

**Aus der Abteilung Nuklearmedizin
(Prof. Dr. med. J. Meller)
im Zentrum Radiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

Vergleich der Strahlenwirkung auf Tumorzellkulturen und
Tumorstammzellkulturen aus unterschiedlichen Glioblastomen

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Manuela Oettler, geb. Strauß

aus
Löbau

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik-Köpp

II. Berichterstatter: PD Dr. Florian Stockhammer

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Rainer Mausberger

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	5
2. Einleitung.....	7
3. Material und Methoden	20
3.1. Materialien	20
3.2. Zellkultivierung.....	25
3.2.1. Standardzellkulturen (Zelllinie G112, U251, U87)	25
3.2.2. Stammzellkulturen (G112 Sp, U251 Sp, U87 Sp)	26
3.3. Behandlung der Zellkulturen	26
3.3.1. Bestrahlung mit 6 MeV Röntgenstrahlung	26
3.3.2. Inkubation mit N-Acetylcystein und Bestrahlung.....	27
3.3.3. Behandlung der Zellen mit Natriumselenit	27
3.4. Morphologische Bestimmung der Apoptose-Rate und Mehrkernigkeit	28
3.4.1. Fixierung der Standardzellen.....	28
3.4.2. Fixierung der Stammzellen.....	28
3.4.3. Färbung und Auswertung der fixierten Zellen	29
3.4.4. Morphologische Apoptose-Auswertung	29
3.4.5. Morphologische Auswertung der Mehrkernigkeit	30
3.4.6. Statistische Auswertung	30
4. Ergebnisse.....	31
4.1. Strahleninduzierte Apoptoserate in Standardzellkulturen.....	31
4.2. Strahleninduzierte Apoptoserate in Standardzellkulturen nach Inkubation mit N-Acetylcystein	36
4.3. Apoptoserate in Standardzellkulturen nach Behandlung mit Natriumselenit im Vergleich mit Bestrahlung	39
4.4. Strahleninduzierte Apoptoserate in Stammzellkulturen	45
4.5. Vergleich der strahleninduzierten Apoptoserate in Standardzellkulturen und Stammzellkulturen	48
4.6. Morphologische Bestimmung von Mehrkernigkeit.....	51
4.6.1. Strahleninduzierte Mehrkernigkeit in Standardzellkulturen	51
4.6.2. Strahleninduzierte Mehrkernigkeit in Standardzellkulturen nach Inkubation mit N-Acetylcystein.....	54
4.6.3. Strahleninduzierte Mehrkernigkeit in Stammzellkulturen.....	57
4.6.4. Vergleich der strahleninduzierten Mehrkernigkeit in Standardzellkulturen und in Stammzellkulturen	59
5. Diskussion	63

6. Zusammenfassung	72
7. Literaturverzeichnis.....	73
Danksagung	80
Lebenslauf.....	81

1. Abkürzungsverzeichnis

A.bidest	Destilliertes Wasser
AI	Apoptoseindex
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	Analysis of Variance between groups
AR	Apoptoserate
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D	Dosis
d	Tag(e)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
FCS	Fetal bovine Serum
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
GFL	Gesellschaft für Labortechnik
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GPX	Glutathion-Peroxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSeH	Selenopersulfid
GSSeSG	Selenodiglutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
Gy	Gray, Einheit der Energiedosis
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ Se	Selenwasserstoff, Hydrogenselenid

HSD	Honestly Significant Difference
inch	Zoll
KCl	Kaliumchlorid
KG	Kommanditgesellschaft
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
MEM	Minimum essential medium
MeV	Megaelektronenvolt
MGMT	O_6 -Methylguanin–DNA-Methyltransferase
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mm^2	Quadratmillimeter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Hyperoxid-Anion (Superoxid-Anion-Radikal)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
p.o.	per os
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotation pro Minute
Se^0	elementares Selen
SeO_3^{2-}	Selenit
SOD	Superoxiddismutase
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TP53	Protein-p53-Gen
UV	Ultraviolettstrahlung
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

2. Einleitung

Krebserkrankungen sind in Deutschland nach den Herz-/Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache des Menschen. Im Jahr 2008 starben 211.591 Menschen an bösartigen Neubildungen, 54 % davon Männer und 46 % Frauen (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2011). Obwohl ein besseres Verständnis der Entstehungsmechanismen verschiedener Krebserkrankungen die Therapieerfolge in der Vergangenheit deutlich verbessern konnte, ist das Langzeitüberleben der betroffenen Patienten noch immer nicht zufriedenstellend.

Die Inzidenz aller Hirntumore wird mit 8-15 pro 100.000 Einwohner pro Jahr geschätzt (Poeck und Hacke 2006). Das entspricht etwa einem Anteil von 5-10 % an allen Neoplasien des Menschen. Im Jahr 2009 erkrankten in Deutschland 5.597 Menschen an einer bösartigen Neubildung des Gehirns (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2009). Circa 2/3 der intrakraniellen Tumoren entstehen aus hirneigenen Geweben, die übrigen 1/3 aus Metastasen anderer Tumore (Malignes Melanom, Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom), Gefäßmissbildungen oder Tumoren des Schädelknochens. Männer sind häufiger durch maligne Hirntumore oder Hirnmetastasen betroffen als Frauen (Poeck und Hacke 2006). Bei Kindern sind Hirntumore nach Leukämien die zweithäufigste Krebserkrankung (Poeck und Hacke 2006).

Primäre Hirntumore entwickeln sich aus Neuroepithel (= Gliome), Ganglienzellen, Meningen, Nervenscheiden sowie aus der Hypophyse oder aus ektopen Geweben. Unter den hirneigenen Tumoren kommen die Gliome am häufigsten vor, gefolgt von den Meningeomen. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifiziert alle Hirntumore anhand der Histologie in 4 Malignitätsgrade (WHO Grad I-IV). Mittels dieser Klassifikation lassen sich die Dignität sowie die wahrscheinliche Überlebenszeit abschätzen. Tumoren mit dem WHO-Grad IV haben dabei die schlechteste Prognose.

Das Glioblastom (Synonym: Astrozytom Grad IV) ist ein hochmaligner, astrozytärer Tumor, der von neuroepithelialen Strukturen gebildet wird. Er gehört zu den häufigsten Gliomen (Inzidenz > 50%) des Menschen. Der Altersgipfel betroffener Patienten liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr. Bei Erwachsenen sind maligne Gliome überwiegend in den Großhirnhemisphären lokalisiert. Dabei ist keine Hirnhälfte bevorzugt betroffen. Die infiltrierend wachsenden Tumore sind meist subkortikal gelegen, können aber auch die Rinde durchsetzen (Poeck und Hacke 2006). Die Klassifizierung als Grad IV nach WHO zeigt, dass das Glioblastom die schlechteste Prognose aller Gliome hat. Ursächlich für die schlechten Heilungschancen und die kurze Überlebenszeit der betroffenen Patienten sind das rasche Wachstum

der Tumore, die vermehrte Bildung von Gefäßen und Anastomosen sowie die starke Neigung zu perifokalen Ödemen und zu lokalen Rezidiven. Patienten mit einem Glioblastom entwickeln sehr schnell einen hohen Hirndruck bedingt durch das schnelle Tumorstadium sowie starke Massenverschiebungen, welche meist früh nach der Diagnosestellung zum Tod durch Einklemmung führen. Die mittlere Überlebenszeit nach Ausschöpfung aller Therapieoptionen liegt aktuell zwischen 6 und 36 Monaten (Hottinger et al. 2009).

Die aktuelle Therapie des Glioblastoms besteht aus den drei Säulen Operation, Bestrahlung und Chemotherapie. Ziel der Bestrahlung und Behandlung mit lokal oder systemisch verabreichten Chemotherapeutika ist die Zerstörung der Tumorzellen durch Einleitung von Apoptose, mitotischen Zelltod und Nekrose.

Die möglichst vollständige operative Tumorentfernung ist nur bei einem geringen Teil der Patienten möglich, da die schnelle lokale Ausbreitung des Tumors im gesamten Zentralnervensystem meist schon bei Diagnosestellung eine radikale Operation unmöglich macht. Ist jedoch eine operative Entfernung des Tumors möglich, dann ist das Ziel die vollständige makroskopische Entfernung des Tumorgewebes, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Nutzen-Risiko-Abwägung zu legen ist. Im Anschluss an die Operation bzw. auch bei ausbleibender operativer Entfernung des Tumors ist die Standardtherapie eine Bestrahlung mit Röntgenstrahlung in 1,8 Gy bis 2 Gy-Dosisfraktionen, bis zu einer Gesamtdosis von 54 bis 60 Gy (Laperriere et al. 2002). Die Radiotherapie verlängert die mediane Überlebenszeit der betroffenen Patienten um nachweislich 6 Monate (Laperriere et al. 2002). Zur Verkürzung der Therapiedauer bei älteren Patienten oder bei Patienten mit sehr schlechter Prognose, kann eine akzelerierte Strahlentherapie, etwa mit 30 bis 45 Gy in 3 Gy-Fraktionen erfolgen (Roa et al. 2004).

Parallel zur Bestrahlung sollte eine systemische Chemotherapie mit Temozolomid für 6 Monate (150-200 mg/m² p.o.) durchgeführt werden (Gerstner et al. 2009). Temozolomid ist ein alkylierender Wirkstoff, welcher im Organismus ein reaktives Methyldiazonium-Ion freisetzt, das zur Schädigung der DNA durch Methylierung führt (Lüllmann et al. 2006). Von der Anwendung des Chemotherapeutikums profitieren vor allem Patienten mit einem methylierten O₆-Methylguanin–DNA-Methyltransferase-Gen (MGMT-Gen) (Hegi et al. 2005). MGMT ist ein DNA-Reparaturenzym, welches die durch Temozolomid induzierten DNA-Alkylschäden repariert. Die Expression des Enzyms wird durch die Methylierung der Promotorregion negativ reguliert (Hegi et al. 2005). Eine Therapie mit Temozolomid verlängerte die mediane Überlebenszeit von 12,1 auf 14,6 Monate und erhöhte die 2-Jahres-Überlebensrate von 10% auf 26% nach einer Studie von Stupp et al. (2005a). In einer anderen Studie resultierte diese

Radiochemotherapie in einer medianen Überlebenszeit von 13,6 Monaten und einer 2-Jahres-Überlebensrate von 8% (Niewald et al. 2011).

Trotz jahrelanger Forschung an umfangreichen Therapiemaßnahmen konnte bis heute das Überleben der Patienten mit einem Glioblastom bezogen auf die 2-Jahres-Überlebensrate von maximal 26% nicht wesentlich verlängert werden. Einige Gründe hierfür sind verschiedene Resistenzmechanismen der Tumorzellen gegen die Chemo- oder Strahlentherapie.

Als Chemoresistenz bezeichnet man die Fähigkeit eines Tumors, gegenüber Chemotherapeutika unempfindlich zu sein. Dies kann viele Ursachen haben. Zum einen können viele Chemotherapeutika die Zielorgane mit dem zu behandelnden Tumor nicht erreichen, da aufgrund natürlicher Barrieren die Diffusion behindert ist - beispielsweise infolge einer verminderten Liquorgängigkeit verschiedenster Therapeutika. Weiterhin sind in der Tumorbehandlung mittels Chemotherapeutika spezifische zelluläre Resistenzmechanismen infolge von Mutationen und Selektion problematisch. Hierzu zählen unter anderem eine verstärkte Reparatur von Chemotherapeutika-induzierten DNA-Schäden, ein vermehrter Auswärtstransport der Substanz aus der Zelle (etwa über das MDR1-Protein) bzw. eine verringerte Aufnahme in die Zelle, eine Hemmung der Bindung des Chemotherapeutikums durch Veränderung der Zielstruktur sowie eine Überproduktion des Zielproteins. Außerdem kann es unter einer Therapie mit einem Chemotherapeutikum zu einer verstärkten Inaktivierung des Medikaments durch tumorspezifische Enzyme kommen (Abbildung 1).

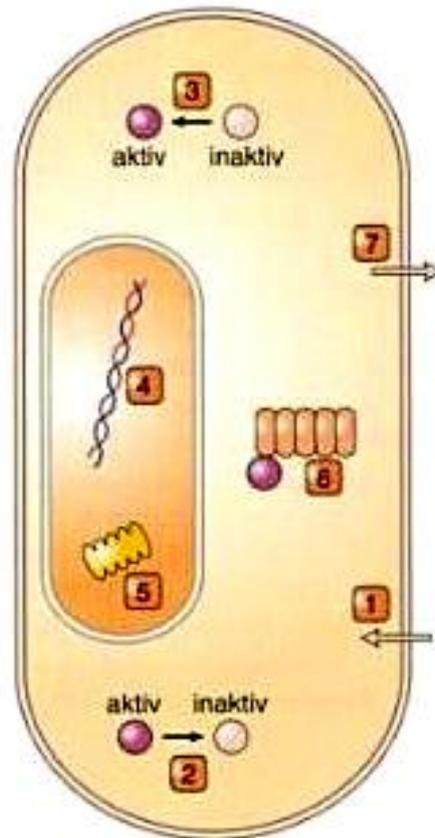


Abbildung 1 Tumor-Resistenzmechanismen gegen Chemotherapeutika (Aktroies et al. 2009, Seite 927).

- (1) verminderte Aufnahme des Chemotherapeutikums
- (2) verstärkte Inaktivierung des Chemotherapeutikums
- (3) verminderte Aktivierung des Chemotherapeutikums
- (4) verstärkte Reparatur von DNA-Schäden
- (5) Hemmung der Bindung des Chemotherapeutikums am Substrat durch veränderte Zielstruktur
- (6) Überexpression des Zielsubstrats
- (7) verstärkter Auswärtstransport des Chemotherapeutikums aus der Zelle.

Neben der Resistenz von Tumorzellen gegenüber einer Behandlung mit Chemotherapeutika spielt auch die Radioresistenz eine große Rolle in der Tumortherapie. Als Radioresistenz wird das zu geringe bzw. das Nicht-Ansprechen eines Tumors auf die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung bezeichnet. Die Resistenzmechanismen, mit welchen die Tumorzellen die Schädigung durch Bestrahlung reparieren oder tolerieren, sind sehr komplex und zum Teil noch nicht ganz verstanden. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine lokale Hypoxie im Tumorgewebe eine vermehrte Produktion von antioxidativen Enzymen bzw. Glutathion-Peroxidase und Glutathion-Reduktase sowie eine Überproduktion von Antioxidantien, vor allem Thiolen, ursächlich für die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Bestrahlung sein

können. Eine fehlerhafte TP53- und Bcl-2-Aktivität ebenso wie eine exzellente DNA-Schäden-Reparatur wurden ebenfalls als Ursachen der Therapieresistenzen beschrieben (Mukherjee et al. 2009).

Darüber hinaus wird seit vielen Jahren diskutiert, ob das Wachstum, die Therapieresistenz sowie das wiederholte Auftreten von Rezidiven abhängig von einer kleinen Zellpopulation mit Stammzeleigenschaften sind (Reya et al. 2001, Jamal et al. 2012). Die als Tumorstammzellen isolierten Zellen haben, wie auch die menschlichen embryonalen Stammzellen, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und das Vermögen zu allen im Tumor vorkommenden Zelltypen auszureifen. Charakteristisch für diese Zellen ist das Vorhandensein von spezifischen Oberflächenmarkern (z. B. CD133), Pumpen und Enzymen. Die bisherigen Forschungsergebnisse besagen, dass Tumorstammzellen von Gewebestammzellen oder Vorläuferzellen abstammen können (Adams und Strasser 2008).

Die Wirkung von ionisierender Strahlung beruht auf der Absorption der Strahlenenergie im bestrahlten Gewebe. Diese führt zu Ionisationen (und Anregungen) in den betroffenen Molekülen. Man unterscheidet eine direkte und eine indirekte Strahlenwirkung. Als direkte Strahlenwirkung wird die Ionisation von Biomolekülen bezeichnet, die zu verschiedenen Strukturveränderungen der betroffenen Moleküle führt. Als indirekte Strahlenwirkung wird dagegen die Schädigung der Biomoleküle durch reaktive oxidative Spezies ROS (freie Radikale, *reactive oxygen species*), welche ihrerseits durch Wasser-Radiolyse entstanden sind, bezeichnet. Der Wasser-Radiolyse folgen weitere chemische Reaktionen zwischen den entstandenen ROS-Molekülen und Sauerstoff. Dabei kommt es zur Bildung von Spaltprodukten und Radikalen, wie etwa Wasserstoffperoxid. Die entstehenden Moleküle sind meist nur für kurze Zeit in der Zelle vorhanden, sie sind aber sehr reaktiv. Sie erhöhen den oxidativen Stress in der Zelle, denn durch die Zunahme der zellulären ROS kann die zelluläre antioxidative Abwehr nicht mehr alle ROS unschädlich machen.

Oxidativer Stress ist ein biochemischer Vorgang, der durch ein Ungleichgewicht zwischen einer hohen Anzahl an toxisch reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS, *reactive oxygen species*) und der antioxidativen Abwehrmechanismen einer Zelle charakterisiert ist. ROS entstehen im Rahmen von natürlichen zellulären Stoffwechselfvorgängen (Oxidations-Reduktions-Reaktionen), etwa der mitochondriellen Elektronentransportkette zur Energiegewinnung, aber auch durch ionisierende Strahlung. Zu den schädlichen Formen des Sauerstoffs zählen beispielsweise das Superoxid-Anion-Radikal, Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal. ROS interagieren mit allen zellulären Molekülen, Lipiden, Proteinen, RNA und DNA.

Zelluläre Abwehrmechanismen schützen den Organismus im begrenzten Ausmaß vor oxidativen Schäden, indem sie die reaktiven Sauerstoffverbindungen durch Bindung abfangen und somit unschädlich machen. Die Oxidation von antioxidativen Enzymen führt zur verminderten Fähigkeit der Zelle, oxidativen Stress zu minimieren. Ein verminderter zelleigener Schutz sowie eine übermäßige ROS-Produktion können aufgrund der massiven Schädigung von Zellbestandteilen zum Tod der Zelle führen.

In Krebszellen wird eine hohe Anzahl an ROS produziert. Ursache dafür ist unter anderem der enorme Energiebedarf der malignen Zellen. Dieser führt zu einer hohen mitochondrialen Aktivität und somit zur vermehrten Bildung von ROS (Pelicano et al. 2004). Im Vergleich zu gesunden Zellen können Krebszellen also einen höheren Grad an oxidativem Stress tolerieren. Jedoch schädigt ein zu hohes Level an oxidativem Stress auch maligne Zellen (Brown und Bicknell 2001). Dieser Aspekt bildet einen möglichen Angriffspunkt in der Therapie von Krebserkrankungen, da sowohl Chemotherapeutika als auch Bestrahlung zur vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen führen (Conklin 2004). Die Menge der gebildeten ROS ist bei jedem Chemotherapeutikum sowie bei Bestrahlung mit Röntgenstrahlung unterschiedlich. Sie ist vom jeweiligen Zelltyp und vom genetischen Profil der Zelle abhängig.

Die wohl schwerwiegendste Schädigung einer Zelle durch Bestrahlung entsteht an der DNA (Herrmann et al. 2006). Das DNA-Molekül besteht aus miteinander verbundenen, komplementären Polynukleotidketten. Sowohl die direkte als auch die indirekte Wirkung der ionisierenden Strahlung kann zu Schädigungen der DNA führen, etwa zu einem Bruch von einer oder beider Polynukleotidketten. DNA-Doppelstrangbrüche entstehen zu 30-40 % durch direkte Ionisationen und zu 60-70% durch indirekte ROS-Wirkung (Herrmann et al. 2006). Nicht-reparierte Doppelstrangbrüche beeinflussen sowohl die DNA-Replikation als auch die Transkription und somit auch die Synthese von Proteinen.

Eine Reparatur von DNA-Schäden ist in einer normalen Zelle bis zu einem begrenzten Maße gut möglich. Sind die Schäden jedoch zu umfangreich oder erfolgt die Reparatur nicht vollständig bzw. nicht fehlerfrei, kommt es an verschiedenen Kontrollpunkten des Zellzyklus zur Einleitung von Apoptose. Ebenso führt eine zu lange Reparaturdauer zum Zelltod. Im Folgenden ist das Wachstum bzw. die Erneuerung des betroffenen Gewebes beeinflusst.

Forschungsarbeiten der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass Glioblastomzellen verschiedenste Resistenzmechanismen zeigen, die sie vor Strahlung schützen, etwa eine verbesserte Reparatur von DNA-Schäden. So wurde berichtet, dass Glioblastomzellen häufig

ein mutiertes Gen für den Epithelialen-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFRv) besitzen. Dieser fördert die DNA-PK-Aktivität (DNA-abhängige Proteinkinase) und beeinflusst somit die Reparatur von Doppelstrangbrüchen positiv (Mukherjee et al. 2009). Die Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden führt zu einem besseren Überleben der Tumorzellen. Infolgedessen kommt es zum weiteren Tumorwachstum und demzufolge zu einer Verschlechterung der Prognose für den Patienten (Huang und Ingber 2000). Bekannt ist von Glioblastomzellen außerdem eine Veränderung des TP53-Gens. TP53 ist in etwa 40 % der Glioblastomen mutiert (Frankel et al. 1992). Es führt vor allem nach strahleninduzierter Schädigung einer Zelle zur Einleitung von Apoptose. Die Aktivierung der Apoptose durch P53 ist aufgrund der Enzymveränderung in vielen Glioblastomzellen nicht bzw. nur noch im geringen Maße vorhanden (Shu et al. 1998).

Verschiedene Arbeitsgruppen beobachteten darüber hinaus, dass die Strahlenresistenz von Glioblastomen vor allem mit dem Nachweis von Tumorstammzellen assoziiert ist. Nach der Bestrahlung von Tumorstandardkulturen überlebte nur eine kleine Gruppe von Zellen mit einer spezifischen Morphologie und es konnte gezeigt werden, dass genau diese Zellen Träger von stammzelltypischen Oberflächenmarkern (CD133, CD117, CD71 und CD45) sind, Stammzeleigenschaften besitzen und zu einer erneuten Tumorgenerierung führen können (Kang und Kang 2007).

Im Jahre 2004 isolierte die Arbeitsgruppe um Yuan et al. als erstes Forschungsteam Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften aus Glioblastomen. Diese wuchsen in sogenannten Neurosphären (= kugelartige Zusammenlagerungen von Zellen) und zeigten Eigenschaften von embryonalen Stammzellen einschließlich der Selbsterneuerung, Differenzierung und Ausreifung zu speziellen, im Glioblastom vorkommenden Tochterzellen (Yuan et al. 2004). Die Arbeitsgruppe zeigte zudem, dass sich die isolierten Zellen von normalen neuronalen Sphären unterscheiden und dass nur diese Zellen nach in-vivo-Implantation neue Tumore bilden konnten. Sie zeigen außerdem eine verlängerte Zellzyklusdauer und eine verbesserte Aktivierung von basalen Zellzyklus-Kontrollpunkt-Proteinen (Ropolo et al. 2009).

Umstritten ist, ob Tumorstammzellen eine erhöhte DNA-Reparaturkapazität besitzen und damit vermehrt DNA-Schäden beheben können. Verschiedenen Autoren berichteten, dass die Tumorstammzellen vor allem gegen Bestrahlung resistent sind (Rich und Bao 2007). Die konventionellen Therapien zerstören zwar die „normalen“ Tumorzellen, die Tumorstammzellen jedoch bleiben von der Therapie weitestgehend unbeeinflusst und überleben. Nach Beendigung der Therapie führt dies zur schnellen Bildung eines Tumor-Rezidivs (Abbildung 2).

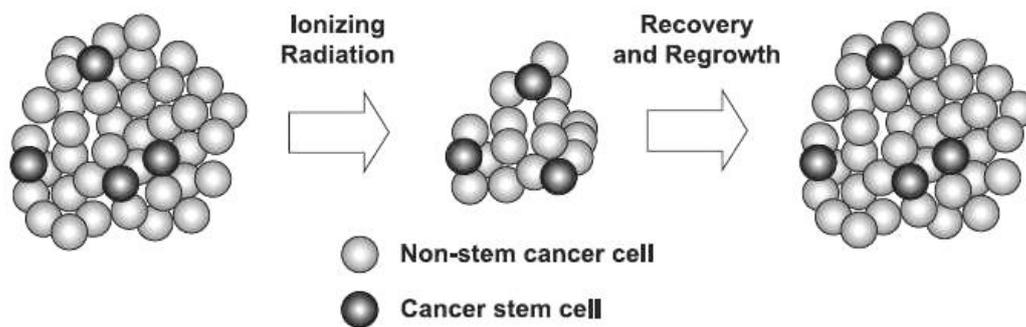


Abbildung 2 Modell der Tumorresistenz nach Therapie durch Bestrahlung (Rich JN 2007, Seite 8982).

Durch Bestrahlung sterben die Nicht-Stamm-Zellen (non-stem cancer cell) des Tumors ab. Die Tumor-Stammzellen (cancer stem cell) bleiben erhalten und führen in der Folge zum frühen Auftreten eines Rezidivs.

Alle Formen des Zelltodes können durch ROS oder Bestrahlung induziert werden. Der Zelltod kann hauptsächlich durch Apoptose, durch mitotische Katastrophe (mitotischen Zelltod), durch Autophagie und durch Nekrose erfolgen.

Apoptose, auch „programmierter Zelltod“ genannt, ist ein von der Zelle kontrollierter Vorgang. Es ist eine Form des Zelltodes, die an vielen physiologischen Prozessen des Organismus beteiligt ist, wie bspw. an der Organogenese während der Embryonalentwicklung, an der Entfernung von beschädigten oder alten Zellen sowie am Gewebeumbau. Bei der Apoptose handelt es sich um einen geordneten Prozess, bei dem die Zelle zunächst den Kontakt zur Nachbarzelle verliert. Danach folgt im Zellkern die Kondensation des Erbmaterials. Anschließend kommt es zur DNA-Fragmentierung und nachfolgend zur Zellschrumpfung (Mates und Sanchez-Jimenez 2000). Am Ende des Vorgangs zerfällt die Zelle in Apoptose-Körperchen (apoptotic bodies). Diese Vesikel werden phagozytiert. Das Immunsystem wird während der Apoptose-Vorgänge im Gegensatz zur Nekrose nicht aktiviert und eine Entzündung im umliegenden Gewebe bleibt aus (Shacter et al. 2000).

Die Einleitung der Apoptose kann auf zwei verschiedenen Hauptwegen erfolgen (Abbildung 3). Extrazelluläre Signale, wie etwa die von Substanzen aus der Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF), können den rezeptorvermittelten extrinsischen Weg aktivieren. Auf diese Weise wird in mehreren Schritten eine Gruppe von Enzymen, sogenannte Initiator-Caspasen (Caspase 8 und 10), aktiviert. Sie sind die Verbindung des Apoptose auslösenden Signals mit den Effektor-Caspasen. Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6 und 7) sind für die eigentliche

morphologische Veränderung der Zelle nach der Induktion der Apoptose verantwortlich. Sie übernehmen die geleitete Zerstörung der Zelle nach einem vorgesehenen Programm.

Alternativ zu dem extrinsischen Weg der Apoptose-Induktion können Stress-Signale, wie bspw. DNA-Schäden, Hypoxie und der Verlust von Überlebenssignalen, zur Apoptose führen. Diese Aktivierungsform wird mitochondrialer oder intrinsischer Weg genannt. Der auf die Zelle einwirkende Stress führt zur Schädigung der Mitochondrien. Diese setzen aufgrund dessen Cytochrom c frei und führen zur Bildung des Apoptosoms (Abbildung 3). Das Apoptosom ist ein multimerer Komplex, bestehend aus Cytochrom c, Zytoplasma-Protein Apaf-1 und der Procaspase 9. Aufgrund der Formation der verschiedenen Enzyme als Apoptosomen kommt es zur Aktivierung der Caspase 9, welche dann wiederum die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert und folglich die Apoptose einleitet (Hajra und Liu 2004).

Mitotische Katastrophe (oder mitotischer Zelltod) ist ein Zelltod, der durch veränderte Mitose und/oder irreparable Chromosomenschäden verursacht wird. Diese Form kann während bzw. kurz nach einer fehlerhaften Mitose beobachtet werden. Falls Chromosomenschäden ursächlich sind, werden dabei Mikrokerne beobachtet, die Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen beinhalten, die nicht auf die Tochterzellkerne aufgeteilt waren. Ebenfalls können mehrkernige Zellen beobachtet werden, die aus einer fehlerhaften Separation während der Zytokinese resultieren (z. B. Zhang et al. 2006). Sowohl Zellen mit Mikrokernen als auch mehrkernige Zellen können anschließend durch Apoptose oder durch einen nicht-apoptotischen Zelltod sterben, sie können aber auch überleben. Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass mehrkernige Zellen nicht nur durch eine fehlerhafte Zytokinese entstehen können, sondern auch durch Entose, ein Prozess, bei dem lebende Zellen durch benachbarte Zellen internalisiert werden (Krajcovic et al. 2011). Zweikernige Zellen (mit einem tetraploiden Chromosomensatz) teilen sich oft fehlerhaft und tragen dadurch zur Entstehung von aneuploiden Zelllinien bei, wie sie in den meisten soliden Tumoren vorkommen.

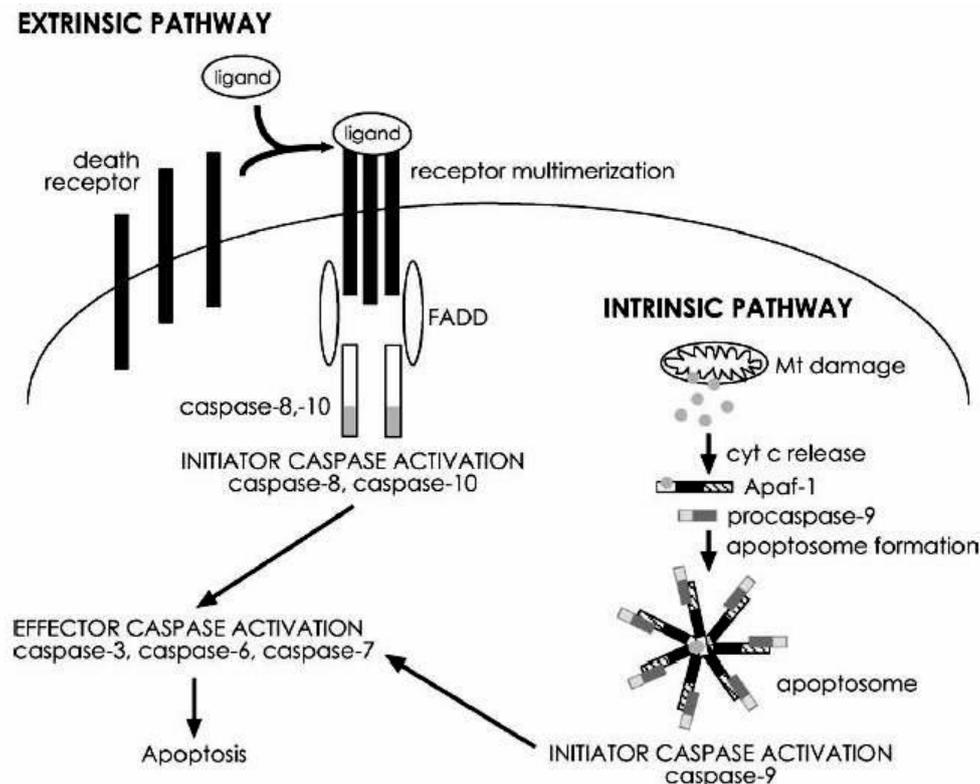


Abbildung 3 Der extrinsische und der intrinsische Weg der Apoptose-Induktion (Hajra und Liu 2004, Seite 692).

Der intrinsische Weg wird aktiviert durch Schädigung der Mitochondrien. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c und daraus resultiert die Aktivierung des Apoptosoms, sowie darauf folgend der Effektorcaspasen.

Der extrinsische Weg wird aktiviert durch die Bindung eines Moleküls an einen Rezeptor an der Zelloberfläche. Der Rezeptor-Molekül-Komplex aktiviert dann Initiatorcaspasen und diese aktivieren wiederum Effektorcaspasen.

Effektorcaspasen sind in beiden Fällen die ausführenden Enzyme der Apoptose.

Glioblastomzellen sind gegen alle bisherigen Therapiemaßnahmen, vor allem aber gegen die Bestrahlung weitestgehend resistent. Ein Ansatzpunkt der aktuellen Forschungsarbeiten ist es, Glioblastomzellen für verschiedene Therapien, z. B. Bestrahlung oder Chemotherapie, sensibler zu machen. Dies kann gelingen, indem man den schon grundlegend sehr hohen oxidativen Stress in malignen Zellen noch weiter erhöht und somit die Toleranzgrenze für die Einleitung des Zelltods überschreitet (Tuzgen et al. 2007, Zhao et al. 2009).

Untersucht und auch bewiesen wurde ein Einfluss von oxidativem Stress auf maligne Zellen, u. a. in Versuchen mit antioxidativen Substanzen wie N-Acetylcystein (NAC), durch die Be-

handlung der Zellen mit prooxidativen Substanzen, wie etwa Natriumselenit oder durch Hemmung der zelleigenen Schutzmechanismen bspw. durch Hemmung von Glutathion-Reduktase (Thirunavukkarasu et al. 2008).

N-Acetylcystein gehört in die Stoffklasse der Thiole. Es ist eine organische Verbindung mit sekretolytischen sowie antioxidativen Eigenschaften. In der Medizin wird N-Acetylcystein aufgrund seiner Fähigkeit zur reduktiven Spaltung von Disulfidbrücken in Mukoproteinen des Bronchialsekrets als Medikament zur Herabsetzung der Sputumviskosität in der Therapie der akuten und chronischen Bronchitis sowie der zystischen Fibrose angewendet. Zudem dient es als Antidot bei einer akuten Vergiftung mit dem Wirkstoff Paracetamol. Ein weiteres Einsatzgebiet von N-Acetylcystein besteht in der Anwendung zur Prophylaxe der kontrastmittelinduzierten Nierenschädigung (Briguori et al. 2011).

Mithilfe der funktionellen Schwefelgruppe (Thiolgruppe) kann N-Acetylcystein freie Radikale unter Bildung von Sulfid- bzw. Disulfidbrücken abfangen und deren toxische Wirkung verhindern. N-Acetylcystein dient überdies als Vorstufe der Aminosäure Cystein und ist demzufolge ein Bestandteil von Glutathion (Abbildung 4) (Raftos et al. 2007).

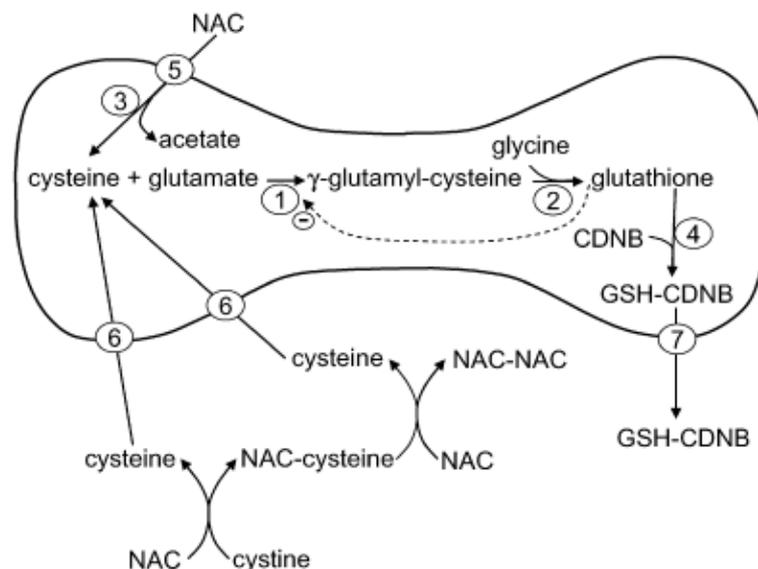


Abbildung 4 N-Acetylcystein als Vorstufe von Glutathion (übernommen aus Raftos et al. 2007, Seite 1699)

Glutathion gehört zu den wichtigsten Antioxidantien des menschlichen Organismus. Es setzt sich aus den Aminosäuren Glutamin, Cystein und Glycin zusammen (Strukturformel siehe Abbildung 5). Glutathion besitzt ebenfalls eine Thiolgruppe und kann mit dieser freie Radika-

le binden und somit die Zelle vor elektrophilen Metaboliten schützen. Dabei wird Glutathion oxidiert und verbindet sich mit einem weiteren Glutathion über eine Disulfidbrücke.

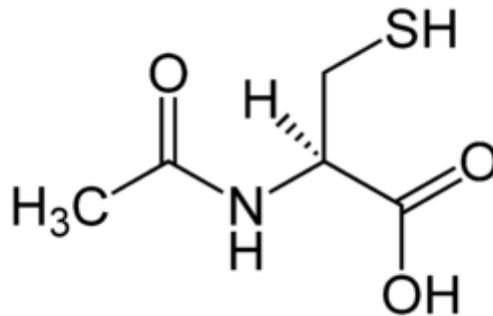


Abbildung 5 Strukturformel N-Acetylcystein

Selenit wird nach der oralen Aufnahme und Resorption im Duodenum des Gastrointestinaltraktes zu Selenodiglutathion und dieses wird durch NADPH-abhängige Reduktasen zu Selenid reduziert. Selenid spielt eine zentrale Rolle im Selenstoffwechsel des Menschen. Es steht im Zusammenhang mit dem Einbau von Selen in spezifische Selenoproteine und der Ausscheidung von Selen in methylierter Form.

Die selenabhängige Glutathion-Peroxidase gehört zu den wichtigsten antioxidativen Enzymen des menschlichen Organismus. Es ist als vitales Enzym für den Schutz der Zelle gegenüber Schädigungen durch oxidativen Stress verantwortlich. Vor allem Hydroxyperoxide werden durch die Glutathion-Peroxidase zu unschädlichen Verbindungen wie Wasser oder Alkohol abgebaut und können dann leichter ausgeschieden werden.

Die Toxizität von Selenit hängt von der Höhe der vom Körper aufgenommenen Dosis ab. Die auftretenden toxischen Effekte von Selenit werden auf Reaktionen von Selen- und Schwefelverbindungen zurückgeführt (Stewart et al. 1999). Hierbei reagieren unter anderem Selenit oder Selendioxid mit Thiolen, etwa Glutathion oder Selenocystein, zu elementarem Selen und führen gleichzeitig zur Bildung von Superoxidradikal-Anionen (Abbildung 6). Diese erhöhen den oxidativen Stress der Zelle und können die DNA oxidativ schädigen und somit Apoptose induzieren (Stewart et al. 1999). Superoxidanionen werden von Superoxid-Dismutase in Wasserstoffperoxid umgewandelt (Riley 1994), die ebenfalls die DNA schädigen können.



Abbildung 6 Mögliche Bildung von Superoxidradikal-Anionen aus Selenit. (Modifiziert nach Spallholz 1997 Seite 265).

(SeO_3^{2-}): Selenit, GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: oxidiertes Glutathion, GSSeSG: Selenodiglutathion, GSSeH: Selenopersulfid, H_2Se : Hydrogenselenid, ($\text{O}_2^{\cdot-}$): Superoxid-Anion Radikal, Se^0 : elementares Selen.

Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst die Reaktion von Glioblastom-Standardzellkulturen und Glioblastom-Stammzellkulturen auf eine Bestrahlung mit Röntgenstrahlen zu untersuchen und zu vergleichen. Nach Bestrahlung mit zunehmenden Dosen wurden nach verschiedener Kulturzeit die Apoptoserate und der Anteil an mehrkernigen Zellen untersucht. Dabei wurden die Apoptoserate und die Mehrkernigkeit in den Stammzellkulturen mit denen in den Standardzellkulturen verglichen.

Die Standardzellkulturen wurden darüber hinaus mit Natriumselenit und N-Acetylcystein behandelt und die Apoptoseinduktion sowie Mehrkernigkeit untersucht. Die prooxidative Wirkung von Natriumselenit wurde in den drei Standardzelllinien untereinander und dann mit der Wirkung einer alleinigen Bestrahlung verglichen.

Die antioxidative Wirkung von N-Acetylcystein wurde in Kombination mit Bestrahlung untersucht. N-Acetylcystein als Radikalfänger schützt im Prinzip vor der indirekten Strahlenwirkung (ROS-Wirkung). Die verminderte Apoptoserate und Mehrkernigkeit sollten zur Abschätzung des Anteils der indirekten Strahlenwirkung an der gesamten Apoptose- und Mehrkernigkeit - Induktion beitragen.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Der nachfolgende Abschnitt beinhaltet eine tabellarische Aufstellung der verwendeten Geräte, Materialien und Chemikalien.

Geräte

Produkt	Hersteller
Brutschrank 37°C, 5 % CO ₂	Heraeus Instruments GmbH (Hanau, D)
Clinac 600C Linearbeschleuniger	Varian Medical System Deutschland GmbH (Darmstadt, D)
Clock Timer TR 118	Oregon Scientific (Neu-Isenburg, D)
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss AG (Göttingen, D)
Kühlschrank 4°C	Liebherr International Deutschland GmbH (Biberach an der Riss, D)
Magnetrührer mit Hitzeplatte	RCT basic, IKA Labortechnik (Staufen, D)
Mikroskop Telaval 31	Carl Zeiss AG (Göttingen, D)
Pipetboy comfort	Integra Biosciences (Fernwald, D)
Pipettierhelfer Accu jet [®] pro	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, D)
Reinstwassersystem Arium 611 VF	Sartorius (Göttingen, D)
Research Pipette 10 µl, 100 µl	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Rotixa/A Zentrifuge	A. Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, D)
Schüttler 4010	Köttermann [®] (Uetze-Hänigsen, D)
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus Instruments GmbH (Hanau, D)
Vortexer	MS1 Minishaker, IKA [®] (Staufen, D)
Waage	TE612 Sartorius (Göttingen, D)
Wasserschüttelbad 1083	GFL mbH (Burgwedel, D)

Ge- und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Automat Star Deckgläschen 24 x 60 mm	Engelbrecht Medizin und Labortechnik (Edermünden, D)
Becherglas Duran [®] , 5 ml, 50 ml, 500 ml	Schott AG (Mainz, D)

Produkt	Hersteller
Blaubrand [®] Zählkammer Tiefe 0,100 m 0,0025 mm ²	Brand GmbH & Co KG (Wertheim, D)
Discardit II Spritze – Spritzen 10 ml	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Erlenmeyerkolben Duran [®] , 50 ml, 250 ml, 500 ml	Schott AG (Mainz, D)
Filter Top Zellkulturflächen, 50 ml, 25 cm ² mit rotem Filter- Schraubver- schluss, steril	Cellstar [®] , Greiner Bio One GmbH (So- lingen, D)
Glaser Objektträger 76 x 26 mm / 3 x 1 inch	W. Knittel Glasbearbeitungs GmbH (Braunschweig, D)
Kimtech Science Labortücher 20 x 21 cm	Kimberly Clark (Koblenz, D)
Laborglasflaschen mit Gewinde 500 ml	Biochrom KG (Berlin, D)
Millex [®] GS Filter Unit, 0,22 µm, steril	Millipore GmbH (Schwalbach, D)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
Peha Soft [®] Untersuchungshandschuhe puderfrei	Paul Hartmann AG (Heidenheim, D)
Pippentenspitzen 10 µl	epT.I.P.S. Reloads 0,5-20 µl (Eppen- dorf, Hamburg, D)
Pippentenspitzen 100 µl	epT.I.P.S. Reloads 2-200 µl (Eppendorf, Hamburg, D)
Pippentenspitzen 1000 µl	epT.I.P.S. Reloads 50-1000 µl (Eppen- dorf, Hamburg, D)
Polypropylen Röhrchen, 15 ml, steril, blauer Schraubverschluss	Cellstar [®] , Greiner Bio One GmbH (So- lingen, D)
Polypropylen Röhrchen, 50 ml, steril, roter Schraubverschluss	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Serologische Pipetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Cellstar [®] , Greiner Bio One GmbH (So- lingen, D)
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt AG & Co, (Nümbrecht, D)
Zellkulturflasche 250 ml, 75 cm ² mit ro- tem Standardschraubverschluss, steril	Cellstar [®] , Greiner Bio One GmbH (So- lingen, D)
Zentrifugenröhrchen PS 16 x 100 mm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)

Lösungen und Chemikalien

Produkt	CAS.Nr.	Hersteller
Acridin Orange	10127-02-3	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, K_2HPO_4 , 250 g	7758-11-4	Merck KGaA (Darmstadt, D)
di-Natriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4	7558-79-4	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Formaldehydlösung 37 % (zur Analyse stabilisiert mit 10 % Methanol)	50-00-0	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Hoechst 33342	23491-52-3	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Kaliumchlorid, KCl	7447-40-7	Merck KGaA (Darmstadt, D)
L- Glutamin, $C_5H_{10}N_2O_3$, 100 mg	56-85-9	Merck KGaA Darmstadt, D
Methanol	67-56-1	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Natriumchlorid, NaCl	7647-14-5	Merck KGaA Darmstadt, D
Natronlauge, NaOH 1 mol/l, 1 l	1310-73-2	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Salzsäure, HCl 1 mol/l, 1 l	7647-01-0	Carl Roth GmbH + Co. KG, (Karlsruhe, D)
Sodium Pyruvat 100 ml	113-24-6	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Tri-Natriumcitrat-dihydrat, $C_6H_5Na_3O_7$, 5kg	6132-04-3	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Tris Base, $C_4H_{11}NO_3$	77-86-1	Trizma [®] Base, Sigma [®] (Steinheim, D)
Trypsin-EDTA, 100 ml GIBCO [®]	2594-14-1	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Natriumselenit, Na_2SeO_3	10102-18-8	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
N-Acetylcystein, $C_5H_9NO_3S$, 100 mg	616-91-1	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)

Puffer und Waschlösung

Als Standardpuffer und Waschlösung wurde, soweit nichts anderes beschrieben, phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) verwendet. Diese wurde aus den Chemikalien 40g NaCl, 1g KCl, 5,75g Na_2HPO_4 und 1g KH_2PO_4 hergestellt, in 5l Aqua bidest gelöst und steril filtriert. Die Lagerung erfolgte in sterilen 500 ml Flaschen bei 4°C.

Färbelösung zur morphologischen Bestimmung der Apoptoserate

Zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop mussten die fixierten Zellen angefärbt werden. Die verwendete Färbelösung bestand aus 1 µl Höchst 33342 (5 mg/ml A.bidest) und 250 µl Acridin Orange (100 µg/ml A.bidest).

Kulturmedien, Seren, Enzyme und Wachstumsfaktoren

Als Kulturmedien für die Standardkulturen diente GIBCO[®] MEM (Zelllinien G112 und U251) und GIBCO[®] DMEM (U87MG). Die MEM-Lösung wurde mit 5 ml Natrium-Pyruvat, 5 ml L-Glutamin sowie 50 ml FCS, die DMEM-Lösung mit 5 ml Natrium-Pyruvat und 50 ml FCS versetzt.

Das Medium für die Stammzellen bestand aus 45 ml Neurobasal A Medium, 10 ml B 27 Supplement, 5 ml 1 % BSA, 5 µl human FGF basic (10 ng/ml) sowie 1 µl human EGF (20 ng/ml).

Die Lagerung aller Medien erfolgte im Kühlschrank bei 4°C. Vor der Verwendung wurden sie für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad erwärmt.

Produkt	Hersteller
B27 Supplement mit Vitamin A, 10 ml	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Bovines Serumalbumin, 250 g	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Fetal Bovine Serum 500 ml GIBCO [®]	Invitrogen (Karlsruhe, D)
GIBCO [®] DMEM liquid, 500 ml	Invitrogen (Karlsruhe, D)
GIBCO [®] MEM, 500 ml	Invitrogen (Karlsruhe, D)
human EGF, 100 µg	Biochrom AG (Berlin, D)
human FGF basic, 10 µg	Biochrom AG (Berlin, D)
KaryoMAX [®] Colcemid [®] (1 µg/ml), in PBS, 10ml	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Neurobasal A Medium, 500 ml	Invitrogen (Karlsruhe, D)

Zellkulturen

Zelllinie	Herkunft
G112	Glioblastoma multiforme, human (Göttingen, D)

Zelllinie	Herkunft
U251	Glioblastoma multiforme, human (Göttingen, D)
U87MG	Glioblastoma multiforme, human (Göttingen, D)
G112 sp	Glioblastoma multiforme, human (Göttingen, D)
U251 sp	Glioblastoma multiforme, human (Göttingen, D)
U87 sp	Glioblastoma multiforme, human (Göttingen, D)

Die Abteilung Neuroonkologie der Universitätsmedizin Göttingen (Arbeitsgruppe Dr. Ella Kim) stellte zu Beginn der Versuche die drei Zelllinien U87MG, G112 und U251 zur Verfügung.

Computerprogramme

Programm	Hersteller
Microsoft [®] Excel 2000	Microsoft Corporation (Washington, USA)
Microsoft [®] Word 2000	Microsoft Corporation (Washington, USA)
Microsoft [®] Internet Explorer	Microsoft Corporation (Washington, USA)
Adobe Reader	Adobe Systems Inc. (San Francisco, USA)

Statistische Programme

Programm	Quelle
ANOVA (Analysis of Variance between groups)	http://www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html
Tukey HSD (Honestly Significant Difference) Test for Post-ANOVA Pair-Wise Comparisons in a One-Way ANOVA	http://faculty.vassar.edu/lowry/hsd.html

3.2. Zellkultivierung

3.2.1. Standardzellkulturen (Zelllinie G112, U251, U87)

Die Kultivierung erfolgte in 50-ml-Gewebekulturflaschen in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre. Das Kulturmedium bestand aus DMEM mit Phenolrot, 10 % inaktivierten FKS und 1 % Natrium-Pyruvat (Zelllinie U87) oder MEM mit Phenolrot, 10 % inaktivierten FKS, 1 % Glutamin und 1 % Natrium-Pyruvat (Zelllinie U251 und G112).

Die Zellen der Standardkulturen wuchsen am Boden der Gewebekulturflaschen fest (Abbildung 7).

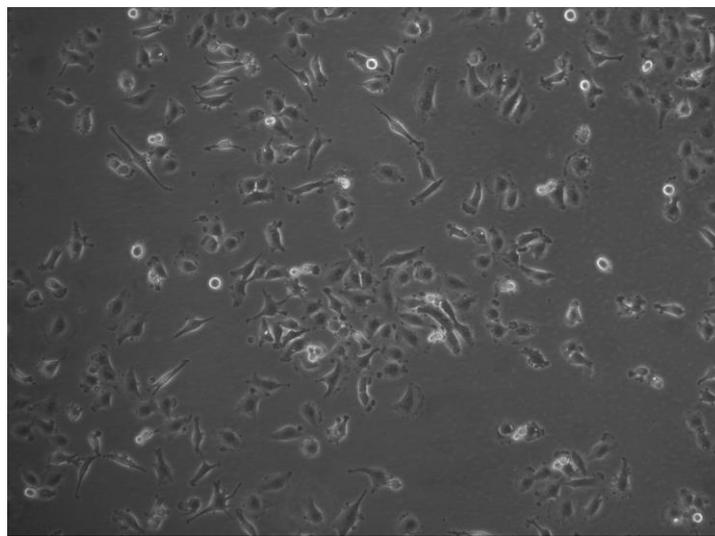


Abbildung 7 Zelllinie U251

Die Zellen wachsen fest am Boden der Kulturflasche.

Nach 3-7 Tagen erfolgte je nach Teilungsrate der jeweiligen Zelllinie eine Überführung in eine neue Kulturflasche. Dazu wurde zunächst das alte Medium verworfen und die Zellkulturflaschen 2 x mit je 5 ml PBS gespült. Um die Zellen vom Boden zu lösen, wurden anschließend 2 ml Trypsin-EDTA hinzugefügt und die Kulturflaschen für 5 bis 8 Minuten in den Brutschrank verbracht.

Nach Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche erfolgte eine Neutralisierung des Trypsins mittels 2 ml Kulturmedium. Die Zellen wurden anschließend in der entstandenen Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren mechanisch voneinander gelöst und darauf folgend in den Verhältnissen 1:5 und 1:10 auf neue, zuvor mit je 5 ml Medium bestückte Gewebeflaschen verteilt.

Für die geplanten Versuche wurden jeweils ca. 10^6 Zellen aus der Erhaltungskultur in T 75 Gewebekulturflaschen mit 15 ml Medium für 5 bis 10 Tage angezüchtet. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 3 bis 4 Tagen.

3.2.2. Stammzellkulturen (G112 Sp, U251 Sp, U87 Sp)

Die Kultivierung der Stammzellen erfolgte in 50-ml-Gewebekulturflaschen in Minimal Neurobasal Medium, welches mit 2 % B-27 Supplement, FGF basal (10 ng/ml), EGF (20 ng/ml) und 0,1 % BSA angereichert wurde. Die Stammzellen wuchsen nicht wie die Standardkulturen am Boden der Kulturflaschen fest, sondern sammelten sich als Neurosphären im Medium (Abbildung 8). Die Lagerung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ Atmosphäre. Ein Mediumwechsel fand nach 7 bis 10 Tagen statt.

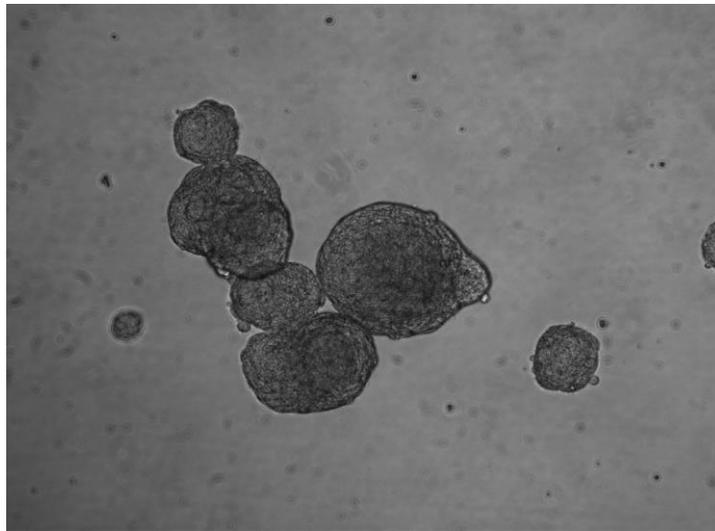


Abbildung 8 Zelllinie U251 sp

Die Zellen wachsen in Gruppen als sogenannte Neurosphären „schwimmend“ im Medium zusammen.

3.3. Behandlung der Zellkulturen

3.3.1. Bestrahlung mit 6 MeV Röntgenstrahlung

24 h vor der Bestrahlung wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA vom Kulturflaschenboden gelöst und in einer Blaubrand[®]-Zählkammer gezählt. Jeweils 250.000 Zellen jeder Zelllinie wurden in einer 50-ml-Gewebekulturflasche mit 5 ml Medium ausgesät. Bereits 24 h später waren die Zellen der Standardkulturen am Boden der Kulturflasche als Monolayer angewachsen und es erfolgte die Bestrahlung mit 6MeV Röntgenstrahlung mittels eines Clinac-600C Linearbeschleunigers der Firma Varian. Die Stammzellen wuchsen „schwimmend“ als Neurosphären im Medium und wurden ebenfalls 24 h nach der Aussaat bestrahlt. Um eine

optimale Dosis in der Zellschicht am Boden der Kulturflasche zu erlangen, wurden die Flaschen auf eine 1 cm dicke Plexiglasscheibe gelegt (Aufbaueffekt) und das Bestrahlungsgerät um 180° gedreht, sodass die Flaschen von unten bestrahlt wurden. Es erfolgte eine einmalige Bestrahlung der Proben mit den verschiedenen Dosen von 3 Gy, 5 Gy oder 7,5 Gy.

Parallel zu den bestrahlten Zellen erfolgte eine Beimpfung weiterer Gewebekulturflaschen mit 250.000 Zellen. Diese wurden nicht bestrahlt und dienten der Kontrolle.

Die Lagerung von bestrahlten und unbestrahlten Proben erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Das bei jedem Mediumwechsel (alle 96 h) entnommene alte Medium mit bereits abgelösten, apoptotischen Zellen wurde in 15-ml-Röhrchen gesichert und separat im Verhältnis 1:5 mit 5 % Formaldehyd fixiert.

3.3.2. Inkubation mit N-Acetylcystein und Bestrahlung

Zu Beginn des Versuches wurden die Zellen, wie oben beschrieben, gezählt und mehrere Gewebekulturflaschen für jede Zelllinie mit 250.000 Zellen beimpft, sowie mit 5 ml Medium gefüllt. Anschließend erfolgte die Lagerung der Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre. Nach 24 h konnten die konfluenten Zellen mit jeweils 1 mM, 5 mM, 20 mM oder 40 mM N-Acetylcystein für 3 h inkubiert werden.

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Bestrahlung mit dem Clinac-600C-Linearbeschleuniger der Firma Varian mit Dosen von 3 Gy, 5 Gy und 7,5 Gy. Die Fixierung der Zellen zur Apoptose-Auswertung erfolgte 24 h und 168 h nach der Bestrahlung.

Ein Mediumwechsel fand 96 h nach der Bestrahlung statt. Dabei wurde das entnommene, alte Medium, in dem sich abgelöste, apoptotische Zellen befanden, im Verhältnis 1:5 mit 5 % Formaldehyd fixiert und in einem 15-ml-Röhrchen aufbewahrt. In die Kulturflaschen wurde 5 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben.

3.3.3. Behandlung der Zellen mit Natriumselenit

Zunächst wurden vier 50-ml-Kulturflaschen mit je 1 Million Zellen einer Zelllinie beimpft und im Brutschrank kultiviert. Nach etwa 4 Tagen erfolgte die Behandlung der konfluenten Zellen mit Natriumselenit für 7 h. Dazu wurde das alte Medium verworfen und die Zellen mit 8 ml frischem Medium sowie Natriumselenit in den Konzentrationen 10 µM, 20 µM oder 40 µM benetzt. Nach Ablauf der 7 h wurde das Medium mit Natriumselenit verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin vom Flaschenboden abgelöst, gezählt sowie auf neue Fla-

schen verteilt (250.000 Zellen/Flasche). Die Kultivierung erfolgte danach im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre.

Nach 24 h und 168 h wurden die Zellen mit 5% Formaldehyd für die Apoptose-Auswertung fixiert.

3.4. Morphologische Bestimmung der Apoptose-Rate und Mehrkernigkeit

3.4.1. Fixierung der Standardzellen

Die Fixierung der Zellen zum Nachweis von Apoptose oder Mehrkernigkeit bei den bestrahlten und unbestrahlten Proben erfolgte zu mehreren Zeitpunkten im 24h-Rhythmus (t = 24 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h) sowie 10, 14, 21 und 28 Tagen nach der Bestrahlung und daneben wie in den vorangegangenen Versuchsabläufen (3.3.) beschrieben.

In den Standardkulturen hafteten die Zellen als Monolayer am Boden der Kulturflasche fest, weshalb sie zum jeweiligen Fixierungszeitpunkt zur weiteren Verwendung durch Trypsin abgelöst werden mussten. Das alte Medium enthielt abgelöste apoptotische Zellen, die mit ausgewertet werden mussten. Das alte Medium wurde deshalb in einem 15-ml-Röhrchen gesichert und bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1 ml verworfen und die Zellen im Röhrchen resuspendiert. Die verbleibenden Zellen in der Kulturflasche wurden 2 x mit je 5 ml PBS gespült. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 2 ml Trypsin-EDTA im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre für etwa 5 bis 10 Minuten. Während dieser Zeit hatten sich die Zellen vom Boden der Flasche gelöst. Durch Auf- und Abpipettieren erfolgte zusätzlich eine mechanische Vereinzelung der Zellen und die Trypsinlösung wurde durch Hinzufügen von 2 ml Zellkulturmedium neutralisiert.

Im Anschluss erfolgte die Überführung der Zellsuspension in das 15-ml-Röhrchen zu den bereits vom Medium isolierten Zellen. Durch Zugabe von einer 5 %-Formaldehydlösung im Verhältnis 1:5 wurden die Zellen für die Apoptose-Auswertung fixiert. Die Proben wurden dann bei 4°C im Kühlschrank bis zur Auswertung gelagert.

3.4.2. Fixierung der Stammzellen

Die Fixierung der Stammzellen wurde nach 24 h, 72 h, 144 h und 168 h sowie nach 10 und 14 Tagen vorgenommen. Da diese Zellen nicht am Boden des Wells festwuchsen, sondern sich als Neurosphären schwimmend im Medium befanden, musste das Medium zunächst aufgenommen und in einem 15-ml-Röhrchen gesichert werden. Das Well wurde 2 x mit PBS gespült, um noch verbliebene Zellen zu sammeln. Die Spülflüssigkeit wurde zu dem zuvor

gesicherten Medium gegeben. Sodann wurde das Röhrchen mit den enthaltenen Zellen bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zu der übrigen Zellsuspension am Boden des Röhrchens wurden 2 ml Trypsin für 2 Minuten gegeben und die Zellen durch mehrmaliges Klopfen und Pipettieren voneinander gelöst. Anschließend wurde die Trypsin-Lösung mittels 2 ml Neurobasal Complete Medium inaktiviert und mit 5 % Formaldehydlösung im Verhältnis 1:5 fixiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4°C bis zur Auswertung.

3.4.3. Färbung und Auswertung der fixierten Zellen

Die bei 4° C gekühlten, fixierten Zellsuspensionen wurden vor der Auswertung zunächst bei 1200 U/min 10 Minuten abzentrifugiert. Der bei der Zentrifugation entstandene Überstand wurde verworfen und die sich am Röhrchenboden befindlichen Zellen mechanisch durch Klopfen und Pipettieren resuspendiert.

Zur Färbung wurden jeweils 45 µl Zellsuspension mit 5 µl Färbelösung in einem Reaktionsgefäße Safe-Lock gemischt. Für die Auswertung wurden jeweils 25 µl langsam auf einen Objektträger aufgetropft und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Anschließend erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop bei 630 facher Vergrößerung.

3.4.4. Morphologische Apoptose-Auswertung

Die auf dem Objektträger aufgetropften Zellen wurden einzeln betrachtet und als normale oder apoptotische Zellen klassifiziert.

Als frühapoptotische Zelle wurde eine Zelle klassifiziert, die einen kondensierten, geschrumpften, im Fluoreszenzmikroskop hell leuchtenden Kern aufwies. Dieser hatte entweder eine geschrumpfte, runde oder eine halbmondartige Form.

Als spätapoptotische wurde eine Zelle klassifiziert, deren Zytoplasma viele kleine verschiedene Kern-Fragmente, sogenannte Apoptosekörperchen beinhaltete.

Zellen mit mehreren runden Kernen im Zytoplasma wurden als unveränderte, mehrkernige Zellen klassifiziert und gezählt. Mehrkernige apoptotische Zellen wurden entsprechend den oben genannten Kriterien klassifiziert.

Es wurden jeweils 50 intakte Zellen gezählt und parallel dazu die apoptotischen Zellen bestimmt. Dies erfolgte 7 Mal für jede Probe. Die Berechnung des Apoptoseindex [AI] geschah dabei nach folgender Formel:

$$\text{Apoptoseindex [AI]} = \frac{\sum \text{gezählter apoptotischer Zellen} \times 100}{\text{Gesamt gezählte Zellen}}$$

3.4.5. Morphologische Auswertung der Mehrkernigkeit

Parallel zur Bestimmung des Apoptoseindex wurde der Anteil von mehrkernigen Zellen ermittelt. Dazu wurden die Zellen auf einem Objektträger betrachtet und die Anzahl von mehrkernigen Zellen notiert. Es wurden jeweils 100 intakte Zellen gezählt und parallel dazu die mehrkernigen Zellen bestimmt. Dies erfolgte 3 Mal für jede Probe.

Als mehrkernig wurde eine Zelle klassifiziert, wenn sie mindestens zwei runde, etwa gleich große und gut voneinander abgrenzbare Kerne im Zytoplasma aufwies. Als einkernig galt eine Zelle, wenn sie nur einen einzelnen Kern im Zytoplasma hatte oder kleine Mikrokerne sowie Kernverschmelzungen nachweisbar waren (Bhattathiri et al. 1998). Anschließend wurde das Verhältnis von einkernigen und mehrkernigen Zellen mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Anteil mehrkerniger Zellen[MK]} = \frac{\sum \text{gezählter mehrkerniger Zellen} \times 100}{\text{Gesamt gezählte Zellen}}$$

3.4.6. Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden im Computerprogramm Microsoft[®] Excel 2000 (Microsoft Corporation, Washington, USA) tabellarisch erfasst und in Diagrammen dargestellt.

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet. Die Unterschiede zwischen einzelnen Mittelwerten wurden mit der Varianzanalyse ANOVA (*Analysis of Variance between groups*) getestet, gefolgt vom Tukey-HSD (*Honestly Significant Difference*) -Test für unverbundene Stichproben. Die Signifikanz der Unterschiede wurde auf dem 95% Niveau getestet ($P=0,95$).

4. Ergebnisse

4.1. Strahleninduzierte Apoptoserate in Standardzellkulturen

In allen drei untersuchten Standardkulturzelllinien konnten nach Bestrahlung mit Dosen von $D=3$ Gy, 5 Gy und 7,5 Gy typische Zellkernveränderungen und somit Apoptose nachgewiesen werden. In allen drei untersuchten Standardzelllinien betrug der Anteil an apoptotischen Zellen in unbestrahlten Kontrollproben ca. 3 %.

Ab einer Dosis von 3 Gy konnte in allen Zelllinien im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle eine signifikant erhöhte ($P= 0,95$), d. h. Apoptoserate beobachtet werden. Die strahleninduzierte Apoptoserate nahm mit zunehmender Dosis zu und erreichte ein Maximum bei 7,5 Gy (Abbildung 9-11). Um möglichst große Effekte in den folgenden Versuchen zu erreichen, erfolgten die weiteren Bestrahlungen nur noch mit $D = 7,5$ Gy.

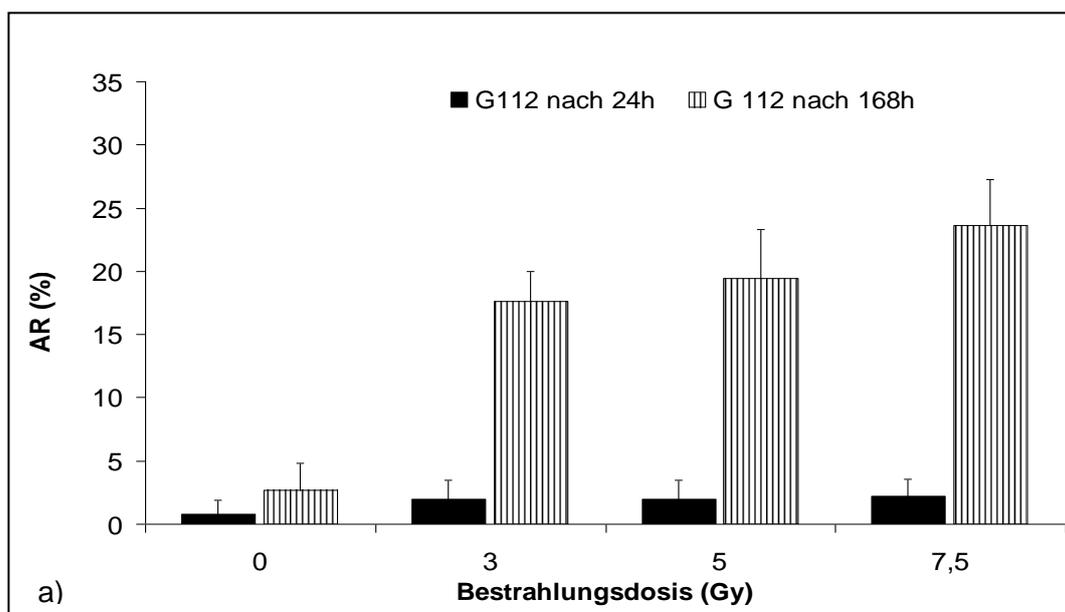


Abbildung 9 Apoptoserate in Glioblastoma-multiforme-Standardkulturen G112 nach Bestrahlung mit $D = 3$ Gy, 5 Gy und 7,5 Gy nach 24 h und 168 h
Apoptoserate AR (%) in unbestrahlten Kontrollen (0 Gy) sowie in mit $D = 3$ Gy, 5 Gy oder 7,5 Gy bestrahlten Proben nach 24 h und 168 h. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

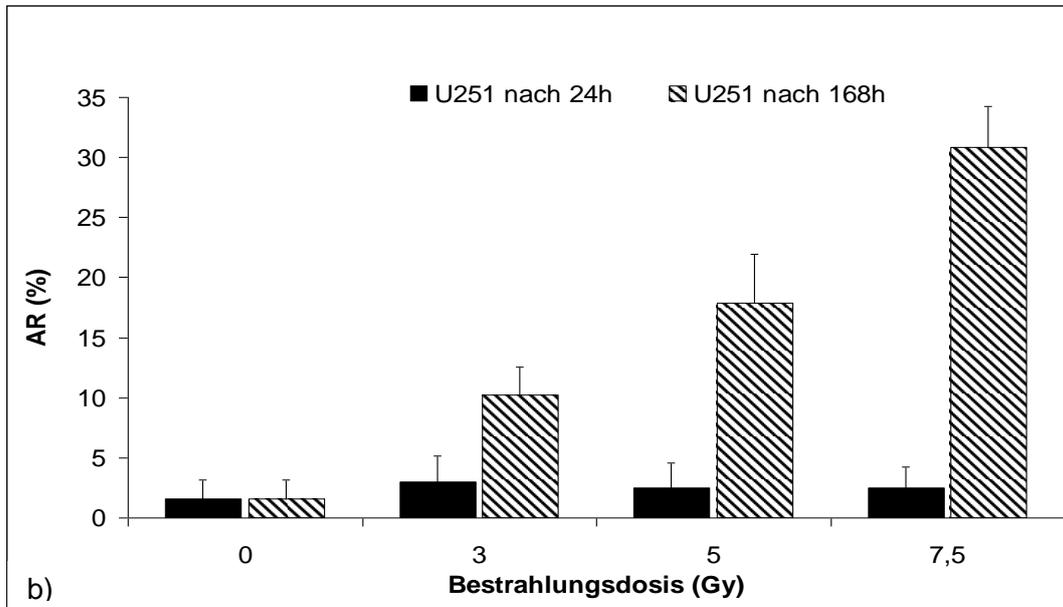


Abbildung 10 Apoptoserate in Glioblastoma-multiforme-Standardkulturen U251 nach Bestrahlung mit D = 3 Gy, 5 Gy und 7,5 Gy nach 24 h und 168 h
Apoptoserate AR (%) in unbestrahlten Kontrollen (0 Gy) sowie in mit D = 3 Gy, 5 Gy oder 7,5 Gy bestrahlten Proben nach 24 h und 168 h. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

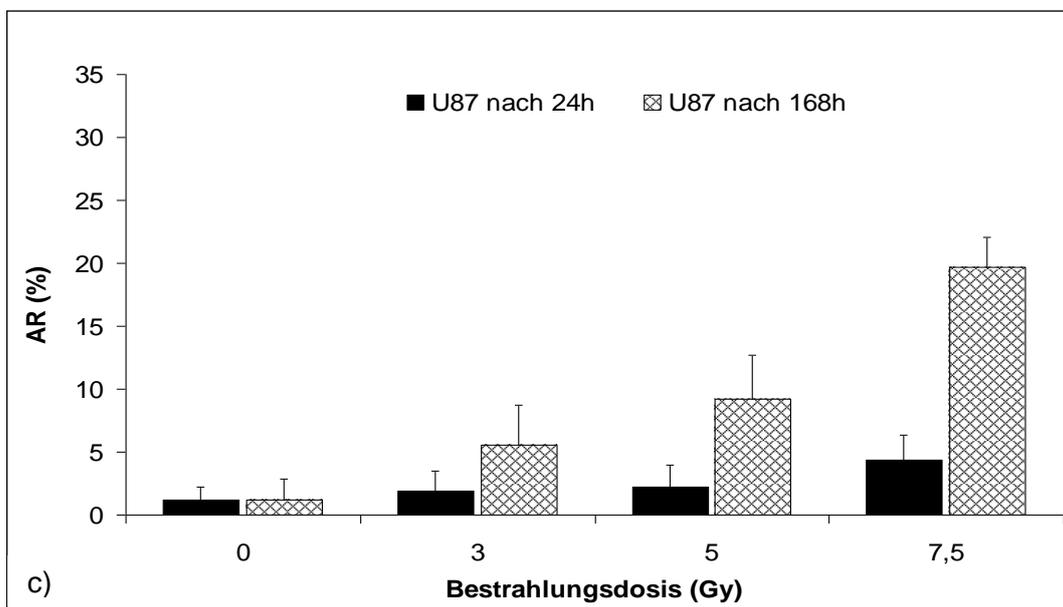


Abbildung 11 Apoptoserate in Glioblastoma-multiforme-Standardkulturen U87 nach Bestrahlung mit D=3 Gy, 5 Gy und 7,5 Gy nach 24 h und 168 h
Apoptoserate AR (%) in unbestrahlten Kontrollen (0 Gy) sowie in mit D = 3 Gy, 5 Gy oder 7,5 Gy bestrahlten Proben nach 24 h und 168 h. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

Zelllinie G112

Erst 72 h nach Bestrahlung war eine signifikant höhere Apoptoserate in den bestrahlten Proben im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollproben nachweisbar. Im weiteren Verlauf stieg die Apoptoserate in den bestrahlten Proben kontinuierlich bis maximal 23 % an. Dieser höchste Anteil apoptotischer Zellen war 168 h nach der Bestrahlung nachweisbar (Abbildung 12).

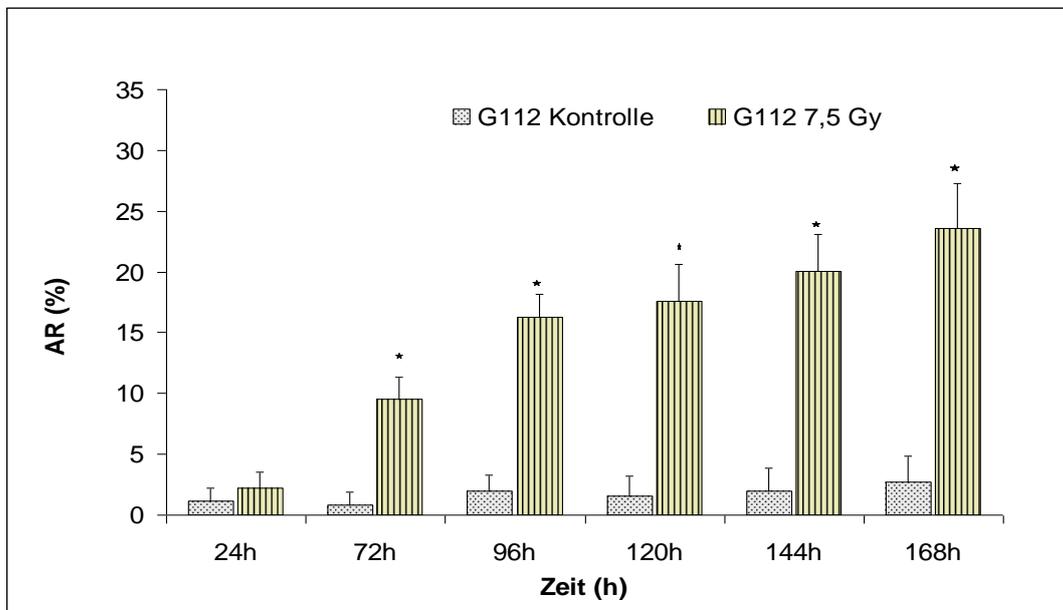


Abbildung 12 Apoptoserate in der Glioblastoma-multiforme-Standardkulturzelllinie G112 nach Bestrahlung mit D=7,5 Gy im zeitlichen Verlauf

Apoptoserate AR (%) in unbestrahlten Kontrollen (0 Gy) und in bestrahlten (D = 7,5 Gy) Zellen, bestimmt 24 h bis 168 h nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(★) Signifikant höhere Apoptoserate in bestrahlter Probe als in unbestrahlter Kontrolle.

Zelllinie U251

Auch in der Zelllinie U251 konnte eine erhöhte Apoptoserate erst 72 h nach Bestrahlung beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt war die Apoptoserate in den bestrahlten Proben signifikant höher als die Apoptoserate in den unbestrahlten Kontrollen. Die maximale Apoptoserate wurde nach 120 h erreicht und blieb danach bis 168 h nach Bestrahlung unverändert (Abbildung 13).

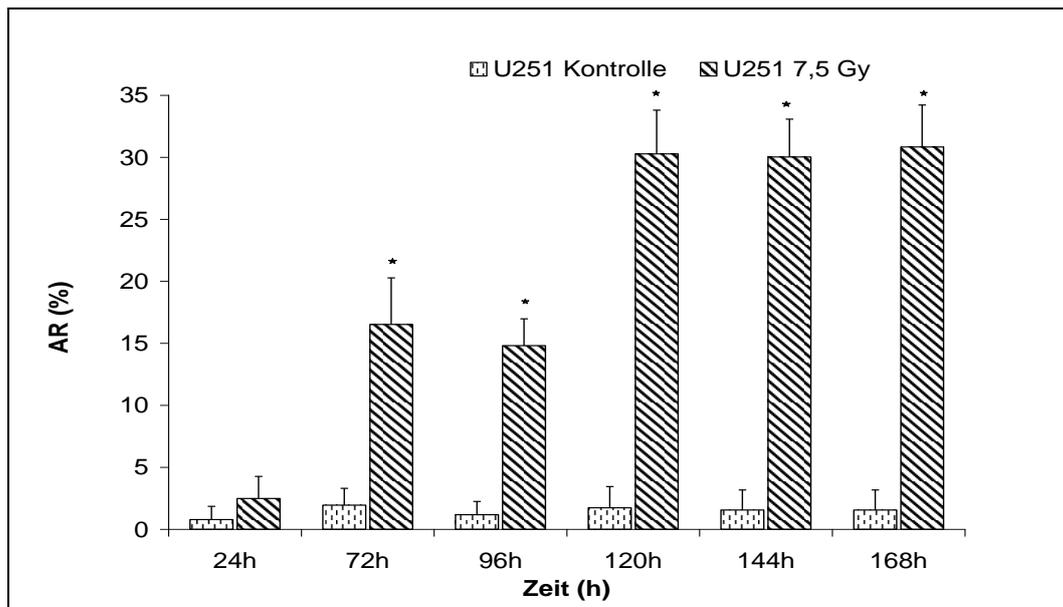


Abbildung 13 Apoptoserate in der Glioblastoma-multiforme-Standardkulturzelllinie U251 nach Bestrahlung mit D=7,5 Gy im zeitlichen Verlauf

Apoptoserate AR (%) in unbestrahlten Kontrollen (0 Gy) und in bestrahlten (D = 7,5 Gy) Zellen, bestimmt 24 h bis 168 h nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(★) Signifikant höhere Apoptoserate in bestrahlter Probe als in unbestrahlter Kontrolle.

Zelllinie U87

Die Anzahl apoptotischer Zellen in der Zelllinie U87 war bereits 24 h nach Bestrahlung signifikant höher als in den unbestrahlten Kontrollen. 96 h sowie 144 h nach Bestrahlung folgte ein weiterer Anstieg der Apoptoserate. Die höchste Apoptoserate konnte 168 h nach Bestrahlung beobachtet werden (Abbildung 14).

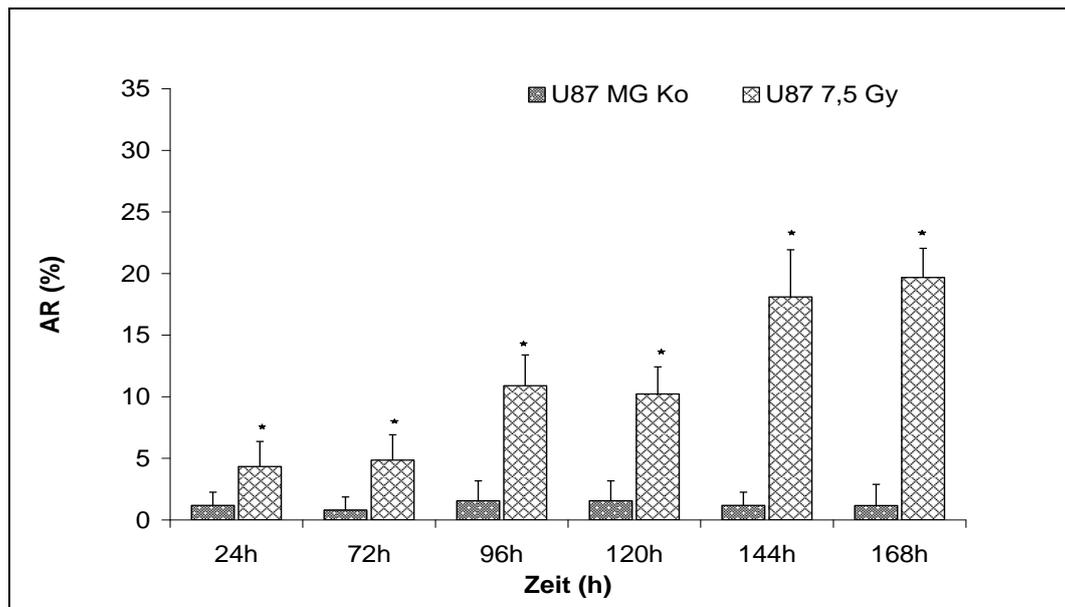


Abbildung 14 Apoptoserate in der Glioblastoma-multiforme-Standardkulturzelllinie U87 nach Bestrahlung mit D=7,5 Gy im zeitlichen Verlauf

Apoptoserate AR (%) in unbestrahlten Kontrollen und in bestrahlten (D = 7,5 Gy) Zellen, bestimmt 24 h bis 168 h nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(*) Signifikant höhere Apoptoserate in bestrahlter Probe als in unbestrahlter Kontrolle.

Vergleich der strahleninduzierten Apoptoserate in den drei untersuchten Standardzelllinien

Der zeitliche Verlauf der Apoptoserate war in jeder der untersuchten Standardzelllinien verschieden. Die Zelllinie G112 und U251 reagierten gleichermaßen mit einer signifikant erhöhten Präsenz von apoptotischen Zellen 72 h nach Bestrahlung bei D = 7,5 Gy (Abbildung 15). In der Zelllinie U87 konnte hingegen eine signifikant höhere strahleninduzierte Rate an apoptotischen Zellen im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen schon 24 h nach Bestrahlung beobachtet werden.

Die maximale Apoptoserate nach Bestrahlung mit D = 7,5 Gy wurde in allen Zelllinien erst spät nach etwa 120 h erreicht. Die Zelllinie U251 reagierte in Bezug auf die Apoptoseinduktion nach Bestrahlung am empfindlichsten, zudem zeigte sich in dieser Zelllinie nach 120 h ein sprunghafter Anstieg der Apoptoserate. Die Zelllinie G112 und U87 zeigten in Abhängigkeit der Zeit der Bestrahlung dagegen einen kontinuierlichen Anstieg an apoptotischen Zellen (Abbildung 15).

Sowohl in der Zelllinie U87 als auch in der Zelllinie G112 wurde im Vergleich zur Zelllinie U251 eine niedrigere Apoptoserate beobachtet. Die höchste Apoptoserate blieb in allen untersuchten Standardzelllinien bis 168 h nach Bestrahlung unverändert (Abbildung 15).

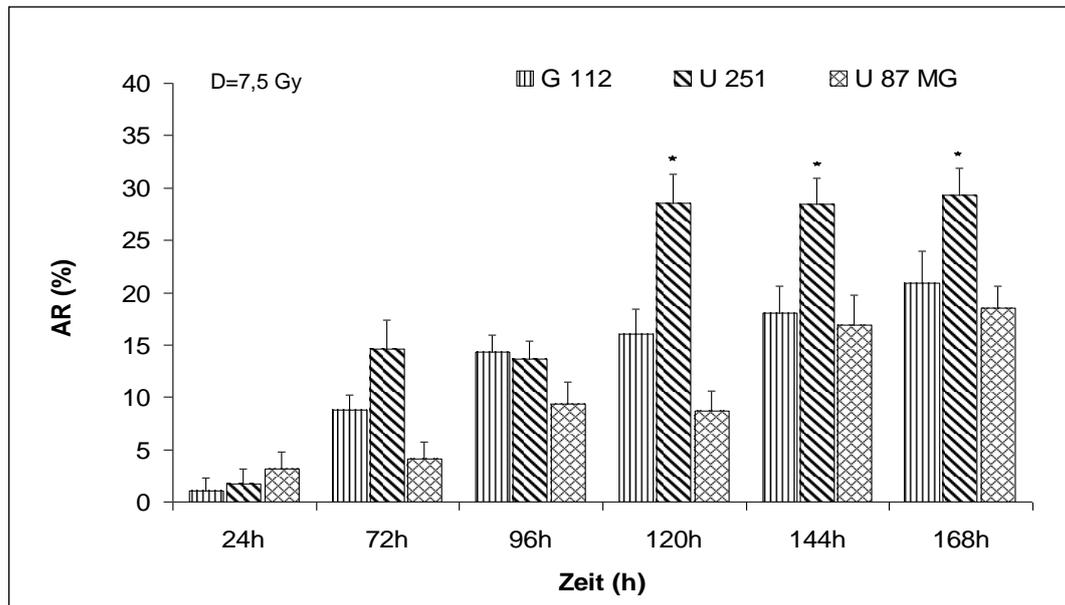


Abbildung 15 Vergleich der Apoptoserate in Glioblastoma-multiforme-Standardkulturen G112, U251 und U87 nach Bestrahlung mit D = 7,5 Gy im zeitlichen Verlauf

Apoptoserate AR (%) in bestrahlten Proben (D = 7,5 Gy) der Standardzelllinien G112, U251 und U87, bestimmt 24 h bis 168 h nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(*) Signifikanter Unterschied der Apoptoserate in der Zelllinie U251 im Vergleich zu den Zelllinien U87 und G112 zum Zeitpunkt 120 h bis 168 h nach Bestrahlung.

4.2. Strahleninduzierte Apoptoserate in Standardzellkulturen nach Inkubation mit N-Acetylcystein

Zelllinie G112

Eine Behandlung mit N-Acetylcystein hatte in dieser Zelllinie keinen Einfluss auf die mit D = 3 Gy und D = 5 Gy strahleninduzierte Apoptoserate. Alleinige Behandlung ohne Bestrahlung hatte ebenfalls keinen Effekt (Abbildung 16). Ein Unterschied in der Apoptoserate in Abhängigkeit von der N-Acetylcystein-Konzentration konnte in der Zelllinie G112 ebenfalls nicht beobachtet werden. Die Anzahl an apoptotischen Zellen war nach Behandlung mit 10 mM und 20 mM N-Acetylcystein in etwa gleich hoch (Abbildung 16).

Zum Zeitpunkt 168 h nach Vorbehandlung mit 10 mM oder 20 mM N-Acetylcystein und Bestrahlung mit 7,5 Gy wurde hingegen eine, im Vergleich mit nur bestrahlten Zellen signifikant höhere ($P=0,95$) Apoptoserate von ca. 37 % beobachtet (Abbildung 16). Bei der höchsten Bestrahlungsdosis $D=7,5$ Gy wirkte N-Acetylcystein in der Standardzelllinie G112 überraschenderweise prooxidativ und bewirkte zumindest bei dieser hohen Dosis eine Radiosensibilisierung.

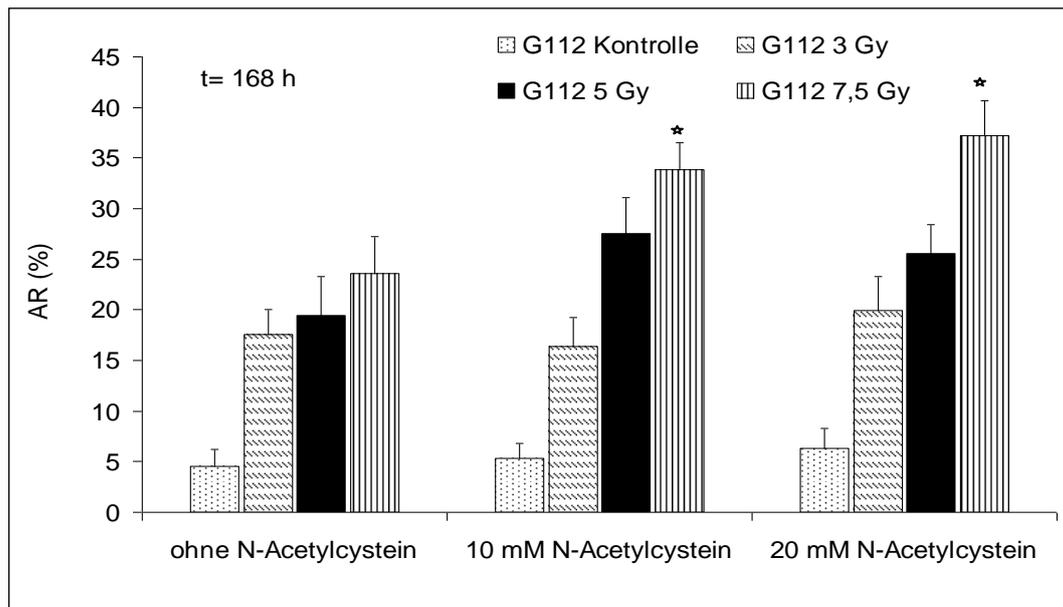


Abbildung 16 Apoptoserate nach Inkubation mit 10 mM oder 20 mM N-Acetylcystein und anschließender Bestrahlung mit $D = 3$ Gy, 5 Gy oder 7,5 Gy

Apoptoserate AR (%) der Standardzelllinien G11 nach Inkubation mit 10 mM oder 20 mM N-Acetylcystein und anschließender Bestrahlung ($D = 3$ Gy, 5 Gy oder 7,5 Gy). Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(*) Signifikant höhere Apoptoserate als in der Kontrollprobe die ohne N-Acetylcystein nur mit $D = 7,5$ Gy bestrahlt wurde.

Zelllinie U251

Auch in der Zelllinie U251 konnte sowohl in den unbestrahlten Kontrollen als auch in den mit 3 Gy und 5 Gy bestrahlten Zellen kein signifikanter Einfluss einer Vorbehandlung mit 10 mM und 20 mM N-Acetylcystein beobachtet werden (Abbildung 17).

Die antioxidative Wirkung von N-Acetylcystein konnte in der Zelllinie U251 erst bei einer Dosis von $D = 7,5$ Gy beobachtet werden. Die Apoptoserate war in vorbehandelten Zellen signifikant niedriger ($P = 0,95$) als in den ohne N-Acetylcystein bestrahlten Kontrollen (Abbildung 17). Eine protektive N-Acetylcystein Wirkung wurde somit bestätigt.

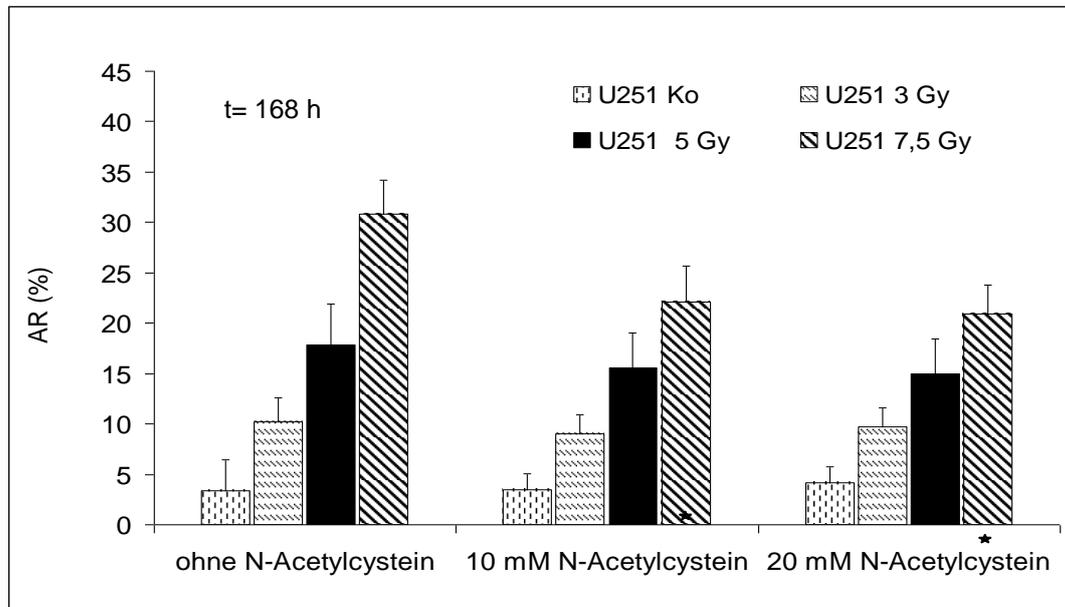


Abbildung 17 Apoptoserate nach Inkubation mit 10 mM oder 20 mM N-Acetylcystein und anschließender Bestrahlung mit D=3 Gy, 5 Gy oder 7,5 Gy

Apoptoserate AR (%) der Standardzelllinien U251 nach Inkubation mit 10 mM oder 20 mM N-Acetylcystein und anschließender Bestrahlung (D = 3 Gy, 5 Gy oder 7,5 Gy). Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(*) Signifikant niedrigere Apoptoserate als in den Zellen ohne N-Acetylcystein nach Bestrahlung mit D=7,5 Gy.

Zelllinie U87

Ebenfalls in der Zelllinie U87 hatte eine Vorbehandlung mit 10 mM und 20mM N-Acetylcystein keinen Einfluss auf die Apoptoserate in mit D = 3 Gy und D = 5 Gy bestrahlten Zellen (Abbildung 18).

In der Zelllinie U87 wie schon in der Zelllinie U251 konnte eine antioxidative Wirkung von N-Acetylcystein bei einer Dosis von D = 7,5 Gy beobachtet werden, denn die Apoptoserate war signifikant (P = 0,95) niedriger als in den ohne N-Acetylcystein bestrahlten Kontrollen. Eine protektive N-Acetylcystein-Wirkung wurde somit bestätigt.

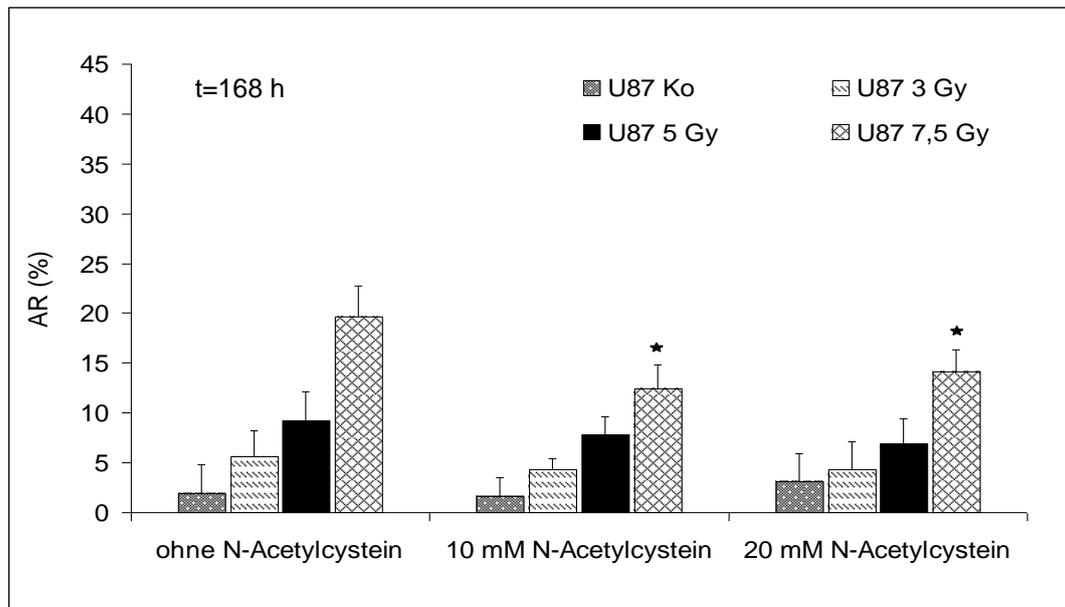


Abbildung 18 **Abbildung Apoptoserate nach Inkubation mit 10 mM oder 20 mM N-Acetylcystein und anschließender Bestrahlung mit D = 3 Gy, 5 Gy oder 7,5 Gy**

Apoptoserate AR (%) der Standardzelllinien U87 nach Inkubation mit 10 mM oder 20 mM N-Acetylcystein und anschließender Bestrahlung (D = 3 Gy, 5 Gy oder 7,5 Gy). Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(*) Signifikant niedrigere Apoptoserate als die Probe ohne N-Acetylcystein nach Bestrahlung mit D = 7,5 Gy.

Vergleich der Apoptoserate in den drei untersuchten Standardzelllinien nach Inkubation mit N-Acetylcystein und anschließender Bestrahlung

N-Acetylcystein wirkte in der Zelllinie U87 und U251 protektiv (antioxidativ) und verminderte die strahleninduzierte Apoptoserate. Dieser Effekt wurde erst bei einer Dosis von 7,5 Gy und unabhängig von den verwendeten Konzentrationen (10 mM und 20 mM) beobachtet.

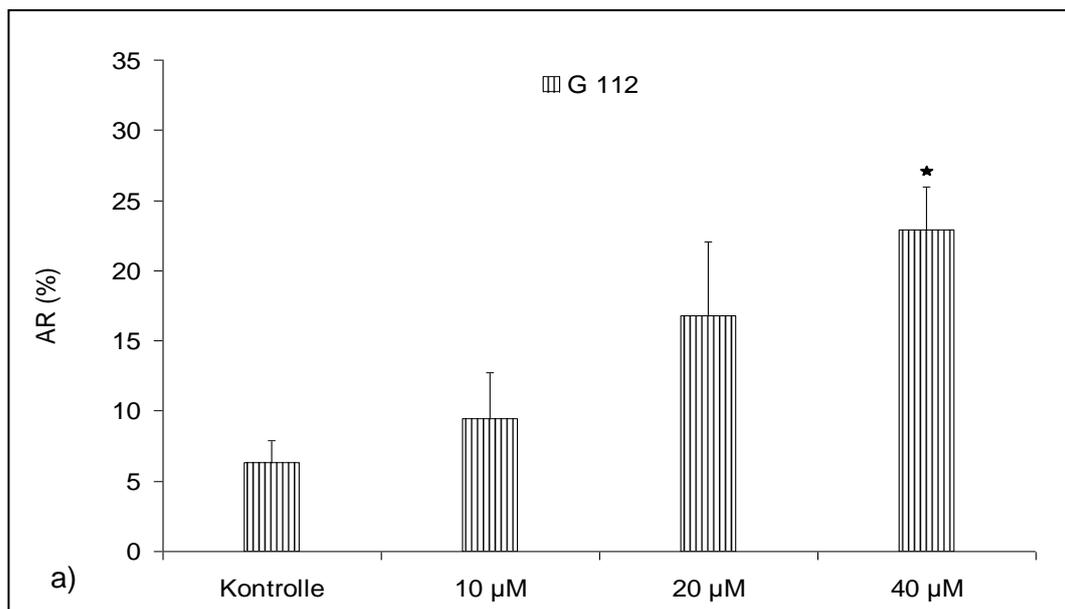
Im Unterschied zu den Zelllinien U87 und U251 wurde in der Zelllinie G112 unabhängig von den verwendeten Konzentrationen eine prooxidative und damit Strahlen sensibilisierende Wirkung vom N-Acetylcystein nach Bestrahlung mit D = 5 Gy und D = 7,5 Gy beobachtet.

4.3. Apoptoserate in Standardzellkulturen nach Behandlung mit Natriumseleinit im Vergleich mit Bestrahlung

Die Versuche mit N-Acetylcystein wiesen darauf hin, dass der oxidative Stress, also die indirekte Strahlenwirkung, eine signifikante Rolle in den untersuchten Zelllinien (Standardkultu-

ren) spielt. Die untersuchten Zellen zeigten eine ungleiche Reaktion auf die Bestrahlung unter N-Acetylcystein-Einwirkung. In zwei Zelllinien (U251, U87) schützte N-Acetylcystein, wie erwartet, vor strahleninduzierten oxidativen Schäden. Weil die Strahlenwirkungen generell auch durch direkte Ionisationen induziert werden, war die verminderte Apoptoserate höher im Vergleich mit unbestrahlten Kontrollen. In der Zelllinie G112 hingegen wirkte N-Acetylcystein prooxidativ. In weiteren Versuchen wurde deshalb Natriumselenit in hohen, prooxidativ wirkenden Konzentrationen verwendet, um die Wirkung von erhöhtem oxidativen Stress weiter zu untersuchen.

Alle drei Zelllinien wurden mit 10 μM , 20 μM oder 40 μM Natriumselenit 6 h lang behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass eine maximale Apoptoserate nach Behandlung mit 40 μM Natriumselenit in allen untersuchten Standardzelllinien nach 168 h erreicht wurde (Abbildung 19). Der Anstieg der Apoptoserate war im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen signifikant ($P = 0,95$). Die Apoptoserate in mit Natriumselenit behandelten Zellen wurde mit Zellen, die mit $D = 7,5$ Gy bestrahlt wurden, verglichen. Noch höhere Natriumselenit-Konzentrationen wirkten schon innerhalb der 6 h zytotoxisch. Die weiteren Versuche erfolgten deshalb mit 40 μM Natriumselenit.



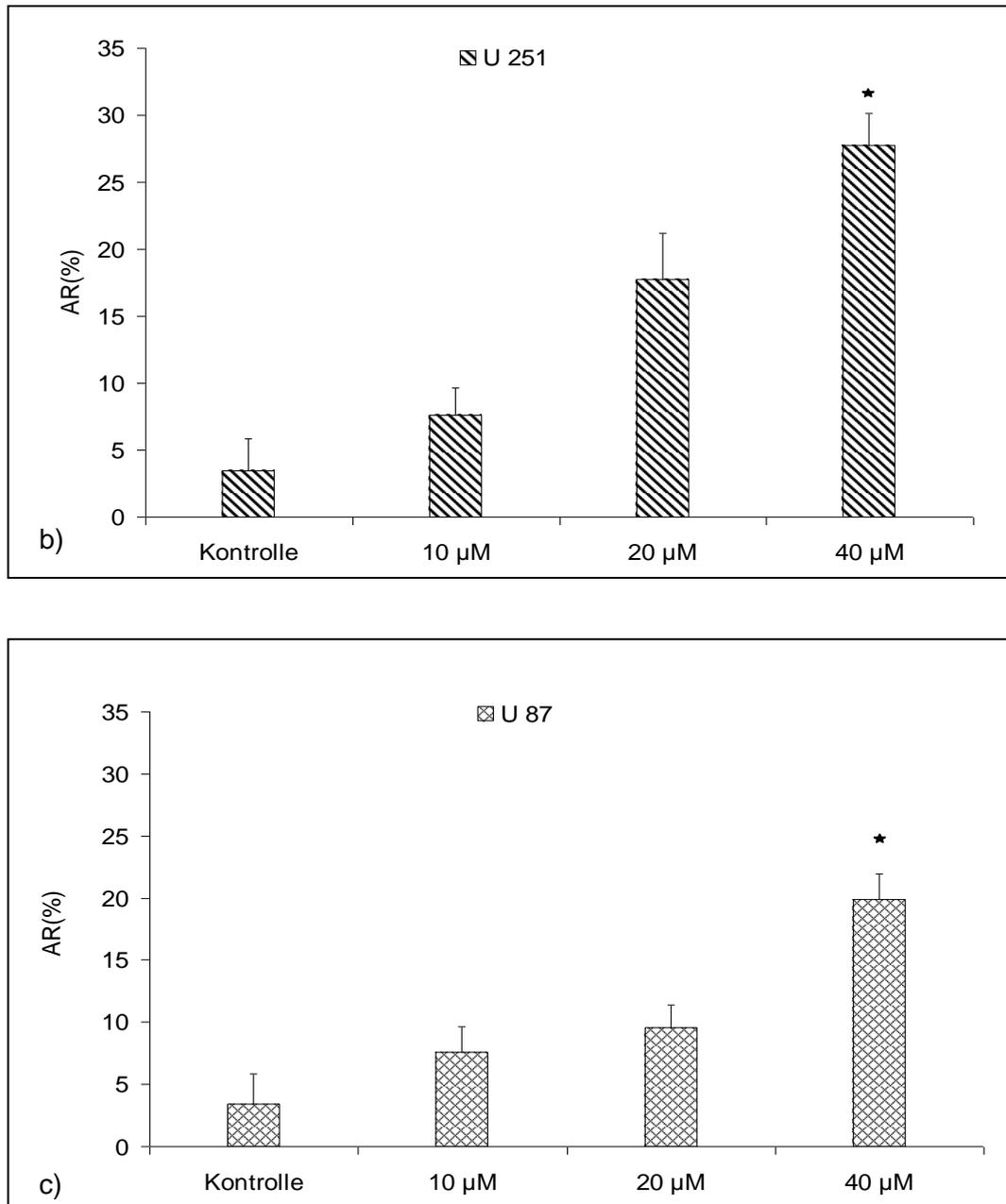


Abbildung 19 Apoptoserate nach Inkubation mit 10 µM, 20 µM oder 40 µM Natriumselenit in den Glioblastoma-multiforme-Standardzelllinien. a) G112, b) U251, c) U87

Apoptoserate AR (%) in mit Natriumselenit (10 µM, 20 µM, 40 µM) inkubierten Zellen, bestimmt nach 168 h. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(*) Signifikant höhere Apoptoserate als in der Kontrolle und in den mit 10 µM und 20 µM Natriumselenit behandelten Zellen.

Zelllinie G112

Eine signifikant höhere Apoptoserate in mit 40 μM Natriumselenit behandelten Proben im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zeigte sich bereits nach 24 h. Die Apoptoserate betrug nach einer Behandlung mit 40 μM Natriumselenit maximal 23 % (Abbildung 20).

Beim Vergleich der Apoptoserate nach Inkubation mit 40 μM Natriumselenit und Bestrahlung mit $D = 7,5$ Gy zeigte sich bereits nach 24 h eine signifikant höhere Anzahl an apoptotischen Zellen in den Proben, welche mit Natriumselenit behandelt wurden als in den bestrahlten Proben (Abbildung 20). Nach 48 h war dann die Anzahl an apoptotischen Zellen in den Proben nach Bestrahlung und Behandlung mit 40 μM Natriumselenit wieder etwa gleich hoch und blieb so auch nach 168 h (Abbildung 20). Mit 40 mM Natriumselenit konnte eine gleich große Apoptoserate induziert werden wie mit einer Dosis von 7,5 Gy. Die Apoptose wurde mit Natriumselenit schon früher als mit Strahlung induziert.

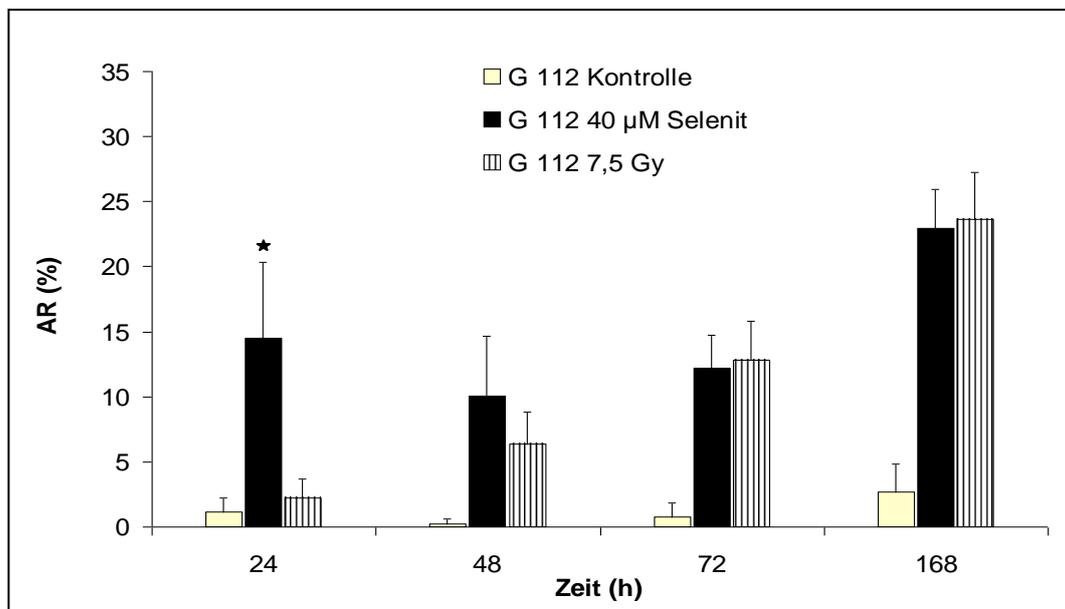


Abbildung 20 Apoptoserate nach Inkubation mit 40 μM Natriumselenit sowie nach Bestrahlung mit $D = 7,5$ Gy in der Glioblastoma-multiforme-Standardzelllinie G112.

Apoptoserate AR (%) in unbehandelten Kontrollen, in mit 40 μM Natriumselenit behandelten Zellen sowie in bestrahlten ($D = 7,5$ Gy) Zellen, bestimmt 24 h bis 168 h nach Behandlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(*) Signifikant höhere Apoptoserate in der mit 40 μM Natriumselenit behandelten Probe als in der mit $D = 7,5$ Gy bestrahlten Probe.

Zelllinie U251

In den Proben, welche mit Natriumselenit inkubiert wurden, waren nach 24 h, 72 h und 168 h signifikant höhere Apoptoseraten als in den unbehandelten Kontrollen nachweisbar. Die höchste Apoptoserate wurde mit 40 μM Natriumselenit schon ab 72 h beobachtet und blieb gleich hoch bis 168 h (Abbildung 21).

Der Vergleich der Apoptoserate nach Inkubation mit 40 μM Natriumselenit und Bestrahlung mit $D = 7,5$ Gy zeigte eine signifikant höhere Anzahl an apoptotischen Zellen in den mit Natriumselenit behandelten Proben nach 24 h sowie nach 72 h. Zum Zeitpunkt 168 h nach Bestrahlung bzw. Inkubation mit Natriumselenit war die Anzahl an apoptotischen Zellen etwa gleich hoch (Abbildung 21). Auch in dieser Zelllinie induzierte 40 mM Natriumselenit die Apoptose schneller und gleich wirksam im Vergleich mit Bestrahlung mit $D = 7,5$ Gy.

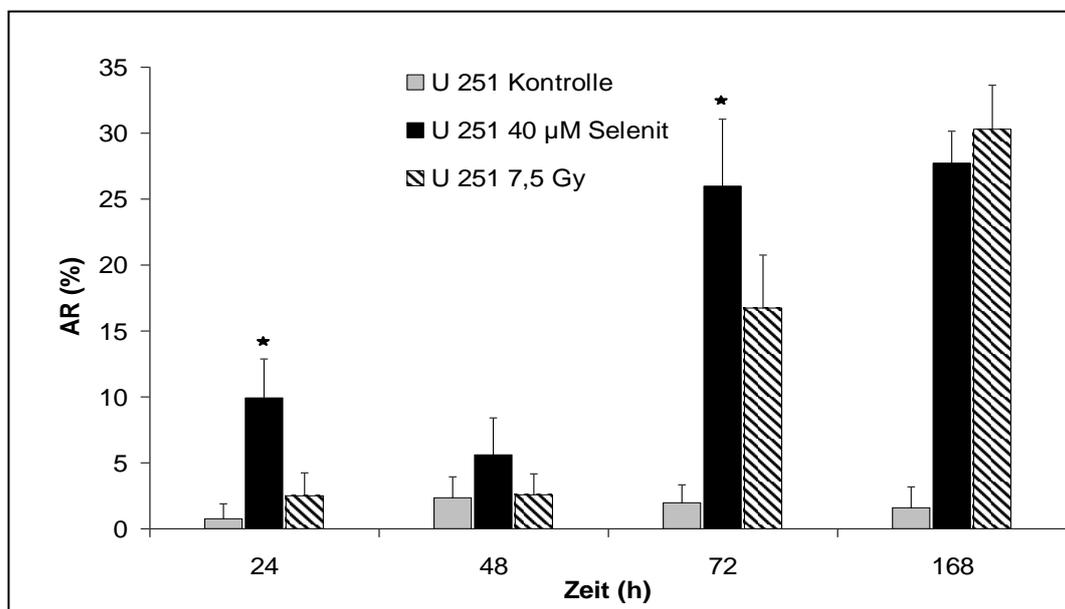


Abbildung 21 Apoptoserate nach Inkubation mit 40 μM Natriumselenit sowie nach Bestrahlung mit $D = 7,5$ Gy in der Glioblastoma-multiforme-Standardzelllinie U251.

Apoptoserate AR (%) in unbehandelten Kontrollen, in mit 40 μM Natriumselenit behandelten Zellen sowie in bestrahlten ($D = 7,5$ Gy) Zellen, bestimmt 24 h bis 168 h nach Behandlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(*) Signifikant höhere Apoptoserate in der mit 40 μM Natriumselenit behandelten Probe als in der mit $D = 7,5$ Gy bestrahlten Probe.

Zelllinie U87

Bereits 24 h nach Behandlung mit Natriumselenit zeigte sich in der Zelllinie U87 eine signifikant höhere Apoptoserate im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 22). Die höchste Apoptoserate wurde erst nach 168 h bei einer Natriumselenitkonzentration von 40 μM erreicht (Abbildung 22). Zum Zeitpunkt 168 h war die Anzahl an apoptotischen Zellen bei beiden Behandlungsmethoden etwa gleich hoch (Abbildung 22). Auch in dieser Zelllinie konnte 40 μM Natriumselenit gleiche Apoptoserate induzieren wie die Bestrahlung mit $D = 7,5$ Gy.

Der Vergleich der Apoptoserate nach Inkubation mit 40 μM Natriumselenit und Bestrahlung mit $D = 7,5$ Gy zeigte eine signifikant höhere Anzahl an apoptotischen Zellen in den mit Natriumselenit behandelten Proben nach 24 h, 48 h sowie nach 72 h (Abbildung 22).

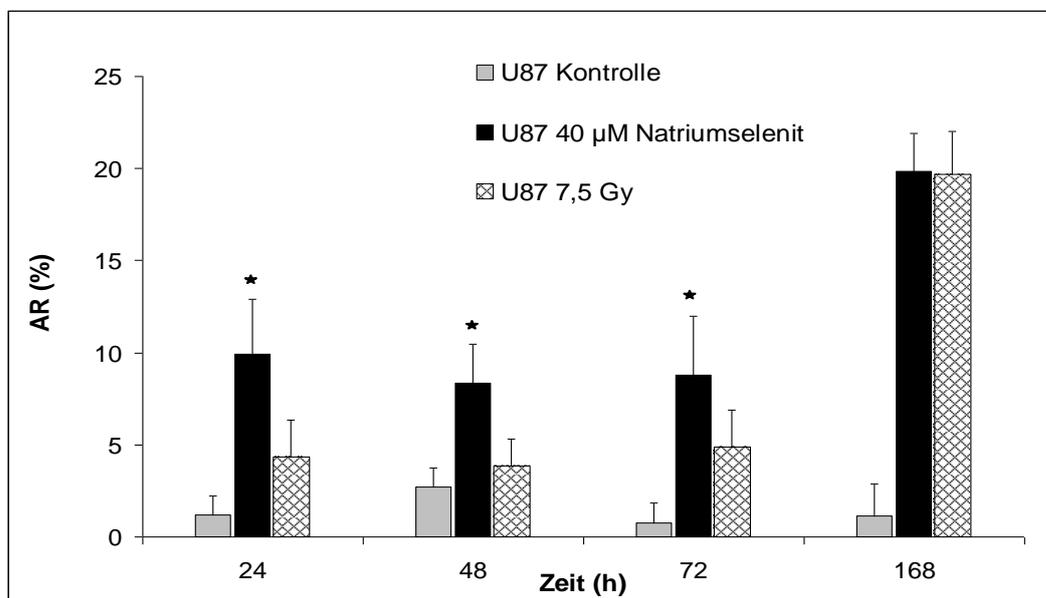


Abbildung 22 Apoptoserate nach Inkubation mit 40 μM Natriumselenit sowie nach Bestrahlung mit $D = 7,5$ Gy in der Glioblastoma-multiforme-Standardzelllinie U87.

Apoptoserate AR (%) in unbehandelten Kontrollen, in mit 40 μM Natriumselenit behandelten Zellen sowie in bestrahlten ($D = 7,5$ Gy) Zellen, bestimmt 24 h bis 168 h nach Behandlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(*) Signifikant höhere Apoptoserate in der mit 40 μM Natriumselenit behandelten Probe als in der mit $D = 7,5$ Gy bestrahlten Probe.

Vergleich der Apoptoserate in den 3 Standardzelllinien nach 6 h-Behandlung mit Natriumselenit

In allen drei untersuchten Zelllinien zeigte sich schon nach 24 h ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate, bei den mit Natriumselenit behandelten Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben.

Dabei führte die Natriumselenit-Behandlung in der Zelllinie U251 zu einer signifikant höheren Wirkung als in den Zelllinien G112 und U87. Die Apoptoserate stieg bei dieser Zelllinie auf etwa 30 % im Vergleich zu etwa 20 % bei den beiden anderen Zelllinien.

Der Anstieg der Apoptoserate nach Behandlung mit Natriumselenit war in allen untersuchten Zelllinien früher zu beobachten als in bestrahlten Zellen. Nach 168 h waren die Apoptoseraten in mit Natriumselenit behandelten oder in bestrahlten Zellen gleich (Abbildung 20-22).

4.4. Strahleninduzierte Apoptoserate in Stammzellkulturen

In allen drei Stammzelllinien wurden nach einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung die für die Apoptose typischen morphologischen Zellkernveränderungen beobachtet. Die unbehandelten Kontrollen bei allen drei untersuchten Zelllinien wiesen im Versuchsverlauf etwa 1-5 % apoptotische Zellen auf.

Zelllinie G112 Sp

Bereits 24 h nach Bestrahlung mit $D = 7,5$ Gy wurde im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen in den bestrahlten Proben der Stammzelllinie G112 Sp eine signifikant ($P = 0,95$) höhere Apoptoserate beobachtet. Die dabei erreichte Apoptoserate von etwa 9 % blieb bis 144 h nach Bestrahlung gleich, danach erfolgte ein weiterer Anstieg der Apoptoserate auf etwa 17 % bei 168 h nach Bestrahlung. Auf diesem Niveau blieb die Apoptoserate bis 336 h nach Bestrahlung (Abbildung 23).

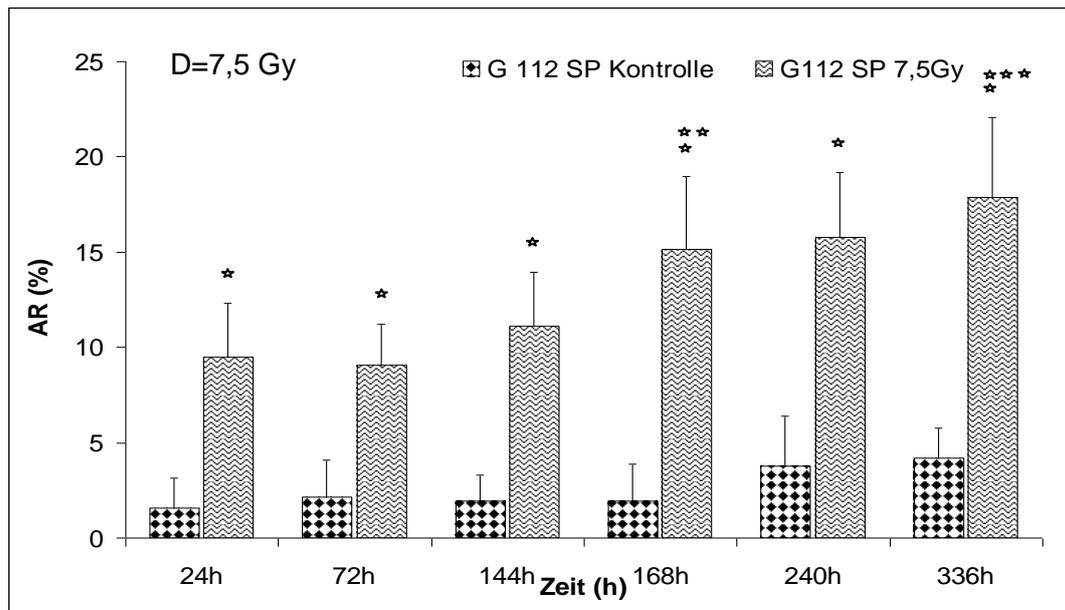


Abbildung 23 Apoptoserate in Glioblastoma-multiforme-Stammzellen nach Bestrahlung mit D = 7,5 Gy

Apoptoserate AR (%) in unbestrahlten Kontrollen und in bestrahlten (D = 7,5 Gy) Zellen, bestimmt 24 h bis 336 h nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(*) Signifikanter Unterschied der Apoptoserate im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

(**) Signifikanter Unterschied der Apoptoserate im Vergleich zur Probe 24 h nach Bestrahlung.

(***) Signifikanter Unterschied der Apoptoserate im Vergleich zur Probe 144 h nach Bestrahlung.

Zelllinie U251 Sp

Die Anzahl an apoptotischen Zellen stieg in der Linie U251 Sp zunächst nur leicht gegenüber der Kontrolle an. Ein signifikanter Unterschied der Apoptoserate in den bestrahlten und unbestrahlten Proben konnte erst 168 h nach Bestrahlung beobachtet werden (Abbildung 24). In der Stammzelllinie U251 Sp stieg die Apoptoserate 168 h bis 336 h nach Bestrahlung nochmals leicht an und betrug 336 h nach Bestrahlung etwa 10 % (Abbildung 24).

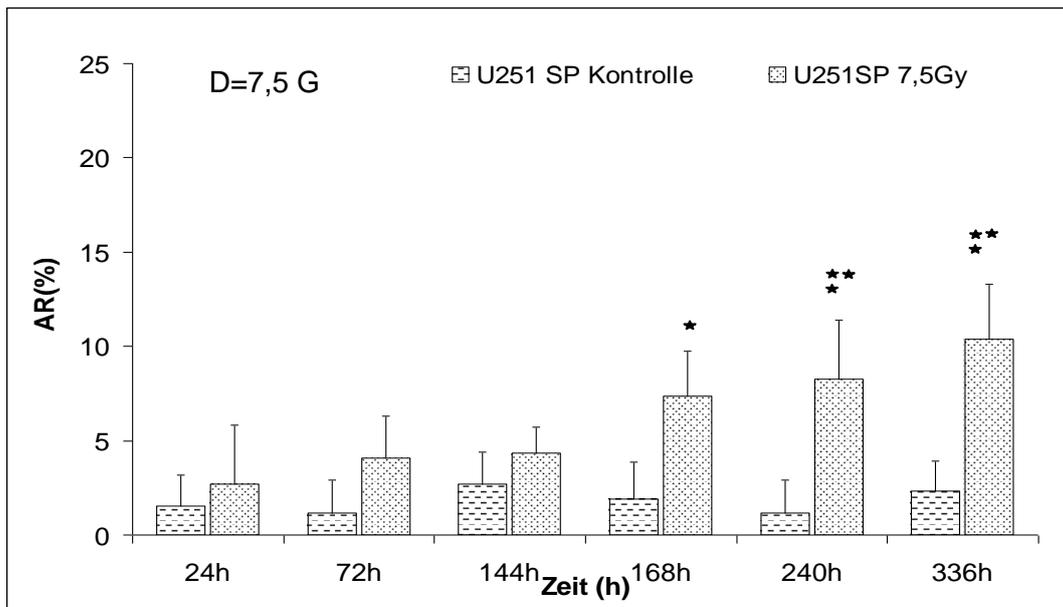


Abbildung 24 Apoptoserate in Glioblastoma-multiforme-Stammzellen nach Bestrahlung mit D = 7,5 Gy

Apoptoserate AR (%) in unbestrahlten Kontrollen und in bestrahlten (D = 7,5 Gy) Zellen, bestimmt 24 h bis 336 h nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(*) Signifikanter Unterschied der Apoptoserate im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

(**) Signifikanter Unterschied der Apoptoserate im Vergleich zur Probe 144 h nach Bestrahlung.

Zelllinie U87 Sp

Ein signifikanter Unterschied der Apoptoseraten in den bestrahlten und unbestrahlten Proben konnte in der Stammzelllinie U87 Sp 72 h nach Bestrahlung beobachtet werden (Abbildung 25). Die höchste Apoptoserate wurde 144 h nach Bestrahlung erreicht und blieb in etwa auf diesem Niveau bis 336 h nach Bestrahlung.

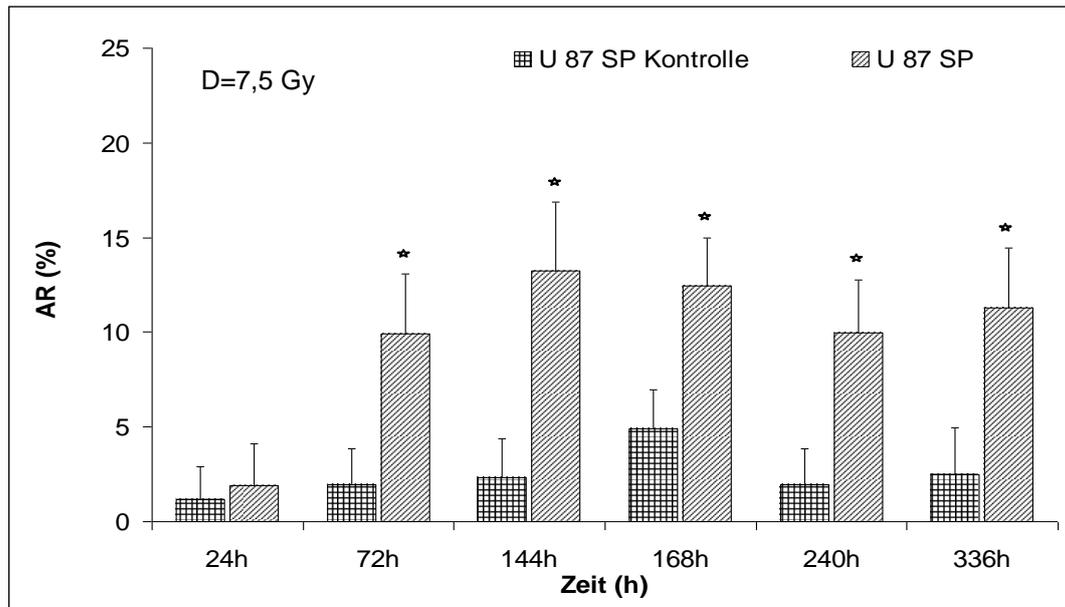


Abbildung 25 Apoptoserate in Glioblastoma-multiforme-Stammzellen nach Bestrahlung mit D = 7,5 Gy

Apoptoserate AR (%) in unbestrahlten Kontrollen und in bestrahlten (D = 7,5 Gy) Zellen, bestimmt 24 h bis 336 h nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

(*) Signifikanter Unterschied der Apoptoserate im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

Vergleich der Apoptoserate in den 3 untersuchten Stammzelllinien nach Bestrahlung

Jede der untersuchten Stammzelllinien reagierte nach Bestrahlung mit D = 7,5 Gy unterschiedlich. Am empfindlichsten reagierte die Stammzelllinie G112 Sp. Diese zeigte schon 24 h nach Bestrahlung, eine signifikant höhere Apoptoserate im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die maximale Apoptoserate betrug in dieser Zelllinie etwa 20 %. Bei den anderen Stammzelllinien wurde eine maximale Apoptoserate von etwa 10 % erreicht.

4.5. Vergleich der strahleninduzierten Apoptoserate in Standardzellkulturen und Stammzellkulturen

G112/G112 Sp

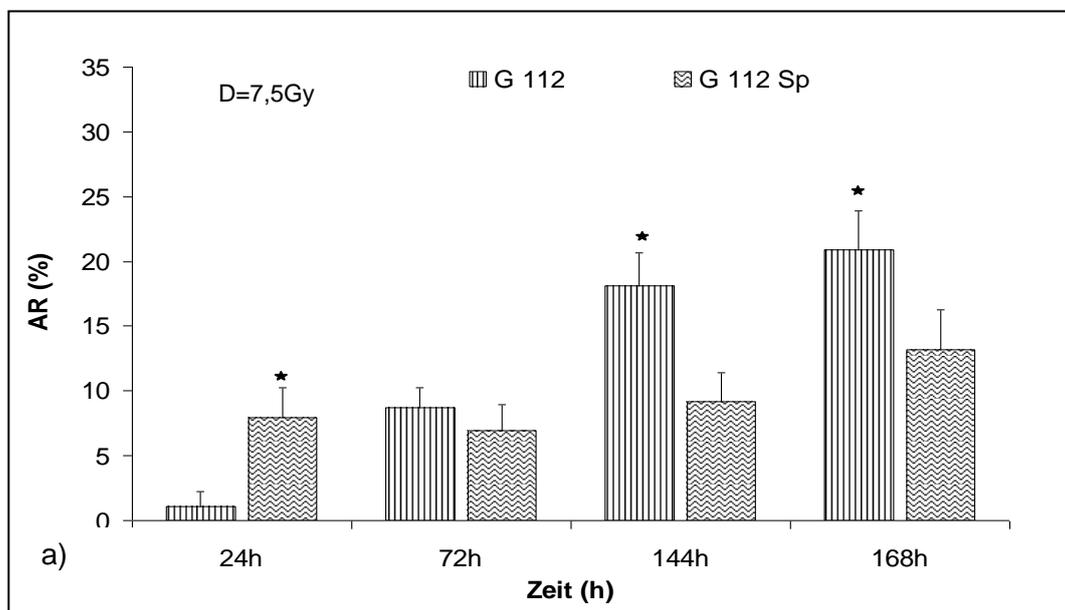
Die Standardzelllinie G112 reagierte auf die Bestrahlung langsamer als die entsprechende Stammzelllinie, zeigte dann aber 144 h post radiatio eine höhere Apoptoserate als die Stammzellen G112 Sp (Abbildung 26a). Bei den Stammzellen stieg die Apoptoserate bereits 24 h nach Bestrahlung an. Die höchste Apoptoserate von etwa 20% wurde in der Standardzelllinie G112 168 h nach Bestrahlung beobachtet.

U251/ U251 Sp

Bei der Standardzelllinie U251 zeigte sich im Vergleich zu den entsprechenden Stammzellen eine signifikant höhere Anzahl an apoptotischen Zellen erstmals 72 h nach Bestrahlung (Abbildung 26b). Die maximale Apoptoserate von etwa 23% wurde in der Standardzellkultur U251 zum Zeitpunkt 168 h nach Bestrahlung beobachtet.

U87/ U87 Sp

Eine signifikant höhere Apoptoserate in der Standardzellkultur U 87 konnte 144 h nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Bis 72 h nach Bestrahlung zeigten die Stammzellen eine signifikant ($P = 0,95$) höhere Apoptoserate als die Standardkulturen (Abbildung 26c). Die höchste Apoptoserate von etwa 19% wurde in der Standardzelllinie U87 168 h nach Bestrahlung beobachtet.



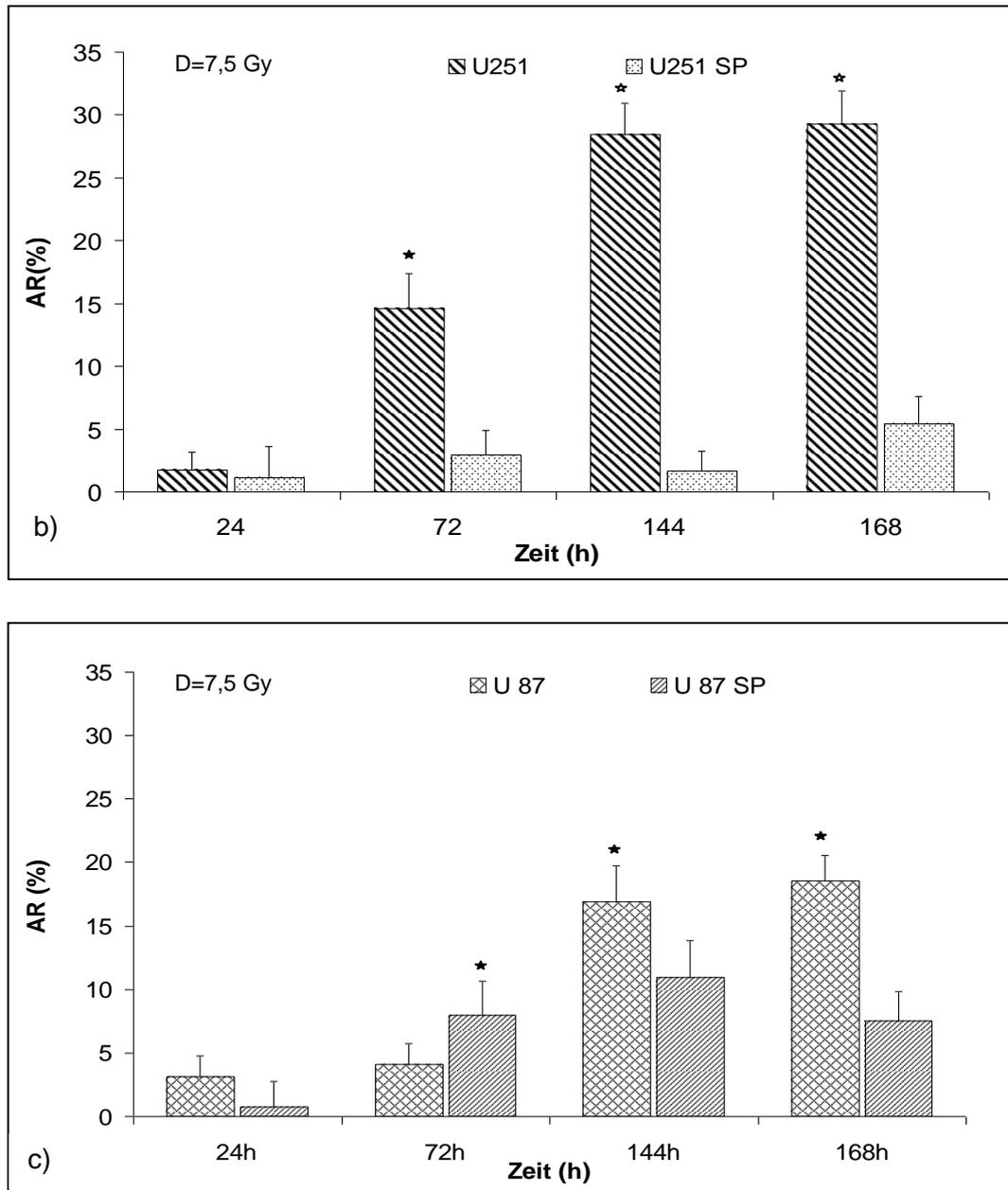


Abbildung 26 Vergleich der Apoptoserate in Standardkulturen und Stammzellen nach Bestrahlung mit D=7,5 Gy im zeitlichen Verlauf. a) G112/G112 Sp, b) U251/U251Sp, c) U87/U87 Sp

Apoptoserate AR (%) nach Bestrahlung mit D = 7,5 Gy in Standardkulturen und Stammzellen, bestimmt 24-168 h nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichung.

(*) Signifikanter Unterschied der Apoptoserate im Vergleich zur anderen Zelllinie zum selben Zeitpunkt.

Zusammenfassend zeigte sich in den durchgeführten Versuchen, dass in den Standardzellkulturen durch Bestrahlung mit D = 7,5 Gy höhere Apoptoseraten induziert werden konnten als in den entsprechenden Stammzellkulturen. Alle drei untersuchten Stammzellkulturen er-

wiesen sich also in Bezug auf strahleninduzierte Apoptose als resistenter im Vergleich zu den entsprechenden Standardzelllinien. Der größte Unterschied wurde in der Zelllinie U251 beobachtet.

4.6. Morphologische Bestimmung von Mehrkernigkeit

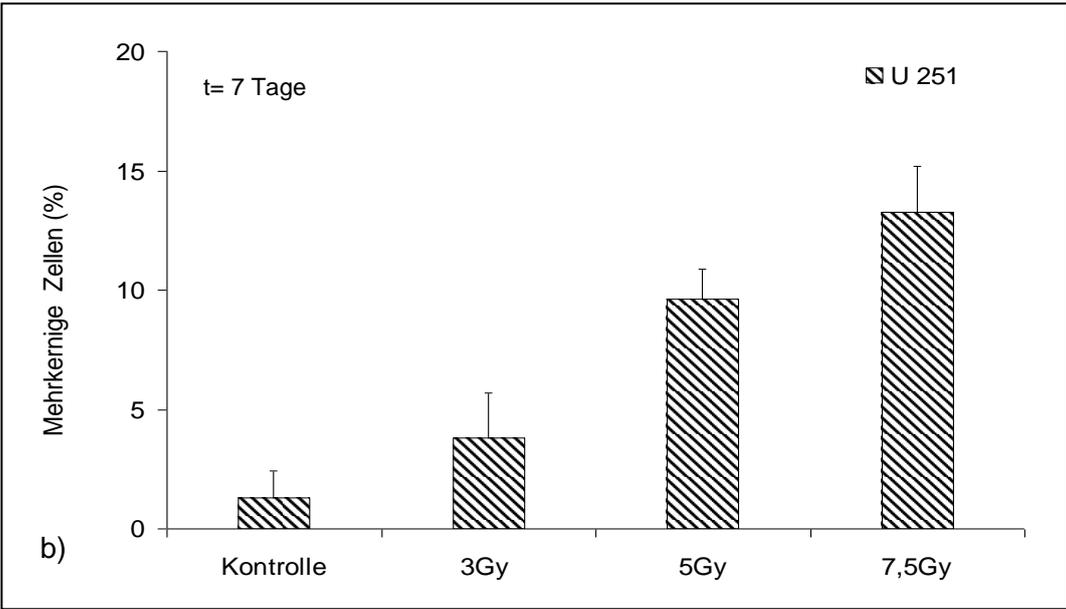
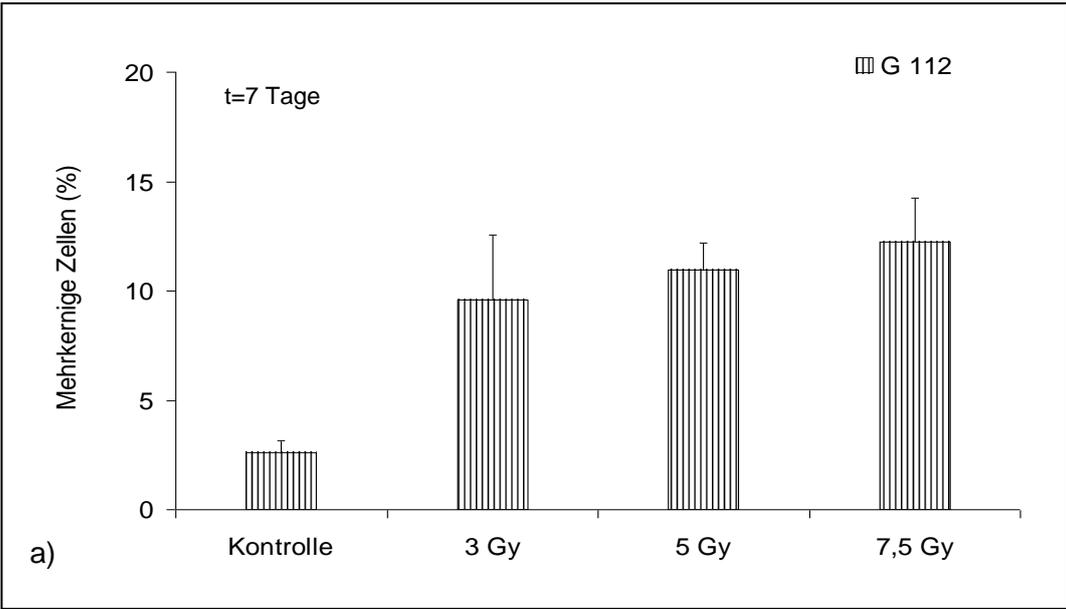
Die morphologische Bestimmung der Mehrkernigkeit erfolgte im 24-h-Rhythmus bis zum 28. Tag nach Bestrahlung. Dazu wurden die fixierten Zellen entsprechend angefärbt und anschließend bei 650-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Als mehrkernig galt eine Zelle, die mindestens zwei runde, etwa gleich große und gut voneinander abgrenzbare Kerne im Zytoplasma aufwies.

4.6.1. Strahleninduzierte Mehrkernigkeit in Standardzellkulturen

In allen drei untersuchten Standardkulturzelllinien wurde nach Bestrahlung eine im Vergleich mit unbestrahlten Kontrollen erhöhte Anzahl an mehrkernigen Zellen beobachtet (Abbildung 27). In jeder der drei untersuchten Zelllinien wurde die maximale Anzahl an mehrkernigen Zellen (etwa 12%) nach Bestrahlung mit $D=7,5$ Gy beobachtet. Deshalb wurden alle weiteren Versuche mit einer Bestrahlungsdosis von $D=7,5$ Gy über einen längeren Beobachtungszeitraum (1-28 Tage) durchgeführt.

In der Zelllinie G112 stieg die Anzahl von mehrkernigen Zellen 7 Tage nach Bestrahlung dosisunabhängig (3, 5 und 7,5 Gy) an. Anders reagierten die Zellen der Zelllinien U251 und U87. Sie zeigten einen dosisabhängigen Anstieg der mehrkernigen Zellen 7 Tage nach Bestrahlung (Abbildung 27b und Abbildung 27c).

Etwa 10 Tage nach Bestrahlung sank in allen Standardzelllinien der Anteil an mehrkernigen Zellen (Abbildung 28). Nach 20 bis 28 Tagen sank der Anteil an mehrkernigen Zellen ungefähr auf das Niveau in unbestrahlten Zellen. In den unbestrahlten Kontrollen konnte in allen drei untersuchten Zelllinien ein Anteil von 1-5 % an mehrkernigen Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 28).



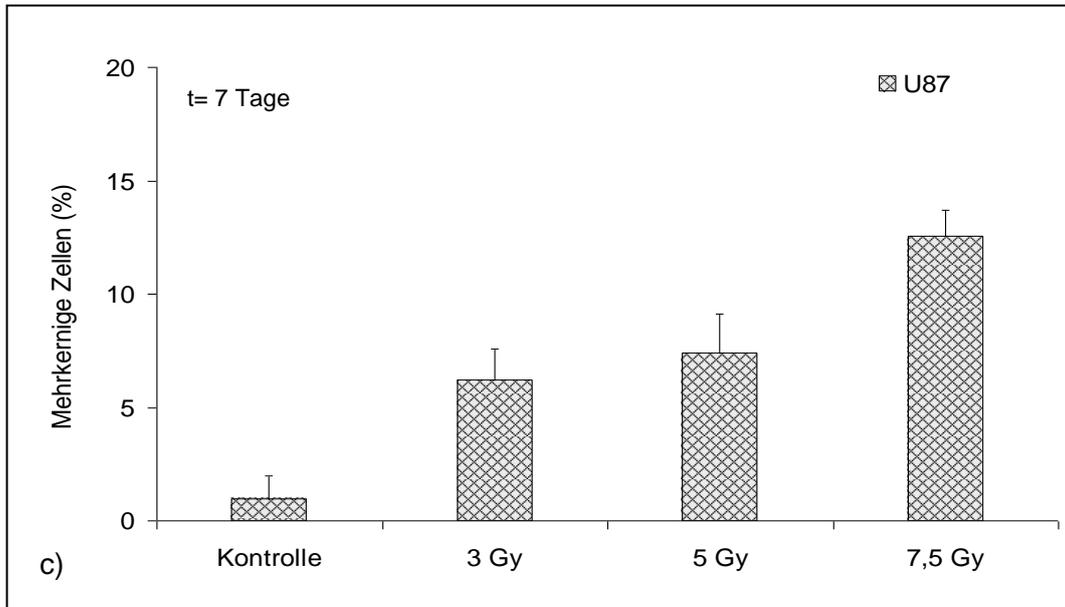
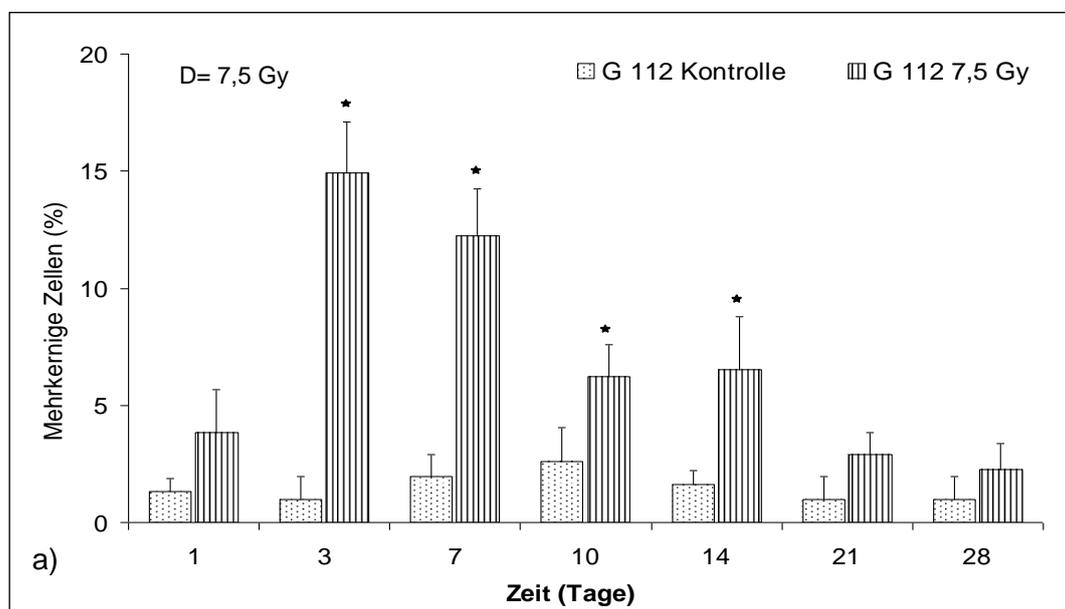


Abbildung 27 Vergleich der Anzahl mehrkerniger Zellen nach Bestrahlung mit $D=3$ Gy, 5 Gy oder 7,5 Gy in den Standardzelllinien G112, U251 und U87.

Anzahl mehrkerniger Zellen nach Bestrahlung mit $D=3$ Gy, 5 Gy und 7,5 Gy, bestimmt 7 Tage nach Bestrahlung.



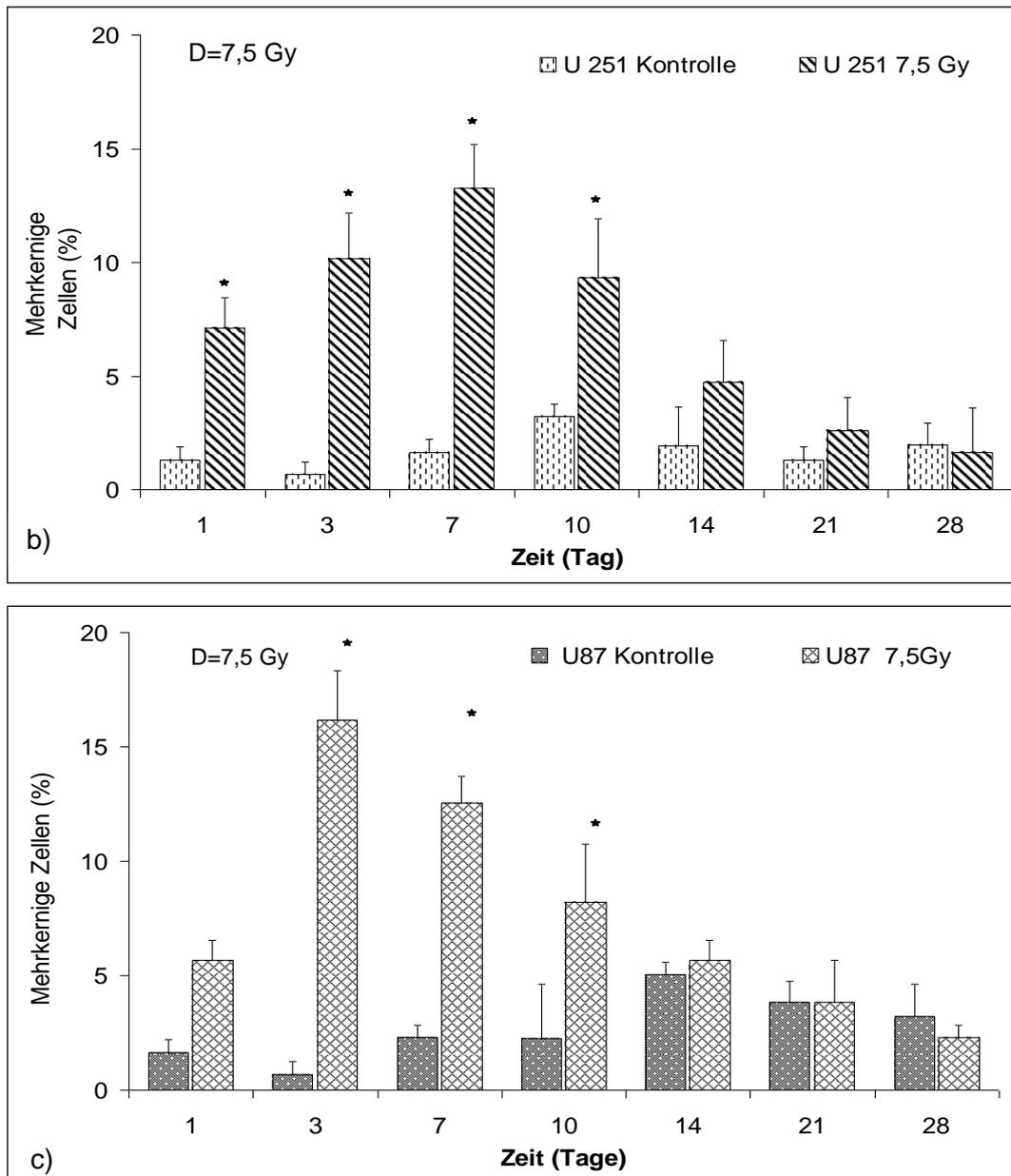


Abbildung 28 Anzahl mehrkerniger Zellen nach Bestrahlung mit D=7,5 Gy in Standardzelllinien im zeitlichen Verlauf. a) G112, b) U251, c) U87.

Anzahl mehrkerniger Zellen nach Bestrahlung mit D=7,5 Gy, bestimmt 1-28 Tage nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichung.

(*) Signifikant höhere Anzahl an mehrkernigen Zellen als in der Kontrolle.

4.6.2. Strahleninduzierte Mehrkernigkeit in Standardzellkulturen nach Inkubation mit N-Acetylcystein

Die konfluenten Zellen wurden 3 h vor Bestrahlung mit N-Acetylcystein in den Konzentrationen 1 mM, 5 mM, 20 mM oder 40 mM inkubiert. Die Bestrahlung erfolgte mit D = 7,5 Gy.

In Zelllinien U 251 und U 87 konnte 7 Tage nach Vorbehandlung mit N-Acetylcystein (5 mM, 20 mM oder 40 mM) und anschließender Bestrahlung eine erhöhte Anzahl mehrkerniger Zellen beobachtet werden (Abbildung 29). In der Zelllinie G 112 war bei allen Konzentrationen keine Wirkung zu beobachten. Eine Vorbehandlung mit 1 mM N-Acetylcystein wirkte protektiv in den Zelllinien U 251 und U 87 d. h., die Anzahl an mehrkernigen Zellen war leicht, aber signifikant ($P = 0,95$) vermindert.

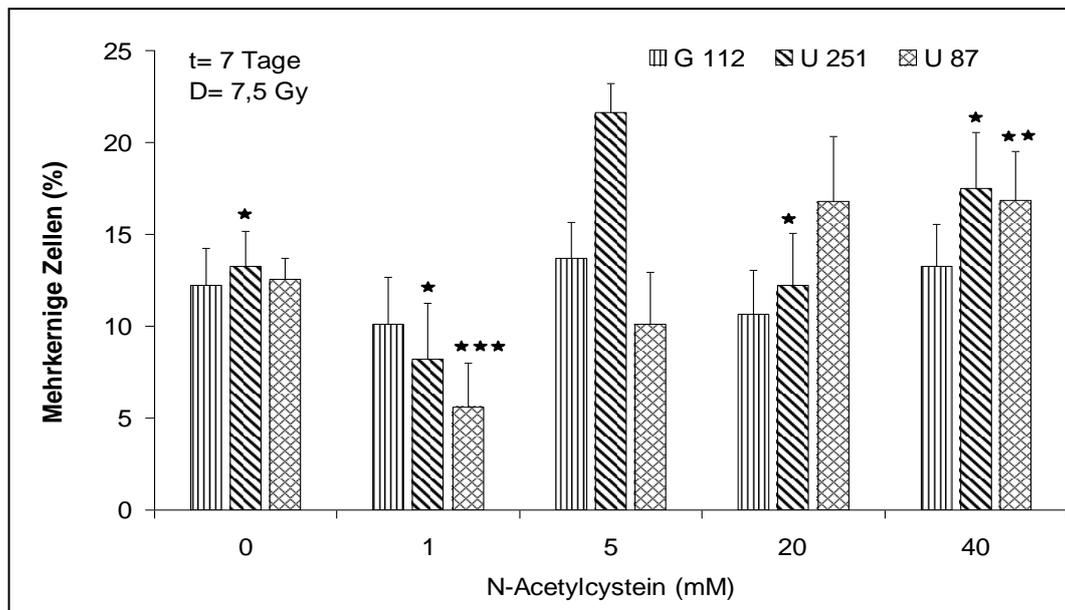


Abbildung 29 Vergleich des Anteils an mehrkernigen Zellen in Standardkulturen nach Vorbehandlung mit N-Acetylcystein und anschließender Bestrahlung mit $D=7,5$ Gy.

Anteil mehrkerniger Zellen (%) in unbehandelten Kontrollen sowie in Proben nach Vorbehandlung mit 1 mM, 5 mM, 20 mM oder 40 mM N-Acetylcystein und anschließender Bestrahlung mit $D=7,5$ Gy, bestimmt 7 Tage nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichung.

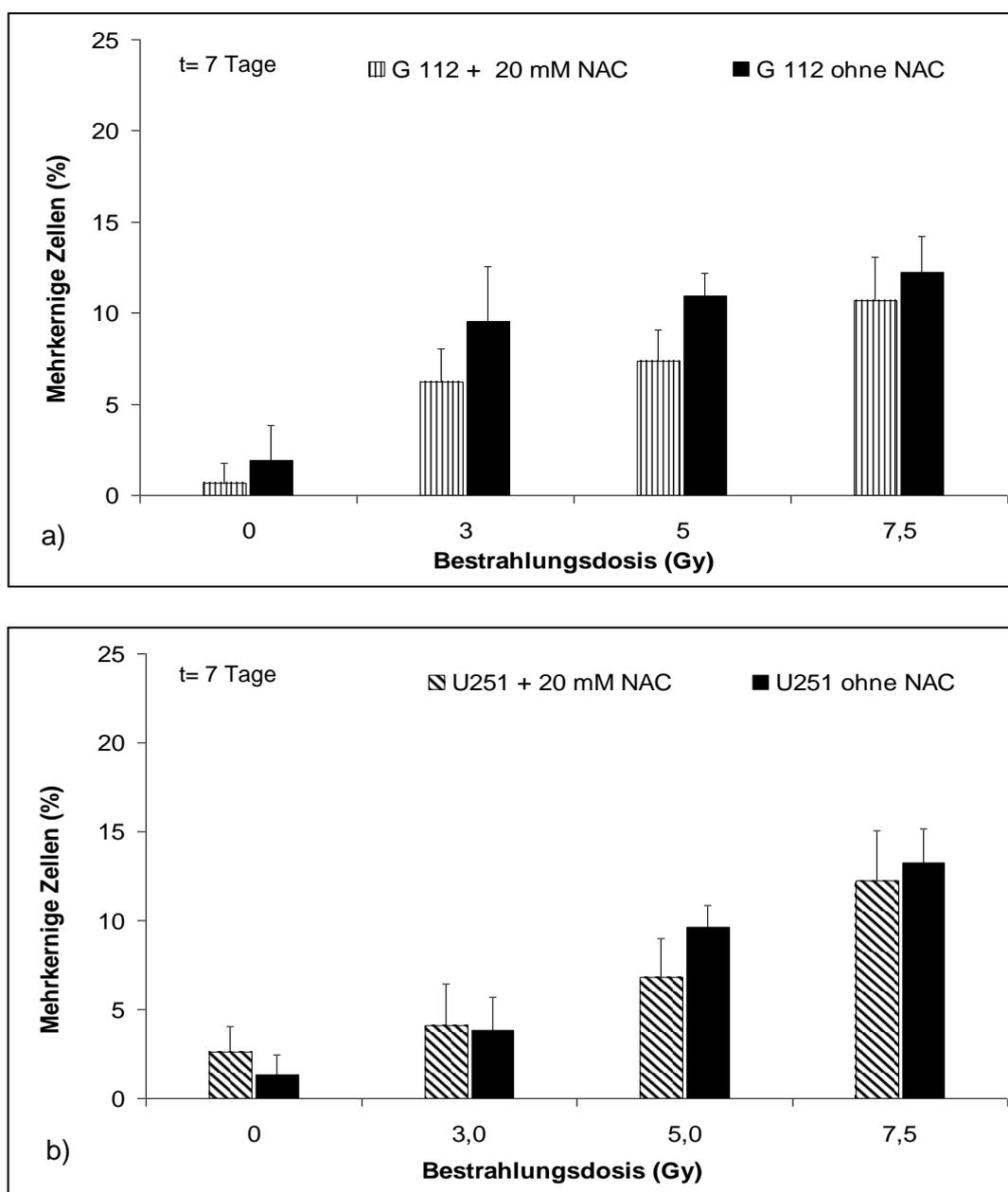
(*) Signifikanter ($P=0,95$) Unterschied in der Anzahl an mehrkernigen Zellen im Vergleich zur Probe derselben Zelllinie nach Inkubation mit 5 mM N-Acetylcystein.

(**) Signifikant ($P=0,95$) höhere Anzahl an mehrkernigen Zellen als die Probe derselben Zelllinie nach Inkubation mit 1 mM N-Acetylcystein.

(***) Signifikant ($P=0,95$) höhere Anzahl an mehrkernigen Zellen als die Probe derselben Zelllinie nach Inkubation mit 20 mM und 40 mM N-Acetylcystein.

In einem weiterführenden Versuch wurde die Wirkung einer Vorbehandlung der Zellen mit 20 mM N-Acetylcystein auch bei niedrigeren Dosen untersucht. Die Bestrahlung erfolgte mit $D = 3 \text{ Gy}$, 5 Gy oder $7,5 \text{ Gy}$. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

Die Anzahl an mehrkernigen Zellen sank in den Zelllinien G112 und U251 nach Inkubation mit 20 mM N-Acetylcystein und Bestrahlung mit $D=3 \text{ Gy}$, 5 Gy oder $7,5 \text{ Gy}$ nur geringfügig gegenüber den Proben, die nur bestrahlt wurden. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 30a und Abbildung 30b). Indessen stieg in der Zelllinie U87 die Anzahl an mehrkernigen Zellen unwesentlich nach Inkubation mit 20 mM N-Acetylcystein und anschließender Bestrahlung an. Auch dieser Anstieg war nicht signifikant (Abbildung 30c).



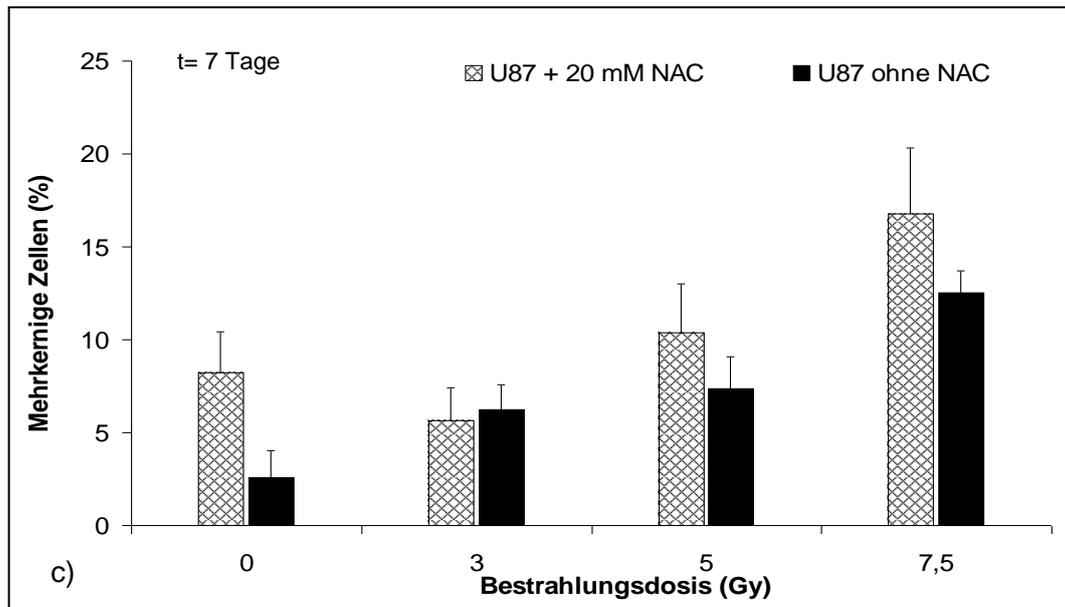


Abbildung 30 Vergleich des Anteils an mehrkernigen Zellen in Glioblastoma-multiforme-Standardzelllinien nach Vorbehandlung mit 20 mM N-Acetylcystein und anschließender Bestrahlung. a) G112, b) U251, c) U87.

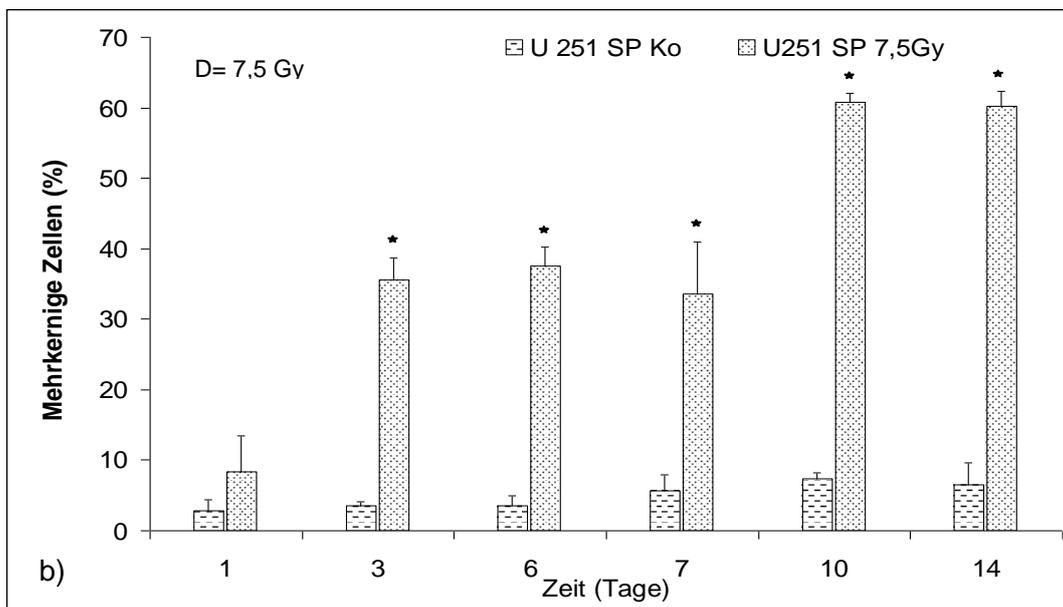
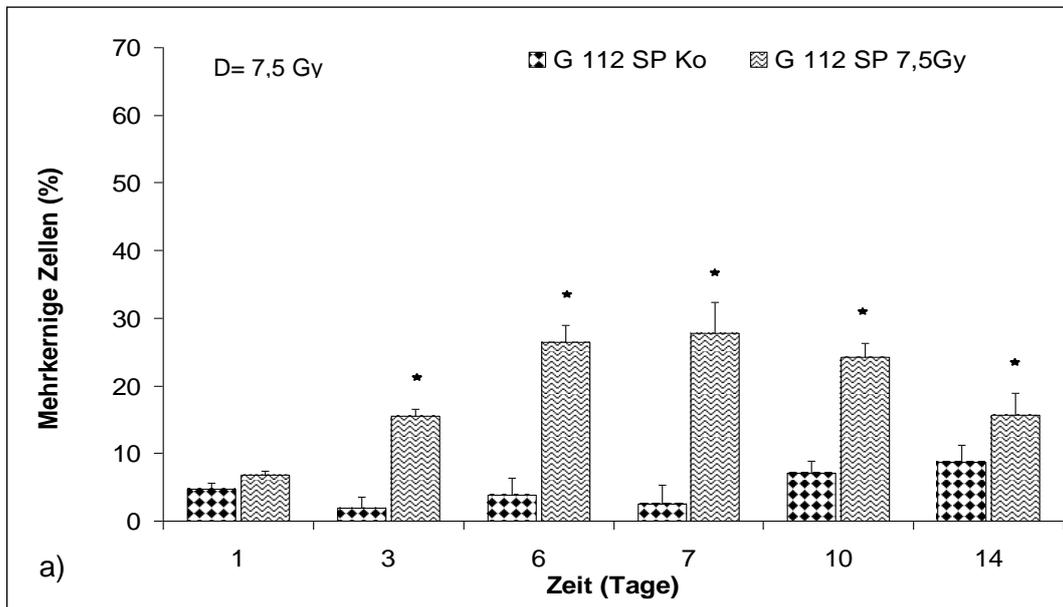
Anteil an mehrkernigen Zellen nach Inkubation mit 20 mM N-Acetylcystein und anschließender Bestrahlung mit $D = 3$ Gy, 5 Gy oder 7,5 Gy, bestimmt 7 Tage nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichung.

4.6.3. Strahleninduzierte Mehrkernigkeit in Stammzellkulturen

In allen drei untersuchten Stammzelllinien konnten nach Bestrahlung mit $D = 7,5$ Gy ein Anstieg der relativen Anteile an mehrkernigen Zellen beobachtet werden. In unbestrahlten Kontrollen lag der Anteil an mehrkernigen Zellen zwischen 3 und 9 % (Abbildung 31a-c).

Bei den Zelllinien G112 und U251 war bereits 3 Tage nach der Bestrahlung ein signifikanter Anstieg der Anzahl mehrkerniger Zellen nachweisbar (Abbildung 31a). Die maximale Anzahl an mehrkernigen Zellen lag in der Stammzelllinie G112 Sp 7 Tage nach Bestrahlung bei etwa 27 %. Nach 10 Tagen sank die Mehrkernigkeit in der Zelllinie G112 wieder, erreichte jedoch bis zum Ende des Versuches nicht das Kontrollniveau. Bei den Stammzellen der Zelllinie U251 blieb zunächst die Anzahl an mehrkernigen Zellen bis 7 Tage nach Bestrahlung etwa konstant (etwa 33-37 %). Nach 10 Tagen erfolgte ein sprunghafter Anstieg auf etwa 60% (Abbildung 31b). Ein Rückgang der mehrkernigen Zellen konnte im Versuchsverlauf bis 14 Tage nach Bestrahlung in der Zelllinie U251 nicht beobachtet werden. In den bestrahlten Stammzellen der Zelllinie U87 zeigte sich 10 Tage nach Bestrahlung mit 7,5 Gy ein signifi-

kanter Anstieg des Anteils an mehrkernigen Zellen bis auf 29 % (Abbildung 31c). Dieser Anteil blieb bis zum Ende des Versuchs (14 Tage) unverändert.



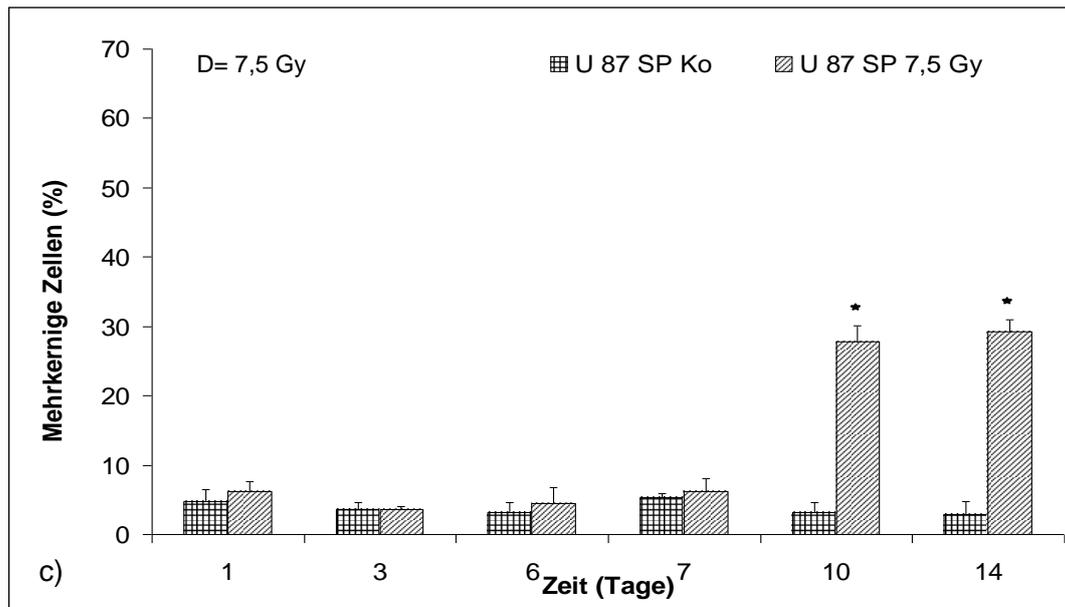


Abbildung 31 Anteil mehrkerniger Zellen nach Bestrahlung mit D=7,5 Gy in Glioblastoma multiforme Stammzelllinien a) G112 Sp, b) U251 Sp, c) U87 Sp.

Anzahl mehrkerniger Zellen nach Bestrahlung mit D=7,5 Gy, bestimmt 1-14 Tage nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichung.

(*) Signifikant höhere Anzahl an mehrkernigen Zellen als die Kontrolle.

4.6.4. Vergleich der strahleninduzierten Mehrkernigkeit in Standardzellkulturen und in Stammzellkulturen

G112/G112 Sp

Bereits 7 Tage nach Bestrahlung bildeten die Stammzellen einen signifikant höheren Anteil an mehrkernigen Zellen als die Standardkulturen (Abbildung 32). Die Stammzellen bildeten maximal 27 % (nach 7 Tagen) mehrkernige Zellen, die Standardkulturen nur etwa 14 % (nach 3 Tagen). In beiden Zelllinien sank die Mehrkernigkeit im Versuchsverlauf wieder ab (Abbildung 32).

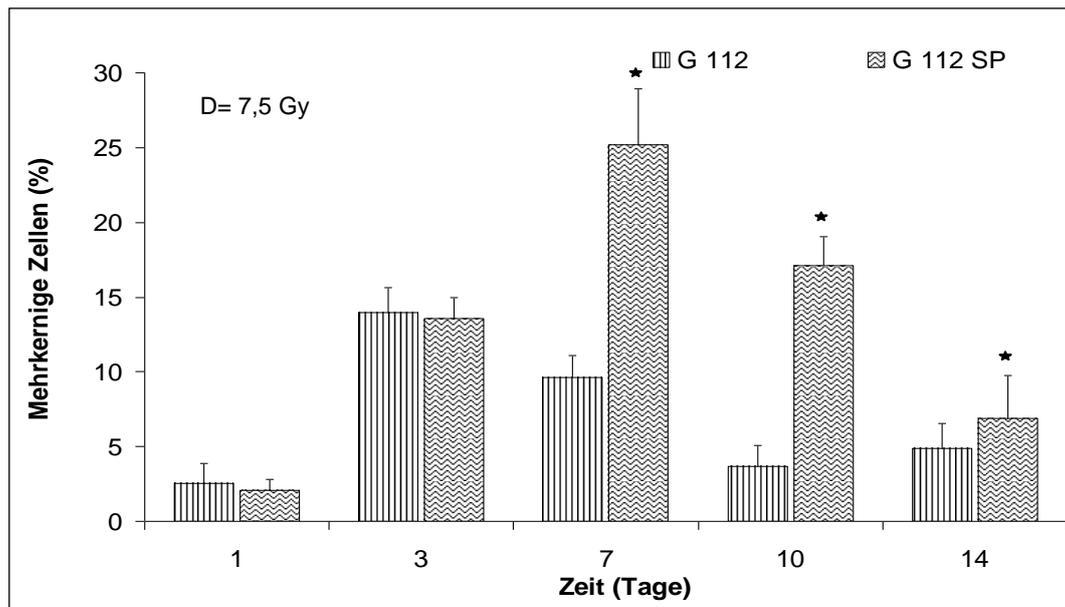


Abbildung 32 Vergleich der Anzahl an mehrkernigen Zellen in Standardzellkulturen und Stammzellkulturen der Linie G112/ G112 Sp nach Bestrahlung mit $D = 7,5 \text{ Gy}$.

Anteil mehrkerniger Zellen nach Bestrahlung in der Stammzelllinie G112 Sp und der Standardzelllinie G112, bestimmt 1-14 Tage nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichung.

(★) Signifikant höherer Anteil an mehrkernigen Zellen als die Proben der Zelllinie G112 zum selben Zeitpunkt.

U251/U251 Sp

Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an mehrkernigen Zellen in Standardkulturen und Stammzellen konnte bereits nach 3 Tagen nachgewiesen werden (Abbildung 33). In der Stammzelllinie konnte eine maximale Anzahl an mehrkernigen Zellen von etwa 60 % nach 10 Tagen beobachtet werden. Die Standardkulturen bildeten im Versuchsverlauf nur maximal 13 % mehrkernige Zellen (Abbildung 33). Die Mehrkernigkeit sank in den Zellen der Standardkulturen bis zum Ende des Versuchs bis auf das Niveau von unbestrahlten Zellen. In der Stammzelllinie blieb die Anzahl an mehrkernigen Zellen bis zum Versuchsende unverändert hoch (Abbildung 33).

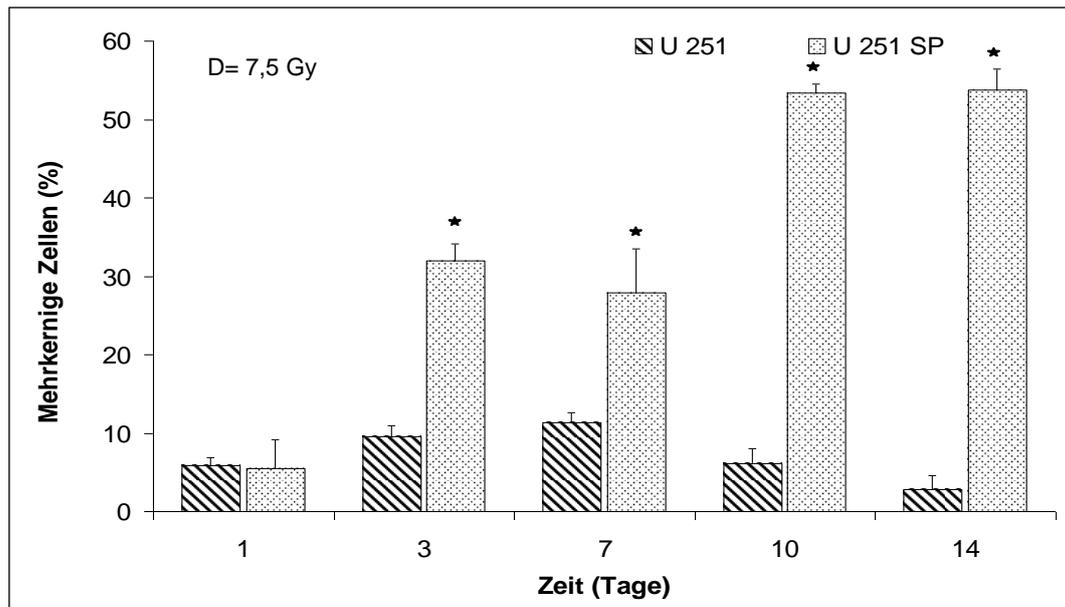


Abbildung 33 Vergleich der Anzahl an mehrkernigen Zellen in Standardzellkulturen und Stammzellkulturen der Linie U251/ U251 Sp nach Bestrahlung mit $D = 7,5$ Gy.

Anteil mehrkerniger Zellen nach Bestrahlung in der Stammzelllinie U251 Sp und der Standardzelllinie U251, bestimmt 1-14 Tage nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichung.

(★) Signifikant höherer Anteil an mehrkernigen Zellen als die Proben der Zelllinie U251 zum selben Zeitpunkt.

U87/U87 Sp

Ein Unterschied in der Anzahl mehrkerniger Zellen in Standardkulturen und Stammzellkulturen konnte schon 3 Tage nach Bestrahlung beobachtet werden (Abbildung 34). In den Standardkulturen wurden zu diesem Zeitpunkt etwa 16 % mehrkernige Zellen beobachtet. 14 Tage nach der Bestrahlung bildeten die Stammzellkulturen eine maximale Anzahl an mehrkernigen Zellen von etwa 29 %. In der Standardkulturzelllinie U87 Sp reduzierte sich die Anzahl an mehrkernigen Zellen im Versuchsverlauf. In den Stammzellkulturen hingegen blieb der hohe Anteil an mehrkernigen Zellen bis zum Ende des Versuchs nachweisbar (Abbildung 33).

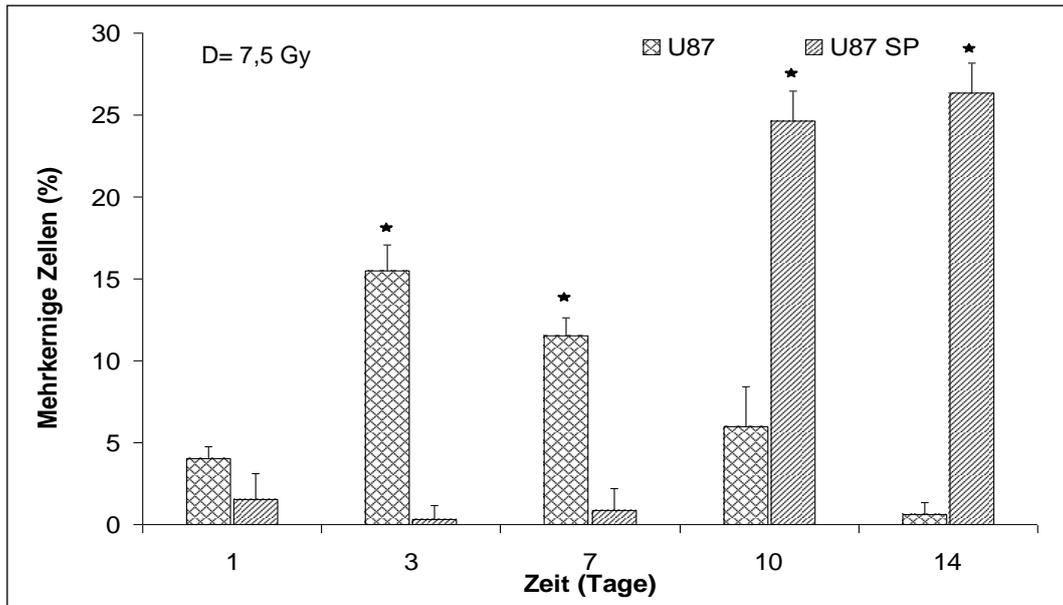


Abbildung 34 Vergleich der Anzahl an mehrkernigen Zellen in Standardzellkulturen und Stammzellkulturen der Linie U87/ U87 Sp nach Bestrahlung mit D= 7,5 Gy.

Anteil mehrkerniger Zellen nach Bestrahlung in der Stammzelllinie U87 Sp und der Standardzelllinie U87, bestimmt 1-14 Tage nach Bestrahlung. Vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichung.

(*) Signifikant höherer Anteil an mehrkernigen Zellen als die Proben der Zelllinie U87 Sp zum selben Zeitpunkt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in allen Stammzelllinien im Vergleich zu den Standardzellkulturen eine prozentual höhere Anzahl an mehrkernigen Zellen beobachtet wurde. Die sehr hohe Anzahl an mehrkernigen Zellen blieb zudem in den Stammzellkulturen U87 SP und U87 SP über den gesamten Zeitraum von 14 Tagen unverändert hoch. In der Linie G112 SP hingegen verminderte sich diese Anzahl stark. In den Standardzellkulturen konnten die mehrkernigen Zellen nur über einen kürzeren Zeitraum, bis maximal 7 Tage nach der Bestrahlung, beobachtet werden.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war eine systematische Untersuchung der Standardzellkulturen aus drei verschiedenen Glioblastomen mit besonderem Blick auf die oxidative Abwehr der Zellen nach Bestrahlung und Behandlung mit prooxidativ und antioxidativ wirksamen Substanzen sowie im Weiteren der Vergleich der morphologisch bestimmten Apoptoserate und Aneuploidie in Glioblastoma-multiforme-Standardzellkulturen und -Stammzellkulturen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Glioblastoma-multiforme-Standardzellkulturen mit Röntgenstrahlung mit Dosen $D= 3 \text{ Gy}$, 5 Gy oder $7,5 \text{ Gy}$ bestrahlt und anschließend die Apoptoserate morphologisch am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Weiterhin erfolgte eine Behandlung von Standardzellkulturen mit Natriumselenit in einer prooxidativ wirkenden Konzentration, mit anschließender morphologischer Auswertung der Apoptose, um den Einfluss von einem zusätzlichen oxidativen Stress zu beurteilen und einen Vergleich zur alleinigen Bestrahlung vornehmen zu können. Ebenfalls zur besseren Beurteilung der Wirkung von oxidativem Stress auf Glioblastoma-multiforme-Standardzellkulturen erfolgte in einem weiteren Versuch die Bestrahlung der Standardzellkulturen mit Röntgenstrahlen nach einer Vorbehandlung mit N-Acetylcystein, einer bekannten antioxidativen Substanz. Des Weiteren wurden Versuche mit Glioblastom-Stammzellen vorgenommen. Diese wurden, ebenso wie die Standardkulturen, mit Röntgenstrahlen bei $D= 7,5 \text{ Gy}$ sowie mit 3 Gy und 5 Gy bestrahlt, anschließend am Fluoreszenzmikroskop auf morphologische Apoptosen ausgewertet und mit den Ergebnissen der Standardkulturen nach Bestrahlung verglichen. Im Rahmen der zuvor genannten Untersuchungen zeigte sich in allen Zelllinien eine auffällige Bildung von mehrkernigen Zellen, insbesondere nach Bestrahlung. Aus diesem Grund erfolgte die Auswertung der Mehrkernigkeit nach Ablauf einer bestimmten Zeit nach Bestrahlung.

Ein Vergleich der maximalen Apoptoserate in den bestrahlten Standardzelllinien G112, U251 und U87 mit der strahleninduzierten Apoptoserate in anderen Tumorzelllinien verdeutlichte durch die niedrige Apoptoserate in den Glioblastomzellen die bekannte Radioresistenz des Glioblastoms. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine maximale Apoptoserate nach Bestrahlung ($D=7,5 \text{ Gy}$) mit Röntgenstrahlen von etwa 30% in der Glioblastoma-multiforme-Standardzelllinie U251. In den Zelllinien G112 und U87 ist der Unterschied noch deutlicher. In diesen Zelllinien betrug die Apoptoserate nach Bestrahlung mit $D=7,5 \text{ Gy}$ etwa 20%. Luce et al. untersuchten in sechs verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien die Apoptoserate nach Bestrahlung mit 10 Gy , einer deutlich höheren Dosis, als sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. In drei der sechs Zelllinien wurde eine Apoptoserate von durch-

schnittlich 55-75% beobachtet, deutlich mehr als in den untersuchten Glioblastomzellen (Luce et al. 2009).

Zusammenfassend zeigen die hier erhobenen Daten eine niedrige strahleninduzierte Apoptoserate in den untersuchten Glioblastoma-multiforme-Standardzellkulturen. Mögliche Ursachen könnten u. a. genetische Besonderheiten der Glioblastomzellen sein. Beispielsweise sind dabei eine Erhöhung des Apoptose hemmenden Proteins Survivin, Mutationen in Tumor-Suppressorgenen P53 und P16, Deletionen in Chromosomen 10 und 19q oder auch eine EGF-Rezeptor-Amplifikation zu nennen (Frankel et al. 1992; Shih et al. 2005)

Vergleicht man weiterhin die strahleninduzierte Apoptoserate in den Standardzelllinien untereinander, ergeben sich dabei folgende deutliche Unterschiede. Insbesondere der Zeitpunkt des nachgewiesenen signifikant höheren Anteils an apoptotischen Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollproben ergab einen bedeutsamen Unterschied. In den Zelllinien G112 und U251 wurde eine signifikante strahleninduzierte Apoptose erst 72 h nach Bestrahlung mit $D=7,5$ Gy beobachtet. Im Gegensatz zu dieser spät auftretenden strahleninduzierten Apoptose wurde in der Standardzelllinie U87 eine signifikant höhere strahleninduzierte Apoptoserate bereits 24 h nach Bestrahlung mit $D=7,5$ Gy beobachtet. Ursächlich für die in den Zelllinien G112 und U251 beobachtete späte Apoptoseinduktion könnte ein unterschiedlicher p53-Status dieser Zellen sein. In den Zellen der Standardzelllinien G112 und U251 ist TP53 mutiert. Sie exprimieren ein inaktives p53-Protein. In den Zellen der Glioblastoma-multiforme-Standardzelllinie U87 ist ein Wildtyp von TP53 vorhanden (Kim et al. 2010). Die erst spät (72 h), nach Bestrahlung aufgetretene, strahleninduzierte Apoptose in G112- und U251-Zellen ist also TP53-unabhängig. In der Zelllinie U87 hingegen TP53-abhängig. Das Protein p53 spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation der p53-abhängigen Apoptose, die relativ früh eintritt. Die spät auftretende Apoptose in den Glioblastoma-multiforme-Standardzelllinien G112 und U251 ist hingegen p53-unabhängig.

Neben der Apoptose sollte unter anderem die mitotische Katastrophe als ein weiterer großer Zelluntergangsmechanismus in Betracht gezogen werden. Die mitotische Katastrophe bezeichnet eine Art Zelluntergang, die aus einer fehlerhaften Mitose resultiert. Sie kann durch eine Vielzahl an DNA-schädigenden Stoffen, insbesondere durch Bestrahlung, verursacht werden. Die fehlerhafte Mitose führt zu einer untypischen Chromosomentrennung sowie zu einer untypischen Zellteilung. Dies wiederum kann zur Bildung von Riesenzellen mit abnormer Kernmorphologie, multiplen Kernen sowie einzelnen Abspaltungen von Erbmaterial (Mikronuklei) führen. Die strahleninduzierte Bildung von mehrkernigen Zellen wurde auch in den

untersuchten Glioblastoma-multiforme-Standardzellkulturen und -Stammzellkulturen beobachtet.

Bisher wurden zwei mögliche Mechanismen zur Einleitung einer mitotischen Katastrophe beschrieben. Als Erstes besteht die Möglichkeit, dass die mitotische Katastrophe als Konsequenz aus einer DNA-Schädigung verbunden mit einem Defizit an Zellzyklus-Kontrollpunkten resultiert. Eine Kontrollpunkt-Inaktivität ist dabei häufige Ursache eines veränderten bzw. eines fehlerhaft aktiven p53 und führt zum verfrühten Eintritt der noch nicht richtig reparierten Zelle in die Mitose. Mitotische Katastrophe kann auch durch Zentrosom-Amplifikation verursacht werden. Die mehrfache Bildung von Zentrosomen führt ihrerseits zur Bildung multipolarer mitotischer Spindeln. Aus der Bildung multipolarer Spindeln resultieren eine abnorme Chromosomentrennung sowie eine Generierung von Zellen mit multiplen kleineren DNA-Spaltprodukten und Riesenzellen mit mehreren Kernen. Verschiedene Autoren unter anderem Dodson et al. 2007 beschrieben eine durch Bestrahlung induzierte mitotische Katastrophe in Verbindung mit einer Vervielfältigung der Zentromere (Dodson et al., 2007).

Eine zunehmende Anzahl von Untersuchungen an hämatopoetischen Malignomen und soliden Tumoren, einschließlich Brust-, Hirn- und Darmkarzinomen, bekräftigten die Hypothese über die Existenz einer Subpopulation an Krebszellen mit einem sehr hohen malignen Potenzial, insbesondere der Fähigkeit zur Tumorneubildung sowie einer hohen Therapieresistenz. Die Bezeichnung dieser Zellen ist unterschiedlich. Einige Autoren berichten von Tumor-induzierenden-Zellen, andere von Tumor-propagierenden-Zellen oder auch Tumorstammzellen. Die Möglichkeit, die Tumorstammzellen zu identifizieren, bestätigte zunächst erst einmal die Existenz dieser Zellen in den Tumoren der verschiedensten Gewebearten und ermöglichte es darüber hinaus, die Reaktion dieser Zellen auf die unterschiedlichen Therapiemodalitäten zu untersuchen. Über die Herkunft der Tumorstammzellen wird bis heute noch umfangreich diskutiert. Normale Gewebestammzellen wurden aufgrund ihrer Fähigkeiten zur Selbsterneuerung sowie ihrer Fähigkeit zu jeder speziellen Zelle heranzuwachsen, definiert. Die gleichen Eigenschaften definieren eine Tumorstammzelle. Diese Definition hat in der Vergangenheit zu Verwirrungen geführt, denn sie ließ vermuten, dass eine normale Gewebestammzelle der Ursprung für eine Tumorstammzelle ist. Berichte von einigen Autoren konnten diese Theorie bestätigen. Zwei unabhängige Arbeitsgruppen konnten in Mausmodellen nachweisen, dass eine Onkogen-Expression in intestinalen Stammzellen jedoch nicht in weiter ausgereiften Vorläuferzellen oder endgültig differenzierten Zellen zur Bildung von Darmtumoren führte (Barker et al. 2009). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch bei Untersuchungen an neuronalen Stammzellen bestätigt werden. Hier wurde gezeigt, dass nur eine Onkogen-Expression in der subventrikulären Zellvorläufer-Zone zur Bildung eines As-

trozytoms führte (Llaguno et al. 2008). Diese Berichte haben gezeigt, dass zumindest in Maus-tumor-Modellen die Tumorstammzelle aus einer Gewebestammzelle entstehen kann. Der tatsächliche Ursprung von Tumorstammzellen ist jedoch bis heute nicht endgültig geklärt.

Die Arbeitsgruppe um Bao et al. zeigte in ihren Untersuchungen, dass CD133⁺-Glioblastomstammzellen für die Therapieresistenz nach Bestrahlung verantwortlich sind. Ursächlich dafür scheint ihrer Meinung nach eine veränderte DNA-Kontrollpunkt-Aktivität sowie eine verstärkte DNA-Reparatur-Kapazität dieser speziellen Zellen zu sein (Bao et al. 2006). Auch die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichten ein unterschiedliches Verhalten von Glioblastomstammzellen und -standardzelllinien nach Bestrahlung. In allen Glioblastoma-multiforme-Stammzellen wurde 144 h nach Bestrahlung mit D=7,5 Gy im Vergleich zu den Standardzellkulturen eine signifikant niedrigere Apoptoserate beobachtet. Erstaunlich ist, dass in den Stammzelllinien G112 Sp und U87 Sp zu einem früheren Zeitpunkt (bis etwa 72 h nach Bestrahlung) die Apoptoserate zunächst signifikant höher war. Die Stammzellen gingen nach Bestrahlung also viel schneller in die Apoptose, erreichen aber nicht das Niveau der bestrahlten Standardzellkulturen. Neben effektiveren Reparaturmechanismen könnten verlängerte Reparaturvorgänge zu den oben genannten Ergebnissen geführt haben. Ein Vergleich der Apoptoserate zu einem späteren Zeitpunkt nach Bestrahlung (länger als 168 h) könnte eine gleich hohe Anzahl an apoptotischen Zellen vielleicht beweisen, wenn die Stammzellen sehr viel länger versuchen, die Schäden zu reparieren, ihnen dies jedoch nicht gelingen würde. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Schädigungen der Stammzellen durch die Bestrahlung zu gering sind, um die Zellen in die Apoptose zu führen. Der quantitative Nachweis von Doppelstrangbrüchen zu verschiedenen Zeitpunkten sowie anschließend der Vergleich mit Standardkulturen, könnten diesbezüglich weitere relevante Hinweise geben.

Vorausgegangene Berichte haben gezeigt, dass verschiedene Substanzen durch eine Erhöhung des oxidativen Stresses Tumorzellen, speziell auch Glioblastomzellen, schädigen können (Nitta et al 2011). Oxidativer Stress beschreibt ein Ungleichgewicht zwischen der Entstehung von reaktiven oxidativen Spezies (ROS) in den Zellen einerseits und zellulären protektiven antioxidativen Reaktionen andererseits. Als Folge dieses Ungleichgewichts werden die entstehenden ROS nicht mit den zelleigenen Abwehrmechanismen schnell genug unschädlich gemacht, sondern können oxidative Schäden in verschiedenen Molekülen wie der DNA induzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde in den Glioblastom-Standardzellkulturen zusätzlich zur strahleninduzierten Apoptose auch die Apoptoseinduktion durch Behandlung mit Natriumselenit untersucht.

Natriumselenit ist bekannt als prooxidativ bzw. je nach Konzentration auch antioxidativ wirkende Substanz (Thirunavukkarasu et al. 2008). Es erhöht in der Zelle den oxidativen Stress durch Bildung von Superoxidradikalen und induziert oxidative DNA-Schäden (Stewart et al. 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in allen drei untersuchten Glioblastom-Standardzelllinien die Behandlung mit Natriumselenit eine erhöhte Apoptoserate induziert hat. Diese war genauso hoch, wie die durch Bestrahlung mit $D = 7,5$ Gy induzierte Apoptoserate. Im Vergleich zur strahleninduzierten Apoptose trat die Natriumselenit-induzierte Apoptose schon zum früheren Zeitpunkt auf. Ein chemisch erhöhter oxidativer Stress führt also in den untersuchten Zelllinien zu 20-30% Apoptoserate, die erst mit einer sehr hohen Strahlendosis von 7,5 Gy erreichbar war. Für die zelluläre antioxidative Abwehr sind u. a. die Superoxid-Dismutasen, die Katalase und das Glutathion zuständig. Mehrere Autoren haben gezeigt, dass in verschiedenen Tumorzellen eine verminderte antioxidative Abwehr vorhanden ist, bedingt durch verminderte Aktivität der entsprechenden Enzyme. Klingelhöffer et al. haben gezeigt, dass die Glioblastom-Zelllinien U87 und U251 über eine sehr niedrige Katalase-Aktivität verfügen, also über eine verminderte antioxidative Kapazität. Dies wurde durch eine sehr hohe Empfindlichkeit gegen Wasserstoffperoxid bestätigt (Klingelhöffer et al. 2012). Zumindest für diese zwei Zelllinien, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden, wäre damit die Natriumselenit-Wirksamkeit erklärbar.

Rudolf et al. untersuchten im Jahr 2008 an Gebärmutterhalskrebszellen den durch Natriumselenit induzierten Zelltod. In ihren Versuchen wurden Gebärmutterhalskrebszellen mit Natriumselenit in den Konzentrationen $5 \mu\text{mol/l}$ und $50 \mu\text{mol/l}$ inkubiert und anschließend die DNA-Synthese sowie die DNA-Einzelstrangbrüche bestimmt. Sie beschrieben nach ihren Untersuchungen eine zeit- und dosisabhängige Unterdrückung der DNA-Synthese sowie einen Anstieg an DNA-Schäden nach Inkubation der Zellen mit Natriumselenit (Rudolf et al. 2008). Weiterhin beschrieben sie einen Anstieg des oxidativen Stresses und einen Abfall des reduzierten Glutathions in den Zellen nach Inkubation mit Natriumselenit. Die Bestimmung der Apoptose erfolgte ebenfalls morphologisch am Fluoreszenzmikroskop nach Anfärben der Zellen. Zum Zeitpunkt 12 h nach Inkubation mit $5 \mu\text{mol/l}$ Natriumselenit konnten 16 %, 24 h nach Inkubation 53,5 % Apoptosen bestimmt werden. Nach Inkubation mit $50 \mu\text{mol/l}$ Natriumselenit lag die Apoptoserate nach 12 h bei 42% und nach 24 h sogar bei 83,5 % (Rudolf et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde 24 h nach Inkubation mit $40 \mu\text{M}$ Natriumselenit eine Apoptoserate von 10-14% beobachtet. Beim Vergleich der absoluten Apoptoseraten zeigte sich nach Inkubation mit Natriumselenit ebenso wie nach Bestrahlung eine deutlich niedrigere Apoptoserate in den untersuchten Glioblastomzellen als in den durch die Arbeitsgruppe von Rudolf et al. untersuchten Gebärmutterhalskrebszellen.

N-Acetylcystein ist allgemein als ein Antioxidans bekannt. Zahlreiche Studien konnten beweisen, dass N-Acetylcystein in der Lage ist, chemisch induzierten oxidativen Stress zu minimieren und DNA-Schäden entgegenzuwirken (Reliene et al. 2006). Beispielsweise führte die Behandlung von Leberzellen mit N-Acetylcystein vor einer Bestrahlung mit 6 Gy zu einem Rückgang der Lipidperoxidation, des zellulären NO-Anteils sowie der DNA-Fragmentierung. Weiterhin fand man einen signifikanten Anstieg der antioxidativen Zellkapazität im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Mansour et al. 2008). Die genaue Wirkungsweise von N-Acetylcystein ist bisher nicht geklärt. Man weiß lediglich, dass N-Acetylcystein als Cystein-Quelle interagiert und die Produktion von Glutathion, welches die Zelle vor oxidativen Radikalen schützt, indem es diese abfängt, stimuliert (Abbildung 4) (Hoffer et al. 1997). Dies konnte durch Untersuchungen von Kozhukhar AV et al. bestätigt werden, denn die Verabreichung von N-Acetylcystein führte in ihren Versuchen zu einem zeitabhängigen Anstieg des zellulären Glutathions, welches die Radikal-Wirkung abschwächte und Mitochondrien-Schädigungen entgegenwirkte (Kozhukhar et al. 2006). Weiterhin ist bekannt, dass N-Acetylcystein direkt mit Stickstoffmonoxid interagiert. Es reduzierte den Stickstoffmonoxid-Anstieg in der Zelle und führt darüber hinaus zu einer Verminderung des GSH/GSSH Verhältnisses, was wiederum zu einer geringeren Zytotoxizität führt (Shao et al. 2006). Yildirim et al. beschrieben eine Verminderung der Glutathion-Peroxidase-Erschöpfung nach Inkubation von Lungengewebe mit N-Acetylcystein nach Behandlung mit Bleomycin. Weiterhin hemmte es eine steigende Myeloperoxidase-Aktivität sowie eine steigende Stickstoffmonoxid-Konzentration in den behandelten Zellen (Yildirim et al. 2005).

Jayalakhmi et al. studierten ebenfalls die Wirkung von N-Acetylcystein in primären Hippocampus-Zellen. Die Arbeitsgruppe bestätigte eine signifikante Zytoprotektion durch N-Acetylcystein, abnehmende ROS-Bildung und eine erhöhte antioxidative Kapazität gegenüber den Kontrollen. Ebenso zeigten Jayalakhmi et al. einen Abfall von DNA-Strangbrüchen unter der Wirkung von N-Acetylcystein nach einer zellulären Hypoxie (Jayalakhmi et al. 2005). Einen weiteren Ansatz in der Diskussion über die Wirkungsweise von N-Acetylcystein stellten Tuttle et al. auf. Auch diese Autoren berichteten über einen antioxidativen Effekt von N-Acetylcystein. Dieser beruhte jedoch nicht auf einer direkten Interaktion mit Sauerstoffradikalen, sondern viel mehr auf einer indirekten Modulation der intrazellulären Antioxidationskapazität der Zelle (Tuttle et al., 1998). Neben der protektiven Wirkung von N-Acetylcystein gegenüber Sauerstoffradikalen wurde in der Vergangenheit auch über negative Eigenschaften dieser Substanz berichtet. Beispielsweise beschrieben Oikawa et al. nach ihren Untersuchungen an menschlichen Leukämiezellen, dass N-Acetylcystein neben der bereits bekann-

ten antikarzinogenen Wirkung auch zur Induktion von DNA-Schäden befähigt ist (Oikawa et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass einzelne Glioblastom-Standardzellkulturen unterschiedlich auf eine N-Acetylcystein-Behandlung reagierten. In den Zelllinien U251 und U87 sank nach Inkubation mit 20 mM N-Acetylcystein und anschließender Bestrahlung mit $D=7,5$ Gy die Apoptoserate signifikant ($P=0,95$) gegenüber bestrahlten Proben ohne N-Acetylcystein. Wie erwartet, zeigte N-Acetylcystein als Radikalfänger eine protektive Wirkung. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der von Reliene und Schiestl (2006) sowie Kozhukhar et al. (2006). Eine andere Reaktion zeigte hingegen die Zelllinie G112. Im Gegensatz zu den Zelllinien U87 und U251 stieg die Apoptoserate bei den bestrahlten und mit 20 mM N-Acetylcystein behandelten Zellen der Linie G112 gegenüber der strahleninduzierten Apoptoserate signifikant ($P=0,95$) an. In der Zelllinie G112 zeigte sich also eine prooxidative Reaktion durch den Anstieg der Apoptoserate nach alleiniger Bestrahlung.

Fraglich ist die Ursache der verschiedenen Reaktionen. Zum einen kann ein fehlender antioxidativer Schutz der Zelle ursächlich sein, ebenso kann auch eine prooxidative Wirkung des N-Acetylcysteins die Strahlenwirkung verstärken. Da N-Acetylcystein, wie bereits erwähnt, mittels Glutathion wirkt, kann beispielsweise das Fehlen von Glutathion in der Zelle zu einem Funktionsverlust und einem fehlenden antioxidativen Schutz des N-Acetylcysteins führen. Ebenso könnte gewissermaßen eine durch Bestrahlung verursachte Veränderung von N-Acetylcystein, etwa eine Strukturveränderung des Moleküls, ursächlich für eine mangelhafte Elimination von Sauerstoffradikalen und einen fehlenden oxidativen Schutz sein. Zusätzlich weist der in Abbildung 1 dargestellte Zusammenhang darauf hin, dass das Fehlen oder die Fehlfunktionen der Superoxid-Dismutase ebenfalls für einen mangelhaften oxidativen Zellschutz nach Bestrahlung ursächlich sein könnte (Furukawa et al. 2008).

Letztendlich bleibt die Frage nach der Ursache für die verschiedenen Reaktionen auf oxidativen Stress offen und bedarf weiterer Untersuchungen. Die Bestimmung des Glutathion-Status nach N-Acetylcystein-Inkubation und Bestrahlung sowie nach einer Natriumselenitbehandlung wäre eine Möglichkeit.

Bei den untersuchten drei Zelllinien könnten sehr unterschiedliche Reaktionen auf Bestrahlung und auf einen höheren oxidativen Stress beobachtet werden. In Bezug auf den möglichen therapeutischen Einsatz des oxidativen Stresses ist es ein klarer Hinweis dafür, dass

eine Kenntnis des genetischen Tumorprofils für jegliche Therapieoptimierung notwendig wäre.

Abgesehen von einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate in Glioblastom-Standardzellkulturen und -Stammzellkulturen nach Bestrahlung oder Behandlung mit Natriumselenit, zeigte sich in allen untersuchten Zellkulturen auch eine signifikante Zunahme an mehrkernigen Zellen und das bereits 24 h nach Bestrahlung. Das Maximum an mehrkernigen Zellen wurde in den Standardzellkulturen zwischen dem 3. und 6. Tag post radiatio erreicht. Dabei lag die maximale Anzahl an mehrkernigen Zellen in allen untersuchten Zelllinien etwa im Bereich von 10-15 %. Ein dosisabhängiger Anstieg dieser Anzahl wurde nur in den Standardzelllinien U251 und U87 beobachtet. Auch in Untersuchungen von Bhattathiri et al. (1998 b) wurden strahleninduzierte Mehrkernigkeit, Zweikernigkeit sowie eine Kernknospung beobachtet. Die Autoren beschrieben einen dosisabhängigen Anstieg der Zellkernveränderungen in Tumorzellen der Mundhöhle, welche bereits wenige Tage nach Bestrahlung nachweisbar waren. Auch in den Glioblastom-Stammzelllinien konnte nach Bestrahlung eine signifikante Bildung von mehrkernigen Zellen beobachtet werden.

Überraschend war, dass die Stammzellen deutlich mehr mehrkernige Zellen post radiatio bildeten als die Standardzellen. Darüber hinaus blieben die mehrkernigen Zellen in den Stammzellkulturen im Unterschied zu den Standardzellkulturen unverändert über den gesamten Beobachtungszeitraum von 14 Tagen nachweisbar. In den Standardzellkulturen sank die Anzahl an mehrkernigen Zellen in allen Standardzelllinien nach etwa 10 Tagen auf das Kontrollniveau zurück.

Xie et al. (2008) beobachteten in embryonalen Mausfibroblasten eine steigende Anzahl an mehrkernigen Zellen nach zunehmender Belastung der Zellen durch oxidativen Stress. In Zellen mit fehlenden Glykosylasen OGG1 und MYH, die an der Reparatur von oxidativen DNA-Schäden beteiligt sind, war die Mehrkernigkeit noch ausgeprägter. Die Autoren haben in weiteren Untersuchungen zeigen können, dass in den mehrkernigen Zellen funktionsfähige Zentrosome vervielfältigt waren. Obwohl Zentrosomen-Veränderungen durch oxidativen Stress bereits in anderen Untersuchungen an verschiedenen Zellarten nachgewiesen wurden, bleibt letztendlich die tatsächliche Ursache für Zellkernveränderungen insbesondere nach Bestrahlung, bis heute unklar.

Weitere Versuche insbesondere im Hinblick auf die unterschiedliche Bildung und Langzeitüberleben von mehrkernigen Zellen in Standard- und Stammzellkulturen sollten folgen, um

eventuelle Zusammenhänge mit der deutlichen Strahlenresistenz der Stammzellen aufzuklären.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse bieten der Forschung Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. Insbesondere die Bestimmung der Apoptose zu einem späteren Zeitpunkt als 168 h beispielsweise mittels Caspase-Aktivität oder die Bestimmung des Anteils an Zellen in der mitotischen Katastrophe könnten Aufschluss über die durch Bestrahlung induzierte Schädigung der Zelle und ihre Folgen geben. Zugleich könnte der quantitative Nachweis von Doppelstrangbrüchen im Verlauf neue Erkenntnisse speziell über die Reparaturvorgänge und damit auch über die Ursachen für die hohe Resistenz der Glioblastomstandardzellen und Glioblastomstammzellen bieten.

Die Möglichkeit, Apoptose durch eine Erhöhung des oxidativen Stresses in Tumorzellen zu induzieren, sollte weiter erforscht werden. Die Zusammenhänge zwischen dem zellulären antioxidativen Profil des radioresistenten Glioblastoms und einer möglichen Strahlensensibilisierung sollten auch mechanistisch untersucht werden.

6. Zusammenfassung

In allen durchgeführten Untersuchungen zeigte sich eine deutliche Resistenz aller Glioblastomzellen gegenüber Bestrahlung. Insbesondere in den Glioblastom-Stammzellkulturen war die strahleninduzierte Apoptoserate sehr gering. Dies spricht für die Hypothese, dass in Glioblastomen die Tumorstammzellen für eine erneute Tumorregenerierung nach erfolgreicher Primärtherapie (Strahlentherapie) verantwortlich sind.

Weiterhin konnte in allen Zelllinien nach Bestrahlung die Bildung von mehrkernigen Zellen beobachtet werden. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen Glioblastom-multiforme-Standardzellen und -Stammzellen. In Stammzellkulturen wurde eine deutlich höhere Rate an mehrkernigen Zellen als in den Standardzellkulturen beobachtet. Diese blieben zudem in den Stammzellkulturen über den gesamten Versuchszeitraum nachweisbar, wohingegen in den Standardzellkulturen eine mit zunehmender Zeit abnehmende Anzahl an mehrkernigen Zellen zu sehen war. Folglich deutet dies auf einen Zusammenhang zwischen der Bildung von mehrkernigen Zellen und der deutlich vermehrten Resistenz der Stammzellen gegenüber den Standardzellen hin. Es scheint, dass die Tumorstammzellen durch die Bildung von mehrkernigen Zellen die Fähigkeit besitzen, beschädigtes Material zu ersetzen oder zu reparieren und somit dem Zelltod zu entgehen.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit war der Untersuchung der Glioblastom-Standardzellkulturen im Hinblick auf ihr Resistenzverhalten in Abhängigkeit von oxidativen Stress gewidmet. Natriumselenit als Prooxidans führte in allen drei untersuchten Standardzelllinien zu einer schnelleren Apoptoseinduktion. Das Maximum an apoptotischen Zellen wurde durch Natriumselenit im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung früher erreicht. Die maximale Apoptoserate die durch 40 μM Natriumselenit induziert wurde, stimmte mit der durch Bestrahlung mit $D = 7,5$ Gy induzierten Apoptoserate überein. N-Acetylcystein wirkte, wie auch aus der Literatur bekannt, in den Zelllinien U251 und U87 antioxidativ d. h., die Apoptoserate sank nach Bestrahlung mit 7,5 Gy. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der Glioblastom Standardzelllinien G112 mit N-Acetylcystein zu einem Anstieg der Apoptoserate und verdeutlichte dadurch einen relevanten Einfluss des jeweiligen genetischen Profils des individuellen Tumors für den Zusammenhang von oxidativen Stress und Apoptose in Glioblastomzellen.

7. Literaturverzeichnis

Adams JM, Strasser A (2008): Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res* 68, 4018-4021.

Aktroies K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (2009): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban und Fischer 10.Auflage,927-928.

Anandharaj A, Cinghu S, Park WY (2012): Rapamycin-mediated mTOR inhibition attenuates survivin and sensitizes glioblastoma cells to radiation therapy. *Acta Biochim Biophys Sin* 43, 292-300.

Arakawa M, Ito Y (2007): N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: Basic and clinical pharmacology. *Cerebellum* 6, 308-314.

Bao S, Wu Q et al. (2006): Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756-760.

Barker N et al. (2009): Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608-611.

Bhattathiri NV et al.: (1998a): Prediction of radiosensitivity of oral cancers by serial cytological assay of nuclear changes. *Radiother Oncol* 49, 61-65.

Bhattathiri NV, Bindu L., Remani P, Chandralekha B, Nair KM (1998b): Radiation-induced acute immediate nuclear abnormalities in oral cancer cells: serial cytologic evaluation. *Acta Cytol* 42, 1084-1090.

Briguori C, Quintavalle C, De Micco F, Condorelli G (2011): Nephrotoxicity of contrast media and protective effects of acetylcysteine. *Arch Toxicol* 85, 165-173.

Brown NS, Bicknell R (2001): Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 3, 323-327.

Castedo M et al. (2004): Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene* 23, 4362-4370.

Conklin KA (2004): Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr Cancer Ther* 3, 294-300.

Dodson, H, Wheatley SP, Morrison CG (2007): Involvement of centrosome amplification in radiation-induced mitotic catastrophe. *Cell Cycle* 3, 364-370.

Frankel RH et al.(1992): p53 mutations in human malignant gliomas: comparison of loss of heterozygosity with mutation frequency. *Cancer Res* 52,1427-1433.

Furnari FB et al. (2007): Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21, 2683-2710.

Furukawa Y et al. (2008): Complete loss of post-translational modifications triggers fibrillar aggregation of SOD1 in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 283, 24167-24176.

Gerstner ER et al.(2009): Effect of adding temozolomide to radiation therapy on the incidence of pseudo-progression. *J Neurooncol* 94, 97-101.

Hajra KM, Liu JR (2004): Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* 9, 691-704.

He YY, Hader DP (2002): UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: protective effects of ascorbic acid and N-acetyl-L-cysteine. *J Photochem Photobiol B* 66, 115-124.

Hegi ME et al. (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 997-1003.

Herrmann T, Baumann M, Dörr W (2006): Klinische Strahlenbiologie: kurz und bündig. Urban und Fischer Verlag 4, München, 8-10.

Hoffer E, Shenker L, Baum Y, Tabak A (1997): Paraquat-induced formation of leukotriene B4 in rat lungs: modulation by N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med* 22, 567-572.

Hottinger AF, Yoon H, DeAngelis LM, Abrey LE (2009): Neurological outcome of long-term glioblastoma survivors. *J Neurooncol* 95, 301-305.

Huang S, Ingber DE (2000): Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Exp Cell Res* 261, 91-103.

Jamal M, Rath BH, Tsang PS, Camphausen K, Tofilon PJ (2012): The brain microenvironment preferentially enhances the radioresistance of CD133⁺ glioblastoma stem-like cells. *Neoplasia* 14, 150-158.

Jayalakshmi K, Sairam M, Singh SB, Sharma SK, Ilavazhagan G, Banerjee PK (2005): Neuroprotective effect of N-acetyl cysteine on hypoxia-induced oxidative stress in primary hippocampal culture. *Brain Res* 1046, 97-104.

Kang MK, Kang SK (2007): Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma. *Stem Cells Dev* 16, 837-847.

Kim EL et al. (2010): Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro-Oncology* 12, 389-400.

Klingelhoefter Ch et al. (2012): Natural resistance to ascorbic acid induced oxidative stress is mainly mediated by catalase activity in human cancer cells and catalase-silencing sensitizes to oxidative stress. *BMC Complementary and alternative medicine* 12, 1-11.

Kozhukhar AV, Yasinska IM, Sumbayev VV (2006): Nitric oxide inhibits HIF-1alpha protein accumulation under hypoxic conditions: implication of 2-oxoglutarate and iron. *Biochimie* 88, 411-418.

Krajcovic M et al. (2011): A non-genetic route to aneuploidy in human cancers. *Nature Cell Biology* 13, 324-331.

Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G (2002): Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol* 64, 259-273

Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M (2000): Thiol antioxidant, N-acetylcysteine, activates extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 789-794.

Llaguno SA, Chen J, Kwon CH, Parada LF (2008): Neural and cancer stem cells in tumor suppressor mouse models of malignant astrocytoma. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 421-426.

Luce A et al. (2009): Death receptor pathways mediate targeted and non-targeted effects of ionizing radiations in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 30, 432-439.

Lüllmann H, Mohr K, Hein L (2006): Pharmakologie und Toxikologie. Springer Verlag 16, 418-432.

Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM, Hanafi N (2008): Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rats. *Biochem Pharmacol* 75, 773-780.

Mates JM, Sanchez-Jimenez FM (2000): Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 157-170.

Mukherjee B et al. (2009): EGFRvIII and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma. *Cancer Res* 69, 4252-4259.

Niewald M, Berdel Ch, Fleckenstein J, Licht N, Ketter R, Rube Ch (2011): Toxicity after radiochemotherapy for Glioblastoma using temozolomide – a retrospective evaluation. *Radiat Oncol* 6, 141-147.

Nitta M et al. (2011): Targeting EGFR induced oxidative stress by PARP1 inhibition in glioblastoma therapy. *PLoS One* 5, 10767.

Oikawa S, Yamada K, Yamashita N, Tada-Oikawa S, Kawanishi S (1999): N-acetylcysteine, a cancer chemopreventive agent, causes oxidative damage to cellular and isolated DNA. *Carcinogenesis* 20, 1485-1490.

Pelicano H, Carney D, Huang P (2004): ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 7, 97-110.

Poeck K, Hacke W (2006): Neurologie. Springer Verlag 12, 310-312.

Raftos JE, Whillier S, Chapman BE, Kuchel PW (2007): Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1698-1706.

Reliene R, Schiestl RH (2006): Glutathione depletion by buthionine sulfoximine induces DNA deletions in mice. *Carcinogenesis* 27, 240-244.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.

Rich JN and Bao S (2007): Chemotherapy and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 1, 353-355.

Rich JN (2007): Cancer Stem Cells in Radiation Resistenz. *Cancer Research* 67, 8980-8984.

Riley PA (1994): Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65, 27-33.

Roa W et al. (2004): Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 22, 1583-1588.

Roninson IB, Broude EV, Chang BD (2001): If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 4, 303-313.

Ropolo M et al. (2009): Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures. *Mol Cancer Res* 7, 383-392.

Rudolf E, Rudolf K, Cervinka M (2008): Selenium activates p53 and p38 pathways and induces caspase-independent cell death in cervical cancer cells. *Cell Biol Toxicol* 24, 123-141.

Shacter E, Williams JA, Hinson RM, Senturker S, Lee YJ (2000): Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. *Blood* 96, 307-313.

Shao ZH et al. (2006): Cytotoxicity induced by grape seed proanthocyanidins: role of nitric oxide. *Cell Biol Toxicol* 22, 149-158.

Shih HA, Betensky RA, Dorfman MV, Louis DN, Loeffler JS, Batchelor TT (2005): Genetic analyses for predictors of radiation response in glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63, 704-710.

Shu HK, Kim MM, Chen P, Furman F, Julin CM, Israel MA (1998): The intrinsic radioreistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21(BAX) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14453-14458.

Spallholz JE (1997): Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. *Biomed Environ Sci* 10, 260-270.

Statistisches Bundesamt Deutschland (2011): Gesundheit-Todesursachen in Deutschland. *D-Statis* 12 (4), 3-34.

Stewart MS, Spallholz JE, Neldner KH, Pence BC (1999): Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radic Biol Med* 26, 42-48.

Stupp R et al. (2005a): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987-996.

Stupp R et al. (2005b): Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5, 198-206.

Thirunavukkarasu C, Premkumar K, Sheriff AK, Sakthisekaran D (2008): Sodium selenite enhances glutathione peroxidase activity and DNA strand breaks in hepatoma induced by N-nitrosodiethylamine and promoted by phenobarbital. *Mol Cell Biochem* 310, 129-139.

Tossios P et al (2004): Freie Radikale und Antioxidanzien in der Herzchirurgie. *Blickpunkt der Mann. Wissenschaftliches Journal für Männergesundheit* 2(3), 36-39.

Tuttle S, Horan AM, Koch CJ, Held K, Manevich Y, Biaglow J (1998): Radiation-sensitive tyrosine phosphorylation of cellular proteins: sensitive to changes in GSH content induced by pretreatment with N-acetyl-L-cysteine or L-buthionine-S,R-sulfoximine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42, 833-838.

Tuzgen S et al. (2007): Relationship between DNA damage and total antioxidant capacity in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 19, 177-181.

Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B (2008): Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 15, 1153-1162.

Vlashi E, McBride WH, Pajonk F (2009): Radiation responses of cancer stem cells. *J Cell Biochem* 108, 339-342.

Xie Y, Yang H, Miller JH, Shih DM, Hicks GG, Xie J, Shiu RP (2008): Cells deficient in oxidative DNA damage repair genes Myh and Ogg1 are sensitive to oxidants with increased G2/M arrest and multinucleation. *Carcinogenesis* 29, 722-728.

Yildirim Z, Kotuk M, Iraz M, Kuku I, Ulu R, Armutcu F, Ozen S (2005): Attenuation of bleomycin-induced lung fibrosis by oral sulfhydryl containing antioxidants in rats: erdosteine and N-acetylcysteine. *Pulm Pharmacol Ther* 18, 367-373.

Yuan X et al. (2004): Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23, 9392-9400.

Zhang P et al. (2006): Caspase independence of radio-induced cell death. *Oncogene* 25, 7758-7770.

Zhao Y et al. (2009): Increase in thiol oxidative stress via glutathione reductase inhibition as a novel approach to enhance cancer sensitivity to X-ray irradiation. *Free Radic Biol Med* 47, 176-183.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Virsik-Köpp für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Möglichkeit des experimentellen Arbeitens, die vielen interessanten Eindrücke sowie für die hervorragende Betreuung und fachkompetente Unterstützung. Danke auch für die ausgezeichneten Anregungen und ständige Hilfsbereitschaft sowie Motivation.

Frau Dr. rer. nat. Ella L. Kim und allen Mitarbeitern aus dem Labor der Neuroonkologie danke ich für die Bereitstellung der Glioblastomzellen sowie für die Einarbeitung im Umgang mit diesen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. C. F. Hess für die Möglichkeit einen Teil der experimentellen Arbeiten in den Laborräumen der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie durchführen zu können. Ebenso möchte ich mich bei Frau Rave-Fränk bedanken für die Vermittlung des Themas, die fachkundige Beratung und Anregung sowie für die Zuarbeitung und Unterstützung. Ein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle Frau Juliane Kasten-Krapp und Frau Alexandra Bitter aus dem Labor der Strahlentherapie für die exzellente technische Assistenz, die Einarbeitung, die geduldige Beantwortung meiner Fragen sowie für die jederzeit freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ein weiterer großer Dank gilt meiner Familie und hier insbesondere meinen Eltern und meinem Ehemann. Ihr habt mich in jeder Phase dieser Arbeit begleitet, mich moralisch und finanziell unterstützt und immer wieder motiviert. Vielen Dank für Eure Liebe, das entgegengebrachte Vertrauen und Eure Rücksicht.

Lebenslauf

Am 29.09.1983 wurde ich als zweites Kind von Maria Strauß, geb. Gano und Bodo Strauß in Löbau/Sachsen geboren.

Von 1990 bis 1994 besuchte ich die Grundschule Löbau Süd und von 1994 bis 2000 die Pestalozzi Realschule Löbau. Im Anschluss besuchte ich das Berufliche Gymnasium in Löbau. Nach Erlangen der allgemeinen Hochschulreife im Jahr 2003 absolvierte ich ein Freiwilliges soziales Jahr im Tätigkeitsbereich einer Sozialstation.

Im Sommersemester 2004 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen und absolvierte im Frühjahr 2006 erfolgreich den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Im Verlauf meines Studiums erfolgten mehrere Famulaturen unter anderem an der Universitätsmedizin Göttingen, im Städtischen Klinikum Görlitz sowie in mehreren Allgemeinmedizinischen Praxen. Das Praktische Jahr absolvierte ich an der Universitätsmedizin Göttingen. Mein Wahlfachtertial durchlief ich in der Abteilung Pädiatrie mit den Schwerpunkten Pädiatrische Kardiologie und Allgemeinpädiatrie.

Im Mai 2011 absolvierte ich erfolgreich den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Am 30. Mai 2011 wurde mir urkundlich die Approbation als Ärztin erteilt. Von August 2011 bis Dezember 2011 arbeitete ich als Assistenzärztin im Elisabeth-Krankenhaus Kassel Abteilung Innere Medizin. Seit Januar 2012 bin ich Assistenzärztin in der Abteilung Nephrologie/Rheumatologie an der Universitätsmedizin Göttingen.

Von Juli 2007 bis Dezember 2012 promovierte ich in der Abteilung Nuklearmedizin im Zentrum Radiologie der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen.