug and Radioresistance. *Stem cells international*. 2016;2016:6809105.
- [417] Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CM, et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer research*. 2011;71(13):4640-52.
- [418] Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, et al. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & development*. 2006;20(5):557-70.
- [419] Kolenda J, Jensen SS, Aaberg-Jessen C, Christensen K, Andersen C, Brüner N, et al. Effects of hypoxia on expression of a panel of stem cell and chemoresistance markers in glioblastoma-derived spheroids. *Journal of neuro-oncology*. 2011;103(1):43-58.

- [420] Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, Malric L, Zentkowski D, et al. Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death & Disease*. 2014;5(11):e1543-e.
- [421] Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang X-F, White RR, et al. Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2010;28(1):17-28.
- [422] Morgenroth A, Vogg AT, Ermer K, Zlatopolskiy B, Mottaghy FM. Hedgehog signaling sensitizes glioma stem cells to endogenous nano-irradiation. *Oncotarget*. 2014;5(14):5483-93.
- [423] Tu Y, Chen Z, Zhao P, Sun G, Bao Z, Chao H, et al. Smoothed Promotes Glioblastoma Radiation Resistance Via Activating USP3-Mediated Claspin Deubiquitination. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2020;26(7):1749-62.
- [424] Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science (New York, NY)*. 1998;281(5383):1677-9.
- [425] Squatrito M, Brennan CW, Helmy K, Huse JT, Petrini JH, Holland EC. Loss of ATM/Chk2/p53 pathway components accelerates tumor development and contributes to radiation resistance in gliomas. *Cancer cell*. 2010;18(6):619-29.
- [426] Carruthers R, Ahmed SU, Strathdee K, Gomez-Roman N, Amoah-Buahin E, Watts C, et al. Abrogation of radioresistance in glioblastoma stem-like cells by inhibition of ATM kinase. *Molecular oncology*. 2015;9(1):192-203.
- [427] Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2014;6(6):442-57.
- [428] Tentori L, Ricci-Vitiani L, Muzi A, Ciccarone F, Pelacchi F, Calabrese R, et al. Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates resistance of human glioblastoma stem cells to temozolomide. *BMC Cancer*. 2014;14:151.
- [429] Peng C, Chen Z, Wang S, Wang HW, Qiu W, Zhao L, et al. The Error-Prone DNA Polymerase  $\kappa$  Promotes Temozolomide Resistance in Glioblastoma through Rad17-Dependent Activation of ATR-Chk1 Signaling. *Cancer research*. 2016;76(8):2340-53.
- [430] Beier D, Röhrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, et al. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer research*. 2008;68(14):5706-15.
- [431] Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*. 2006;5:67.
- [432] Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, Grogan PT, Lamont JD, Decker PA, et al. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro Oncol*. 2009;11(3):281-91.
- [433] Liu G, Li C, Guo L, Garland M. Experimental evidence for a significant homometallic catalytic binuclear elimination reaction: Linear-quadratic kinetics in the rhodium catalyzed hydroformylation of cyclooctene. *Journal of Catalysis*. 2006;237(1):67-78.
- [434] Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, Persano L, Della Puppa A, Frasson C, et al. Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2010;28(5):851-62.
- [435] Zhou Y, Zhou Y, Shingu T, Feng L, Chen Z, Ogasawara M, et al. Metabolic Alterations in Highly Tumorigenic Glioblastoma Cells: PREFERENCE FOR HYPOXIA AND HIGH DEPENDENCY ON GLYCOLYSIS\*. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(37):32843-53.
- [436] Wang P, Wan W, Xiong S, Wang J, Zou D, Lan C, et al. HIF1 $\alpha$  regulates glioma chemosensitivity through the transformation between differentiation and dedifferentiation in various oxygen levels. *Scientific reports*. 2017;7(1):7965.
- [437] Auffinger B, Tobias AL, Han Y, Lee G, Guo D, Dey M, et al. Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell death and differentiation*. 2014;21(7):1119-31.
- [438] Bleau A-M, Hambarzumyan D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, et al. PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells. *Cell Stem Cell*. 2009;4(3):226-35.

- [439] Jeon HM, Sohn YW, Oh SY, Kim SH, Beck S, Kim S, et al. ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9\*-mediated suppression of SOX2. *Cancer research*. 2011;71(9):3410-21.
- [440] Salmaggi A, Boiardi A, Gelati M, Russo A, Calatuzzolo C, Ciusani E, 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):850-60.
- [441] Nakai E, Park K, Yawata T, Chihara T, Kumazawa A, Nakabayashi H, et al. Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma. *Cancer investigation*. 2009;27(9):901-8.
- [442] Orzan F, De Bacco F, Crisafulli G, Pellegatta S, Mussolin B, Siravegna G, et al. Genetic Evolution of Glioblastoma Stem-Like Cells From Primary to Recurrent Tumor. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2017;35(11):2218-28.
- [443] Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-21.
- [444] Barrantes-Freer A, Kim E, Bielanska J, Giese A, Mortensen LS, Schulz-Schaeffer WJ, et al. Human Glioma-Initiating Cells Show a Distinct Immature Phenotype Resembling but Not Identical to NG2 Glia. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2013;72(4):307-24.
- [445] Barrantes-Freer A, Renovanz M, Eich M, Braukmann A, Sprang B, Spirin P, 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):e0130519.
- [446] Gstraunthaler G, Lindl T. *Zell- und Gewebekultur : Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7th ed. 2013 ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2013.
- [447] Silvia Hofer LB, Judith Dierlamm, Anca-Ligia Grosu, Peter Hau, Jörg Hense, Tobias Pflugshaupt, Matthias Preusser, Martin Proescholdt, Tobias Pukrop, Elisabeth Jane Rushing, Marianne Sinn, Bernhard Wörmann. Gliome im Erwachsenenalter [Internet] onkopedia.com. Letzte Aktualisierung: März 2019. Zitiert am 24.03.2021. URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/gliome-im-erwachsenenalter/@@guideline/html/index.html#litID0EVTBI2019>.
- [448] Herbener VJ, Burster T, Goreth A, Pruss M, von Bandemer H, Baisch T, et al. Considering the Experimental use of Temozolomide in Glioblastoma Research. *Biomedicines*. 2020;8(6):151.
- [449] Herbener VJ, Burster T, Goreth A, Pruss M, von Bandemer H, Baisch T, et al. Considering the Experimental use of Temozolomide in Glioblastoma Research. *Biomedicines*. 2020;8(6).
- [450] Firma Sigma-Aldrich MK. Temozolomid [Internet] Letzte Aktualisierung: keine Angabe. Zitiert am 25.03.2021. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t2577?lang=de&region=DE.2021>.
- [451] Hu Y, Smyth GK. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *Journal of immunological methods*. 2009;347(1-2):70-8.
- [452] Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH RS. *Lexikon der Biologie: limiting dilution analysis* [Internet] Letzte Aktualisierung: keine Angabe. Zitiert am 08.04.2021. URL: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/limiting-dilution-analysis/39376.1999>.
- [453] Frisan T., Levitsky V., Masucci M. Limiting Dilution Assay. In: Wilson J.B., May G.H.W., editors. *Epstein-Barr Virus Protocols Methods in Molecular Biology™*. Vol. 174. Tototwa: Humana Press; 2001. p. 213-6.
- [454] Lang G. *Histotechnik : Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2nd ed. 2013 ed. Wien: SpringerWienNewYork; 2013.
- [455] He J, Liu Y, Zhu TS, Xie X, Costello MA, Talsma CE, et al. Glycoproteomic analysis of glioblastoma stem cell differentiation. *Journal of proteome research*. 2011;10(1):330-8.
- [456] Inc. A. Mischmodi - Adobe Photoshop Benutzerhandbuch [Internet] Zuletzt aktualisiert: 23.06.2020. Zitiert am: 14.04.2021. URL: [https://helpx.adobe.com/de/photoshop/using/blending-modes.html#blending\\_mode\\_descriptions.2020](https://helpx.adobe.com/de/photoshop/using/blending-modes.html#blending_mode_descriptions.2020).

- [457] Lakens D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. *Frontiers in Psychology*. 2013;4.
- [458] Stepanenko AA, Chekhonin VP. On the Critical Issues in Temozolomide Research in Glioblastoma: Clinically Relevant Concentrations and MGMT-independent Resistance. *Biomedicines*. 2019;7(4).
- [459] Yuan C, Gao J, Guo J, Bai L, Marshall C, Cai Z, et al. Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. *PloS one*. 2014;9(9):e107447.
- [460] Miller I, Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, et al. Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell reports*. 2018;24(5):1105-12.e5.
- [461] Shi J, Dong X, Han W, Zhou P, Liu L, Wang H, et al. Molecular characteristics of single patient-derived glioma stem-like cells from primary and recurrent glioblastoma. *Anti-cancer drugs*. 2022;33(1):e381-e8.
- [462] Catanzaro D, Milani G, Bozza A, Bernardi M, Chieragato K, Menarin M, et al. Selective cell cycle arrest in glioblastoma cell lines by quantum molecular resonance alone or in combination with temozolomide. *British journal of cancer*. 2022;127(5):824-35.
- [463] Corporation ZR. INSTRUCTION MANUAL DNA Clean & Concentrator™-5 Catalog Nos. D4003T, D4003, D4004, D4013 & D4014 [Internet] Version: 1.2.1. Zuletzt aktualisiert: keine Angabe. Zitiert am: 12.04.2021. URL: [https://files.zymoresearch.com/protocols/D4003T\\_D4003\\_D4004\\_D4013\\_D4014\\_DNA\\_Clean\\_Concentrator\\_-5\\_ver\\_1\\_2\\_1\\_LKN-SW\\_1.pdf.2021](https://files.zymoresearch.com/protocols/D4003T_D4003_D4004_D4013_D4014_DNA_Clean_Concentrator_-5_ver_1_2_1_LKN-SW_1.pdf.2021).
- [464] Technologies N. 260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers [Internet] Letzte Aktualisierung: 2017. Zitiert am: 13.04.2021. URL: [https://bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop\\_tip.pdf.2007](https://bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf.2007).
- [465] Ernst A, Hofmann S, Ahmadi R, Becker N, Korshunov A, Engel F, et al. Genomic and Expression Profiling of Glioblastoma Stem Cell–Like Spheroid Cultures Identifies Novel Tumor-Relevant Genes Associated with Survival. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(21):6541-50.
- [466] Li A, Walling J, Kotliarov Y, Center A, Steed ME, Ahn SJ, et al. Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Molecular cancer research : MCR*. 2008;6(1):21-30.
- [467] Vogel TW, Zhuang Z, Li J, Okamoto H, Furuta M, Lee YS, et al. Proteins and protein pattern differences between glioma cell lines and glioblastoma multiforme. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(10):3624-32.
- [468] Ledur PF, Onzi GR, Zong H, Lenz G. Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? *Oncotarget*. 2017;8(40):69185-97.
- [469] Ulasov IV, Nandi S, Dey M, Sonabend AM, Lesniak MS. Inhibition of Sonic hedgehog and Notch pathways enhances sensitivity of CD133(+) glioma stem cells to temozolomide therapy. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2011;17(1-2):103-12.
- [470] Schneider M, Ströbele S, Nonnenmacher L, Siegelin MD, Tepper M, Stroh S, et al. A paired comparison between glioblastoma "stem cells" and differentiated cells. *International journal of cancer*. 2016;138(7):1709-18.
- [471] Chen J, Wang T, Liu W, Qiu H, Zhang N, Chen X, et al. Extended adjuvant temozolomide in newly diagnosed glioblastoma: A single-center retrospective study. *Frontiers in oncology*. 2022;12:1000501.
- [472] Happold C, Roth P, Wick W, Schmidt N, Florea AM, Silginer M, et al. Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells. *Journal of neurochemistry*. 2012;122(2):444-55.
- [473] Adamski V, Hempelmann A, Flüh C, Lucius R, Synowitz M, Hattermann K, et al. Dormant glioblastoma cells acquire stem cell characteristics and are differentially affected by Temozolomide and AT101 treatment. *Oncotarget*. 2017;8(64):108064-78.
- [474] Kaina B, Beltzig L, Strik H. Temozolomide - Just a Radiosensitizer? *Frontiers in oncology*. 2022;12:912821.

- [475] Chalmers AJ, Ruff EM, Martindale C, Lovegrove N, Short SC. Cytotoxic effects of temozolomide and radiation are additive- and schedule-dependent. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;75(5):1511-9.
- [476] Wan F, Zhang S, Xie R, Gao B, Campos B, Herold-Mende C, et al. The utility and limitations of neurosphere assay, CD133 immunophenotyping and side population assay in glioma stem cell research. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2010;20(5):877-89.
- [477] Vengoji R, Macha MA, Nimmakayala RK, Rachagani S, Siddiqui JA, Mallya K, et al. Afatinib and Temozolomide combination inhibits tumorigenesis by targeting EGFRvIII-cMet signaling in glioblastoma cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2019;38(1):266.
- [478] Yan Y, Wang Y, Zhao P, Ma W, Hu Z, Zhang K. BMI-1 Promotes Self-Renewal of Radio- and Temozolomide (TMZ)-Resistant Breast Cancer Cells. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)*. 2017;24(12):1620-9.
- [479] hLin J, Zuo J, Cui Y, Song C, Wu X, Feng H, et al. Characterizing the molecular mechanisms of acquired temozolomide resistance in the U251 glioblastoma cell line by protein microarray. *Oncology reports*. 2018;39(5):2333-41.
- [480] Yu Z, Zhao G, Xie G, Zhao L, Chen Y, Yu H, et al. Metformin and temozolomide act synergistically to inhibit growth of glioma cells and glioma stem cells in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2015;6(32):32930-43.
- [481] Reynolds BA, Rietze RL. Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nature methods*. 2005;2(5):333-6.
- [482] Louis SA, Rietze RL, Deleyrolle L, Wagey RE, Thomas TE, Eaves AC, et al. Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem Cells*. 2008;26(4):988-96.
- [483] Harris MA, Yang H, Low BE, Mukherjee J, Guha A, Bronson RT, et al. Cancer stem cells are enriched in the side population cells in a mouse model of glioma. *Cancer research*. 2008;68(24):10051-9.
- [484] Auffinger B, Tobias AL, Han Y, Lee G, Guo D, Dey M, et al. Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death & Differentiation*. 2014;21(7):1119-31.
- [485] Deheeger M, Lesniak MS, Ahmed AU. Cellular plasticity regulated cancer stem cell niche: a possible new mechanism of chemoresistance. *Cancer cell & microenvironment*. 2014;1(5).
- [486] Zhu Y, Chen Z, Kim SN, Gan C, Ryl T, Lesjak MS, et al. Characterization of Temozolomide Resistance Using a Novel Acquired Resistance Model in Glioblastoma Cell Lines. *Cancers (Basel)*. 2022;14(9).
- [487] Lee G, Auffinger B, Guo D, Hasan T, Deheeger M, Tobias AL, et al. Dedifferentiation of Glioma Cells to Glioma Stem-like Cells By Therapeutic Stress-induced HIF Signaling in the Recurrent GBM Model. *Molecular cancer therapeutics*. 2016;15(12):3064-76.
- [488] Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, Malric L, Zentkowski D, et al. Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis*. 2014;5(11):e1543.
- [489] Kim MJ, Kim RK, Yoon CH, An S, Hwang SG, Suh Y, et al. Importance of PKC $\delta$  signaling in fractionated-radiation-induced expansion of glioma-initiating cells and resistance to cancer treatment. *Journal of cell science*. 2011;124(Pt 18):3084-94.
- [490] Kim R-K, Suh Y, Cui Y-H, Hwang E, Lim E-J, Yoo K-C, et al. Fractionated radiation-induced nitric oxide promotes expansion of glioma stem-like cells. *Cancer Science*. 2013;104(9):1172-7.
- [491] Gao X, McDonald JT, Hlatky L, Enderling H. Acute and fractionated irradiation differentially modulate glioma stem cell division kinetics. *Cancer research*. 2013;73(5):1481-90.
- [492] Gerstmeier J, Possmayer AL, Bozkurt S, Hoffmann ME, Dikic I, Herold-Mende C, et al. Calcitriol Promotes Differentiation of Glioma Stem-Like Cells and Increases Their Susceptibility to Temozolomide. *Cancers (Basel)*. 2021;13(14).

- [493] Kološa K, Motaln H, Herold-Mende C, Koršič M, Lah TT. Paracrine effects of mesenchymal stem cells induce senescence and differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Cell transplantation*. 2015;24(4):631-44.
- [494] Li H, Liu Y, Jiao Y, Guo A, Xu X, Qu X, et al. Resveratrol sensitizes glioblastoma-initiating cells to temozolomide by inducing cell apoptosis and promoting differentiation. *Oncology reports*. 2016;35(1):343-51.
- [495] Megías J, Martínez A, San-Miguel T, Gil-Benso R, Muñoz-Hidalgo L, Albert-Bellver D, et al. Pam(3)CSK(4), a TLR2 ligand, induces differentiation of glioblastoma stem cells and confers susceptibility to temozolomide. *Investigational new drugs*. 2020;38(2):299-310.
- [496] Zhu TZ, Li XM, Luo LH, Song ZQ, Gao X, Li ZQ, et al.  $\beta$ -elemene inhibits stemness, promotes differentiation and impairs chemoresistance to temozolomide in glioblastoma stem-like cells. *International journal of oncology*. 2014;45(2):699-709.
- [497] Campos B, Wan F, Farhadi M, Ernst A, Zeppernick F, Tagscherer KE, et al. Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(10):2715-28.
- [498] Villalva C, Cortes U, Wager M, Tourani JM, Rivet P, Marquant C, et al. O6-Methylguanine-methyltransferase (MGMT) promoter methylation status in glioma stem-like cells is correlated to temozolomide sensitivity under differentiation-promoting conditions. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(6):6983-94.
- [499] Garthe A, Behr J, Kempermann G. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PloS one*. 2009;4(5):e5464.
- [500] Hussaini S, Jang M. Effect of temozolomide on neurogenesis and anxiety in the adult mouse brain. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(15\_suppl):e23082-e.
- [501] Niibori Y, Yu TS, Epp JR, Akers KG, Josselyn SA, Frankland PW. Suppression of adult neurogenesis impairs population coding of similar contexts in hippocampal CA3 region. *Nature communications*. 2012;3:1253.
- [502] Nokia MS, Anderson ML, Shors TJ. Chemotherapy disrupts learning, neurogenesis and theta activity in the adult brain. *The European journal of neuroscience*. 2012;36(11):3521-30.
- [503] Wang L, Long L, Wang W, Liang Z. Resveratrol, a potential radiation sensitizer for glioma stem cells both in vitro and in vivo. *Journal of pharmacological sciences*. 2015;129(4):216-25.
- [504] Zhuang W, Li B, Long L, Chen L, Huang Q, Liang Z. Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity. *International journal of cancer*. 2011;129(11):2720-31.
- [505] Zhuang W, Long L, Zheng B, Ji W, Yang N, Zhang Q, et al. Curcumin promotes differentiation of glioma-initiating cells by inducing autophagy. *Cancer Science*. 2012;103(4):684-90.
- [506] Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 2011;54:10-4.
- [507] Matias D, Balça-Silva J, Dubois LG, Pontes B, Ferrer VP, Rosário L, et al. Dual treatment with shikonin and temozolomide reduces glioblastoma tumor growth, migration and glial-to-mesenchymal transition. *Cellular oncology (Dordrecht)*. 2017;40(3):247-61.
- [508] Toren A, Pismenyuk T, Yalon M, Freedman S, Simon AJ, Fisher T, et al. Zinc enhances temozolomide cytotoxicity in glioblastoma multiforme model systems. *Oncotarget*. 2016;7(46):74860-71.
- [509] Tiek DM, Rone JD, Graham GT, Pannkuk EL, Haddad BR, Riggins RB. Alterations in Cell Motility, Proliferation, and Metabolism in Novel Models of Acquired Temozolomide Resistant Glioblastoma. *Scientific reports*. 2018;8(1):7222.
- [510] Shankar A, Kumar S, Iskander AS, Varma NR, Janic B, deCarvalho A, et al. Subcurative radiation significantly increases cell proliferation, invasion, and migration of primary glioblastoma multiforme in vivo. *Chinese journal of cancer*. 2014;33(3):148-58.
- [511] Tamura K, Aoyagi M, Ando N, Ogishima T, Wakimoto H, Yamamoto M, et al. Expansion of CD133-positive glioma cells in recurrent de novo glioblastomas after radiotherapy and chemotherapy. *Journal of neurosurgery*. 2013;119(5):1145-55.

- [512] Alexiou GA, Vartholomatos E, K IT, Peponi E, Markopoulos G, V AP, et al. Combination treatment for glioblastoma with temozolomide, DFMO and radiation. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2019;24(1):397-404.
- [513] Fehlaue F, Muench M, Rades D, Stalpers LJ, Leenstra S, van der Valk P, et al. Effects of irradiation and cisplatin on human glioma spheroids: inhibition of cell proliferation and cell migration. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2005;131(11):723-32.
- [514] Hao J, Godley A, Shoemake JD, Han Z, Magnelli A, Yu JS. The effects of extra high dose rate irradiation on glioma stem-like cells. *PloS one*. 2018;13(8):e0202533.
- [515] Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2004;59(4):928-42.
- [516] Liu J, Liu Y, Xie T, Luo L, Xu C, Gao Q, et al. Radiation-induced G2/M arrest rarely occurred in glioblastoma stem-like cells. *International journal of radiation biology*. 2018;94(4):394-402.
- [517] Tachon G, Cortes U, Guichet PO, Rivet P, Balbous A, Masliantsev K, et al. Cell Cycle Changes after Glioblastoma Stem Cell Irradiation: The Major Role of RAD51. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(10).
- [518] Herst PM, Broadley KW, Harper JL, McConnell MJ. Pharmacological concentrations of ascorbate radiosensitize glioblastoma multiforme primary cells by increasing oxidative DNA damage and inhibiting G2/M arrest. *Free radical biology & medicine*. 2012;52(8):1486-93.
- [519] Yao KC, Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, Kondo S, Germano IM. Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy. *Journal of neurosurgery*. 2003;98(2):378-84.
- [520] Belter A, Barciszewski J, Barciszewska AM. Revealing the epigenetic effect of temozolomide on glioblastoma cell lines in therapeutic conditions. *PloS one*. 2020;15(2):e0229534.
- [521] Kőteles GJ. Radiation effects on cell membranes. *Radiation and environmental biophysics*. 1982;21(1):1-18.
- [522] Mishra KP. Cell membrane oxidative damage induced by gamma-radiation and apoptotic sensitivity. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*. 2004;23(1):61-6.
- [523] Patrick G. 4 - The effects of radiation on cell membranes. In: Jamieson GA, Robinson DM, editors. *Responses of Plasma Membranes: Butterworth-Heinemann*; 1977. p. 72-104.
- [524] de Abreu Costa L, Henrique Fernandes Ottoni M, Dos Santos MG, Meireles AB, Gomes de Almeida V, de Fátima Pereira W, et al. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2017;22(11).
- [525] Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014;28(3):1317-30.
- [526] Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology of disease*. 2009;34(1):1-10.
- [527] Oz ES, Aydemir E, Fişkin K. DMSO exhibits similar cytotoxicity effects to thalidomide in mouse breast cancer cells. *Oncology letters*. 2012;3(4):927-9.
- [528] Zhang C, Deng Y, Dai H, Zhou W, Tian J, Bing G, et al. Effects of dimethyl sulfoxide on the morphology and viability of primary cultured neurons and astrocytes. *Brain Res Bull*. 2017;128:34-9.
- [529] Pal R, Mamidi MK, Das AK, Bhonde R. Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells. *Archives of toxicology*. 2012;86(4):651-61.
- [530] Preisler HD, Giladi M. Differentiation of erythroleukemic cells in vitro: irreversible induction by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Journal of cellular physiology*. 1975;85(3):537-46.
- [531] Czysz K, Minger S, Thomas N. DMSO efficiently down regulates pluripotency genes in human embryonic stem cells during definitive endoderm derivation and increases the proficiency of hepatic differentiation. *PloS one*. 2015;10(2):e0117689.

- [532] Li J, Narayanan C, Bian J, Sambo D, Brickler T, Zhang W, et al. A transient DMSO treatment increases the differentiation potential of human pluripotent stem cells through the Rb family. *PloS one*. 2018;13(12):e0208110.
- [533] Geder L, Kreider JW, Towfighi J, Page RB, Ladda RL, Brennan RW, et al. Effect of differentiation inducers on growth characteristics of human glioma cell lines. *Journal of neuro-oncology*. 1987;5(3):251-71.
- [534] Thaler R, Spitzer S, Karlic H, Klaushofer K, Varga F. DMSO is a strong inducer of DNA hydroxymethylation in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Epigenetics*. 2012;7(6):635-51.
- [535] Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, Clayton O, Nudischer R, Boerno S, et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Scientific reports*. 2019;9(1):4641.

## 9 Anhang

### Anhang 1

Anhangstabelle 1: Input-Control-DNA (200 Zyklen) - Reinheitsratio, Konzentration und Gesamtmenge/ Lysatvolumen

Zelllinie	Reinheitsratio		Konzentration [ng/µl]	Gesamtmenge / Lysatvolumen [ng/µl]
	260/230	260/280		
#1051	2,29	1,87	1387,5	138,75
#1051_TMZ	2,30	1,86	980,4	98,04
#1051_DMSO	2,32	1,87	1296,0	129,60
#1051_IR	2,26	1,86	680,9	68,09
#1051_IR_TMZ	2,27	1,86	671,6	67,16
#1051_IR_DMSO	2,27	1,86	666,0	66,60

Anhangstabelle 2: FAIRE-DNA (200 Zyklen) - Reinheitsratio, Konzentration und Gesamtmenge/ Lysatvolumen

Zelllinie	Reinheitsratio		Konzentration [ng/µl]	Gesamtmenge / Lysatvolumen [ng/µl]
	260/230	260/280		
#1051	2,19	1,88	106,2	3,54
#1051_TMZ	2,01	1,87	102,0	3,40
#1051_DMSO	2,11	1,88	158,6	5,29
#1051_IR	2,64	1,91	67,6	2,25
#1051_IR_TMZ	2,19	1,90	91,3	3,04
#1051_IR_DMSO	2,18	1,90	93,8	3,13

### 10 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meine Dankbarkeit gegenüber jeder und jedem ausdrücken, die mir den Weg zur Promotion durch ihre Begleitung und Anleitung ermöglichten. Ohne ihre Hilfe und Motivation wäre diese Arbeit nicht fertigzustellen gewesen.

Zunächst möchte ich meiner Co-Betreuerin Frau PD Dr. Kim meinen tiefen Dank aussprechen, die mich für dieses Projekt begeistert hat und unter ihrer Leitung ich die experimentelle Forschung lieben lernen durfte. Sie schenkte mir ihr Vertrauen und die Chance, in einem sehr gefragten Forschungsgebiet mitzuwirken. Ich danke ihr für ihre Supervision, ihre permanente Unterstützung und für den stets guten Rat zur Projektplanung und zur Vereinbarung von Forschung und Studium. Insbesondere möchte ich ihr für die engagierte Betreuung während der Anfertigung der Dissertation danken, die zusammen mit ihren zahlreichen geschätzten Kommentaren einen maßgeblichen Beitrag zur Qualität meiner Arbeit geleistet hat.

Meinen tiefen Dank spreche ich ebenso Prof. Dr. Sven Kantelhardt aus, der sich uneigennützig zur Übernahme der Betreuung bereit erklärt hat; hierfür werde ich ihm immer dankbar sein. Ich danke ihm ferner für die Erstkorrektur und wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation.

Besondere Anerkennung gilt dem Laborteam der AG Kim, unter denen Bettina, Sina und Nancy hervorzuheben sind. Sie instruierten mich in die Praxis guter experimenteller Arbeit und ebneten meinen Einstieg als absoluter Anfänger in die experimentelle Forschung. Sie zeigten mir, dass Forschung mit einem guten Team eine große Freude bereiten kann.

Ich danke zudem meinen damaligen studentischen Kolleginnen Alina und Fitriasari, von denen ich mir eine gute wissenschaftliche Praxis anschauen und durch ihre Hilfe anspruchsvolle Methoden mir aneignen konnte. Ihre Unterstützung während meiner Promotion erwies sich als von unschätzbarem Wert.

Ich danke Darius, der mir mit gutem Rat zur Seite stand und auf dessen erstklassige Forschung ich aufbauen und von der ich profitieren konnte. Die Begutachtung meiner Dissertation durch ihn werde ich stets dankbar in meiner Erinnerung bleiben. Er verkörpert für mich, was es heißt, ein exzellenter Forscher und Kliniker zu sein.

Als Schlusswort danke ich aus tiefstem Herzen meiner gesamten wundervollen Familie, die seit jeher emotionaler und ideeller Anker für mich ist. Ihre beständige Unterstützung und Motivation haben meine Promotion erst ermöglicht. Ich danke meiner liebevollen Ehefrau, glücklich sie an meiner Seite zu wissen, deren Rückhalt und Glaube an mich eine unverzichtbare Stütze für mich waren und sind. Mein größter und unendlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich zu dem Menschen formten, der ich bin, die meinen gesamten Lebensweg ebneten und die Tür zu jedem Traum und jeder Chance waren und sind.