

The interaction of uPAR and miR-221 expression levels in glioblastoma cell lines

Ida Türk

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Stefan Thorban

Prüfer*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Thomas E. Schmid
2. Priv.-Doz. Dr. Amir Kaywan Aftahy

Die Dissertation wurde am 14.06.2022 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.12.2022 angenommen.

Gewidmet

Heimo W. & Christoph W.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Ida Türk, erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung
Fakultät für Medizin

der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

The interaction of uPAR and miR-221 expression levels in glioblastoma cell lines

unter der Anleitung und Betreuung durch: Priv.-Doz. Thomas E. Schmid

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 7 Abs. 6 und 7 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer*innen für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Teile der Dissertation wurden in _____ veröffentlicht.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Ich habe bereits am _____ bei der promotionsführenden Einrichtung _____ der Hochschule _____ unter Vorlage einer Dissertation mit dem Thema _____ die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis:

Ich habe keine Kenntnis über ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren in Bezug auf wissenschaftsbezogene Straftaten gegen mich oder eine rechtskräftige strafrechtliche Verurteilung mit Wissenschaftsbezug.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung sowie die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und für den Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten der TUM sind mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 27 PromO (Nichtigkeit der Promotion) und § 28 PromO (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich

einverstanden, nicht einverstanden.

München, 05.06.2022, Ida Türk

Ort, Datum, Unterschrift

Zusammenfassung

Hintergrund: Trotz der stetigen Verbesserung der Hirntumorthherapie ist die Prognose für Glioblastome weiterhin schlecht. Für neue therapeutische Ziele ist es wichtig, die Beziehung zwischen microRNA-221/-222 und uPAR-Expression, sowie den Zusammenhang zwischen Bestrahlung (4 Gy) und Behandlung von Zellen mit MEK1- und HDAC-Inhibitoren wie TAK-733, zu verstehen. Dies kann zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien führen.

Methodik: In fünf Zelllinien (LN229, A172, U87, LN18, U251) wurden die Expressionen der microRNA-221/-222 sowie des uPAR in bestrahlten und unbestrahlten Proben nach vier und 24 Stunden bestimmt, um die Auswirkungen der Strahlung zu identifizieren. Das Wirkspektrum der MEK1- und HDAC-Inhibitoren wurde in LN229, A172 sowie U87, durch Behandlung mit TAK-733, MS-275, einer Kombination aus beiden und Trametinib, analysiert. Um die microRNA-221/-222-Expressionsänderungen bei Bestrahlung und Behandlung zu bestimmen, wurden qRT-PCRs durchgeführt. Zur Messung der uPAR Proteinexpression, wurden Western Blots angefertigt. Die Auswirkungen der Substanzen und der Bestrahlung auf das Zellwachstumsverhalten wurden mit einer 3D-Zellkultur überprüft.

Ergebnisse: LN229 und A172 zeigten vier Stunden nach der Bestrahlung eine Abnahme von uPAR. In A172 verursachten Trametinib (0/4 Gy, nach 48/72 Stunden) und TAK-733 (4 Gy, 72 Stunden) eine signifikante Reduktion von uPAR. LN229 wies bei Trametinib und TAK-733/MS-275 in den 0 und 4 Gy Proben eine signifikante Abnahme auf. Die 3D-Zellkultur zeigte eine Verringerung des Wachstums in LN229, A172 und U87 mit TAK-733 und Trametinib in bestrahlten Proben. In den unbestrahlten Zellproben trat bei allen Behandlungen eine Wachstumsinhibition auf.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse zeigten eine reproduzierbar verringerte uPAR-Expression in A172 sowie LN229 bei Bestrahlung und Behandlung. Diese Abnahme konnte auch auf RNA-Ebene beobachtet werden. In U87, A172 und LN229 zeigten TAK-733 und Trametinib einen Zellwachstumsstillstand in bestrahlten Proben. Im Hinblick auf die Entwicklung einer personalisierten Strahlentherapie, können Glioblastome mit diesen drei Phänotypen, bei Behandlung mit TAK-733 und Trametinib, ein besseres Outcome für Patienten aufweisen.

Abstract

Purpose: Despite the steady improvement in brain tumour therapy, the prognosis for glioblastomas is poor. For new therapeutic targets, it is important to understand the relationship between microRNA-221/-222 and uPAR expression and irradiation (4 Gy) and the treatment of cells with MEK1- and HDAC-inhibitors such as TAK-733. This may lead to the development of novel therapeutic strategies.

Methods: In five cell lines (LN229, A172, U87, LN18, U251), microRNA-221/-222 and uPAR expression, were determined in unirradiated and irradiated samples, after four and twenty-four hours, to visualize the effects of radiation. The effects of MEK1- and HDAC-inhibitors were demonstrated in LN229, A172 and U87, by treatment with TAK-733, MS-275, a combination of both and Trametinib. To determine the microRNA-221/-222-expression changes upon irradiation and treatment, a qRT-PCR was performed. To visualize the changes in the uPAR area, western blots were used. The effects of substances and irradiation on the growth behaviour were checked with a 3D cell culture.

Results: LN229 and A172 showed a decrease of uPAR four hours after irradiation. In A172, Trametinib (0/4 Gy, after 48/72 hours) and TAK-733 (4 Gy, 72 hours) caused a significant decrease in uPAR. LN229 showed a significant decrease with Trametinib and TAK-733/MS-275 in 0 and 4 Gy samples. The 3D cell culture achieved a reduction of growth in LN229, A172 and U87 with TAK-733 and Trametinib in irradiated samples. In the unirradiated cell samples, with every treatment, growth reduction occurred.

Conclusion: The results demonstrate reproducibly decreased uPAR expression in A172 and LN229 with irradiation and treatment. This decrease is also seen at the RNA level. In U87, A172 and LN229, TAK-733 and Trametinib showed a cell growth arrest in irradiated samples. Regarding the consequences for a personalized radiotherapy, glioblastomas with these three phenotypes may have a better patient outcome when treated with TAK-733 and Trametinib.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation spiegelt das Ergebnis einer langen, anstrengenden aber auch sehr interessanten Zeit meines Studiums wider. An dieser Stelle möchte ich mich daher von ganzem Herzen bei all jenen bedanken, welche mich in dieser Zeit unterstützt, angeleitet und motiviert haben.

Allen voran möchte ich hier Herrn Prof. Dr. Thomas E. Schmid meinen großen Dank dafür aussprechen, dass er mir dieses Thema überlassen hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für sein Engagement über die ganze Zeitspanne dieser Arbeit hinweg und seine Geduld bei den Korrekturen. Auch für die Unterstützung bei allen organisatorischen Belangen bin ich ihm sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt natürlich auch Frau PD Dr.rer.nat. Natasa Anastasov. Sie hat es mir ermöglicht meine Dissertation in ihrer ausgezeichneten Arbeitsgruppe durchführen zu können. Auch bei ihr möchte ich mich für unzählige Ratschläge und die behutsame Heranführung an die Welt der experimentellen Wissenschaft danken. Unsere Gespräche waren stets motivierend und haben mir immer wieder den richtigen Weg nach vorne geleuchtet.

Für die Zukunft wünsche ich Ihnen beiden alles Gute.

Ein großer Dank geht auch an die technischen Assistentinnen Klaudia Winkler, Rosemarie Kell und Stephanie Winkler, die bei Problemen aller Art immer bereit zum Helfen waren. Ferner gilt mein Dank der Doktorandin Eno Itunu Essien für das Einlernen in die Kunst der Zellkultur und des Western Blot Versuchs.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, allen voran Heimo Wallisch. Er ermöglichte mir dieses tolle Studium. Doch auch meinen Eltern Johanna und Ernst Türk, sowie meinem Lebenspartner Christoph Wickenhöfer möchte ich großen Dank aussprechen. Vielen Dank für die immerwährende Unterstützung während des Studiums und der Verfassung dieser Arbeit.

Danke, dass ihr nie aufgehört habt an mich zu glauben!

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1 Glioblastoma multiforme	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie	2
1.1.3 Prognose und Krankheitsbild	3
1.1.4 Diagnostik	4
1.1.5 Therapie	5
1.2 Zielsetzung	10
2. Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Geräte	11
2.1.2 Festmaterialien	12
2.1.3 Chemikalien	13
2.1.4 Primer	15
2.1.5 Antikörper	16
2.1.6 Kits	17
2.1.7 Software	17
2.2 Methoden	18
2.2.1 Zellbiologische Methoden	18
2.2.2 Molekularbiologische Verfahren	22
2.3 Statistische Auswertungsmethodik	25
3. Ergebnisse	27
3.1 Screening der verwendeten Glioblastomzelllinien (Vorversuch)	27
3.1.1 Western Blot Vorversuche	27
3.1.2 PCR Vorversuche	30
3.2 3D-Zellkultur	31
3.3 Kombination von Behandlung mit Substanzen und Bestrahlung	34
3.3.1 Western Blot Versuche	34
3.3.2 PCR-Versuche	36
4. Diskussion	38

4.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	38
4.2	Diskussion der Methodik.....	38
4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	40
4.3.1	Western Blot und PCR Vorversuche	40
4.3.2	3D-Zellkultur.....	41
4.3.3	Kombination von Behandlung mit Substanzen und Bestrahlung	42
5.	Literaturverzeichnis	XI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Western Blot Übersicht mit allen Zelllinien 4 Stunden nach Bestrahlung	27
Abbildung 2: Grafische Darstellung der uPAR Expression aller Zelllinien 4 Stunden nach Bestrahlung.....	28
Abbildung 3: Western Blot Übersicht mit allen Zelllinien 24 Stunden nach Bestrahlung	28
Abbildung 4: Grafische Darstellung der uPAR Expression aller Zelllinien 24 Stunden nach Bestrahlung.....	29
Abbildung 5: uPAR Expression in der Zelllinie A172leer.....	29
Abbildung 6: microRNA-221 und microRNA-222 Expression in allen Zelllinien nach 24 Stunden ohne Bestrahlung, $*=p<0,05$, $***=p<0,001$,	30
Abbildung 7: uPAR Expression in allen Zelllinien nach 24 Stunden ohne Bestrahlung	31
Abbildung 8: relatives Wachstum der Zelllinie U87GFP 10 Tage nach Bestrahlung mit 4 Gy, $**=p<0,01$, $***=p<0,001$	32
Abbildung 9: U87GFP nach Tag 10 mit allen Substanzen mit Bestrahlung (4 Gy) und GFP, Hoechst (blau = lebendige Zellen) und Draq7(rot = tote Zellen) Aufnahme	33
Abbildung 10: uPAR Expression A172GFP 48 Stunden nach Bestrahlung, $*=p<0,05$	35
Abbildung 11: uPAR Expression A172GFP 72 Stunden nach Bestrahlung, $*=p<0,05$, $***=p<0,001$	35
Abbildung 12: uPAR Expression LN229GFP 72 Stunden nach Bestrahlung.....	36
Abbildung 13: uPAR Expression von A172GFP nach 48h auf RNA Ebene	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Geräte.....	11
Tabelle 2: Übersicht der Festmaterialien.....	12
Tabelle 3: Übersicht der Zellkulturchemikalien.....	13
Tabelle 4: Übersicht der Western Blot Chemikalien.....	13
Tabelle 5: Übersicht der RNA-Versuchschemikalien.....	14
Tabelle 6: Übersicht verwendeter Inhibitoren.....	14
Tabelle 7: Übersicht Buffer und Lösungen.....	15
Tabelle 8: Übersicht verwendeter Primer.....	15
Tabelle 9: Übersicht verwendeter Antikörper.....	16
Tabelle 10: Übersicht verwendeter Kits.....	17
Tabelle 11: Softwareübersicht.....	17

Abkürzungsverzeichnis

(q)RT PCR	engl.: (quantitative) real time polymerase chaine reaction, quantitative Echtzeit Polymerase-Ketten-Reaktion
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gy	Gray, Maßeinheit der Energiedosis Gy
HDAC	Histon-Deacetylase
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen
MGMT	Methyl-Guanin-Methyl-Transferase
microRNA	engl.: ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
PBS	engl.: phosphate-buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBST	engl.: Tris-buffered saline with Tween20, Tris-gepuffere Kochsalzlösung mit Tween20
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator-Rezeptor

1. Einleitung

Wieder ein Glioblastom. Ein großer, freundlicher Mann – ehemals. Verfall im Zeitraffer. Kompletter Sprachverlust, kann sich nicht mehr verbal ausdrücken, versteht nichts mehr, zeigt nur noch hilflos auf Dinge und stammelt. Gesichtsfeldeinschränkungen, Gleichgewichtsprobleme, Inkontinenz. [...] Vollkommener Zusammenbruch einer Persönlichkeit. (Bardamu 2016)

1.1 Glioblastoma multiforme

1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland wurden im Jahr 2013 rund 7.000 neue Fälle von Gehirntumoren vom Robert-Koch Institut registriert – nur ein Drittel davon ist bösartig (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (RKI) 2016, S. 21). Durchschnittlich erkranken demnach pro 100.000 Einwohner jährlich fünf bis sechs Personen an einem bösartigen Hirntumor (Alifieris und Trafalis 2015, S. 63). Von diesen, als bösartig diagnostizierten Hirntumoren, fallen 80% in die Rubrik der malignen Gliome und mehr als die Hälfte davon, identifiziert sich als ein Glioblastoma multiforme (Alifieris und Trafalis 2015, S. 63). Somit ist das Glioblastom der häufigste bösartige sowie hirneigene Tumor. Meist ausgehend von den Astrozyten, verändert er das Leben der Patienten schlagartig (Hanif et al. 2017, S. 3).

Jedes Lebensalter kann davon betroffen sein, die häufigsten Fälle werden jedoch zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr beobachtet mit einer Spitze um das 58. Lebensjahr. Die Inzidenz ist somit abhängig vom Alter, als auch vom Geschlecht. Dabei sind Männer im Verhältnis 1,5:1 häufiger betroffen als Frauen. (Iacob und Dinca 2009, S. 386)

Kinder können ebenfalls betroffen sein, jedoch stellen Glioblastome, mit einem Anteil von 8,8% an der Gesamtheit aller kindlicher Tumore des zentralen Nervensystems, eine Minderheit dar (Dohrmann et al. 1976, S. 443).

Bewiesen an Studien, scheint Ethnie ebenfalls eine Rolle zu spielen. Dunkelhäutige Menschen sind dabei seltener betroffen als Lateinamerikaner, Asiaten und hellhäutige Personen (Iacob und Dinca 2009, S. 386). Laut Thakkar et al. (2014, S. 1987) ist das Auftreten von Glioblastomen in Ländern mit einem hohen sozioökonomischen Status,

gegenüber Entwicklungsländern, häufiger. Dieses vermehrte Auftreten ist hauptsächlich durch einen besseren Zugang zu medizinischer Versorgung sowie einer effizienteren Diagnostik zu erklären (Fisher et al. 2007, S. 884). So ergibt sich für Amerika eine Inzidenz von 10 Diagnosen je 100.000 Einwohnern pro Jahr (Zülch 1986).

Im Vergleich zu anderen Krebsarten, wie dem Mammakarzinom oder dem Prostatakrebs, ist das Glioblastom ein seltener Befund. Im Jahr 2013 erkrankten 174 Frauen pro 100.000 Einwohnerinnen in Deutschland an Brustkrebs, während es bei Prostatakarzinom 151 pro 100.000 Einwohner pro Jahr waren (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (RKI) 2016, S. 36, 40).

1.1.2 Ätiologie

Die Entstehung eines Glioblastoms ist bis heute nicht vollständig erforscht. Es wird davon ausgegangen, dass sich der Tumor aus hirneigenen Stützzellen, den sogenannten Astrozyten, entwickelt und somit zu der Gruppe der astrozytischen Tumoren zählt (Hanif et al. 2017, S. 3). Nach Friedmann-Morvinski et al. (2012, S. 1080), können reife kortikale Neurone ebenfalls ein Ursprungsgewebe sein.

Zur allgemeinen Klassifikation von Hirntumoren, wird die im Jahr 2007 zum vierten Mal erschienene WHO Klassifikation von Tumoren des Zentralnervensystems verwendet. In diesem System wird zwischen vier Graduierungen unterschieden. Bei Tumoren, welche sich der Stufe 1 zuordnen lassen, besteht die Option einer operativen Heilung. Bedingt ist dies hauptsächlich durch die geringe Proliferationsrate der Tumore – ein klassisches Merkmal der 1. Stufe. Grad II weist zusätzliche Gewebsinfiltrationen auf. Treten mitotische Aktivität und Kernatypien auf, stellen diese sogenannte eindeutige Malignitätskriterien dar und erfordern die Klassifikation nach Stufe 3. Unabhängig von einer primären oder sekundären Genese werden Glioblastome, aufgrund ihrer schlechten Prognose und der Aggressivität, stets als Grad IV eingestuft und zählen somit zu den gefährlichsten aller Hirntumore. (Louis et al. 2007, S. 106)

Als Primärtumore entstehen Glioblastome völlig neu und eigenständig und sind nicht auf andere maligne Entitäten zurückzuführen (Iacob und Dinca 2009, S. 387). Wirsching et al. (2016, S. 381, 383, 387) berichtet über ein selteneres in Erscheinung treten als sekundäre Form, dann aber mit besserer Prognose. Betroffen sind nach ihm junge Patienten, mit einem in der Vorgeschichte bestehenden, weniger bösartigen WHO-Grad II oder III Hirntumor. Beschrieben wird auch, dass diese vorangegangenen

Läsionen sich durch bestimmte genetische Veränderungen zu einem sekundären Grad IV Glioblastom entwickeln.

Die Entwicklung eines Grad IV Glioblastoms wird an Hand von Risikofaktoren gefördert. Ein begünstigender Faktor für die Entstehung von malignen Neoplasien, wie dem Glioblastom, ist ionisierende Strahlung (Ellor et al. 2014, S. 172). Nach Johnson et al. (2015, S. 111) findet sich diese vor allem in therapeutischer Bestrahlung anderer Tumordiagnosen als Trigger für durch Strahlung induzierte Glioblastome wieder. Er erläutert jedoch einen erst Jahre später nach vorangegangener Therapie zu Stande gekommenen eigentlichen Ausbruch des Hirntumors. Die Autoren Alifieris und Trafalis (2015, S. 64) konnten auch zwischen spezifischeren Umweltfaktoren, allen voran Rauchen, Pestizide, Vinylchlorid und der Erdölraffinierung einen Zusammenhang mit der Glioblastomentwicklung herstellen. Kein Tumor ist ihres Wissens hingegen bei Formaldehyd, magnetischen Feldern (z.B. im Rahmen eines MRT) und elektromagnetischer Strahlung von Mobiltelefonen zu erwarten. Des Weiteren zeigen einige genetisch bedingte Erbkrankheiten wie das Li-Fraumeni-Syndrom, die Tuberoöse Sklerose, das Turcot-Syndrom und das Retinoblastom, sowie die Neurofibromatose 1 und 2 ein erhöhtes Risiko (Ellor et al. 2014, S. 172).

1.1.3 Prognose und Krankheitsbild

Trotz der Seltenheit dieser Hirntumore zieht die Diagnose des Glioblastoms weitreichende Folgen und Konsequenzen mit sich. Nicht nur der Körper als funktionierender Organismus, auch das soziale Leben und Umfeld werden in Mitleidenschaft gezogen. So verringert ein Glioblastom individuell die Lebensqualität und führt zu einer verkürzten Gesamtlebensdauer (Omuro und DeAngelis 2013, S. 1842). Sich plötzlich nicht mehr auf seinen Körper verlassen zu können, weil das Gehirn in seiner Funktion beeinträchtigt ist, ist für die Patienten nur schwer zu ertragen.

Mit den aktuell angewendeten Therapieoptionen, wie Operation sowie Radio- und Chemotherapie, liegt das mittlere Gesamtüberleben derzeit bei 14 Monaten (Hanif et al. 2017, S. 3). Die 2-Jahres Überlebensrate liegt bei 26-33%, während die ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung nur 4-5% der Betroffenen überleben (Batash et al. 2017, S. 3002).

Das Glioblastom, auch als Glioblastoma multiforme bezeichnet, ist besonders heimtückisch. Die Benennung „multiforme“, lässt die Heterogenität dahinter erahnen.

Unterschiedlichste pathologische und genetische Muster, sowie kein klar definierter Symptomkomplex, machen eine Zuordnung schwierig. Darüber hinaus schreiten diese Tumore in ihrem Wachstum sehr schnell voran, was sich in der relativ kurzen Dauer (wenige Monate) der Symptomentwicklung und –steigerung, als auch im plötzlichen Auftreten der Symptomatik, widerspiegelt. Zu dieser abrupten Erscheinung, in Form von epileptischen Anfällen oder hartnäckigen Kopfschmerzen, kommt es erst, wenn der Tumor eine gewisse Größe erreicht hat. Patienten berichten in diesem Stadium auch von Gesichtsfeldeinschränkungen, neurologischen und sensorischen Ausfällen, Bewusstseinsstörungen, Persönlichkeitsveränderungen sowie Schlaganfallsymptomatik und Hemiparesen. Diese Merkmale sind lokalisationsabhängig und auf Einklemmungen und Infiltrationen von umliegendem Gewebe, sowie eine Steigerung des intrakraniellen Drucks, zurückzuführen. Nach ersten Therapiemaßnahmen verschwindet die beschriebene, akut lebensbedrohende Hirndrucksymptomatik. An ihre Stelle treten Polyradikulopathien, Schädelneuropathien sowie kognitive Probleme. (Iacob und Dinca 2009, S. 387)

1.1.4 Diagnostik

Steht der Verdacht eines Glioblastoms im Raum, findet sich oft eine sehr kurze Anamnese von wenigen Monaten (Iacob und Dinca 2009, S. 387). Aguzzi et al. (2013, S. 11) empfiehlt als ersten diagnostischen Schritt eine vollständige neurologische Untersuchung zur Abklärung durchzuführen, welche dann mit neurologischer Bildgebung – ein unverzichtbarer Baustein - fortgeführt wird. Die ersten Mittel der Wahl sind nicht-invasive bildgebende Verfahren, wie die Magnetresonanztomographie (MRT, Goldstandard) und die Computertomographie (CT) (Iacob und Dinca 2009, S. 388). In besonderen Gegebenheiten und oder zur posttherapeutischen Nachsorge, kommt die Positronen–Emissions–Tomographie für die Diagnostik zum Einsatz (Aguzzi et al. 2013, S. 11).

Anhand dieser bildgebenden Verfahren können Glioblastome, aufgrund von typischen Erscheinungsmerkmalen, diagnostisch gesichert werden. Eines dieser Merkmale ist eine heterogene Kontrastmittelaufnahme, begleitet von einer Verringerung der Signalintensität im Zentrum, wodurch das Bild einer kreisförmigen Kontrastmittelaufnahme entsteht (Iacob und Dinca 2009, S. 388). Erklärbar ist dies durch das schnelle Wachstum des Tumors, welcher sich in seiner Größe innerhalb von 50 Tagen verdoppeln kann (Stensjøen et al. 2015, S. 1409).

Dies führt zu dem Umstand, dass die Bildung von neuen Blutgefäßen, um den Tumor zu versorgen, mit dem aggressiven Wachstum nicht mehr mithalten kann. Der Kern des Geschwürs stirbt ab und wird zu einer Nekrose, welche kein Kontrastmittel mehr aufnimmt. Rund um den Primärtumor werden Ödembildungen beobachtet. Aufgrund dieser Merkmale müssen differentialdiagnostisch Lymphome, Metastasen und Abszesse abgeklärt werden. (Iacob und Dinca 2009, S. 388–389).

Des Weiteren spielen die Infiltration in benachbarte Hirnareale, als auch das Gelingen einer Komplettresektion, eine wesentliche prognostische Rolle (Aguzzi et al. 2013, S. 17, 18, 33). Die Operabilität ist besonders abhängig von der Lokalisation des Tumors. Die häufigsten Entstehungsorte befinden sich nach Iacob und Dinca (2009, S. 388) supratentoriell in den Großhirnhemisphären. Den Frontallappen beschreiben sie als bevorzugt betroffen, gefolgt von Temporallappen und Basalganglien. Wachsen Glioblastome über den Corpus Callosum (Balken), sprich bilateral, werden sie als Schmetterlingsglioblastome bezeichnet (Iacob und Dinca 2009, S. 388).

1.1.5 Therapie

Nahezu unabhängig von der Lokalisation richtet sich die Therapie, wie bereits erwähnt, primär nach der Operabilität. Somit ist die vollständige Resektion des Tumors das wichtigste Therapieziel (Aguzzi et al. 2013, S. 33). Fluoreszenzmarkierungen von Tumorzellen und mikrochirurgische Operationstechniken helfen, dieses Ziel zu erreichen und den Anteil an Progressionsfreiheit sechs Monate später zu steigern (Stummer et al. 2006, S. 397, 399). Zwischen 24 und 48 Stunden nach der chirurgischen Tumorentfernung wird ein Kontroll-MRT zur Beurteilung des Resektionserfolges durchgeführt (Aguzzi et al. 2013, S. 33).

Die primäre operative Entfernung des Tumors reicht als alleinige Therapieoption jedoch nicht aus. Glioblastompatienten erhalten standardmäßig adjuvante Strahlen- und oder Chemotherapie.

Strahlentherapie:

Kein Glioblastompatient ist wie der andere. Somit muss sich auch die Strahlentherapie an jeden Patienten individuell anpassen. Dabei wird auf das Alter und den Allgemeinzustand Rücksicht genommen (Aguzzi et al. 2013, S. 34). In Deutschland empfiehlt die Leitlinie zur Strahlentherapie eine Gesamtdosis von 60 Gy, welche in Einzeltherapien zu je 2 Gy über 6 Wochen (entsprechen 30 Tage) verabreicht wird

(Perry et al. 2017, S. 1028). Dies trifft auf Patienten mit gutem Allgemeinzustand und unter 65 bis 70 Jahren zu (Aguzzi et al. 2013, S. 34). Bei Patienten, welche älter als 65 bis 70 Jahre sind und sich in einem schlechten Gesundheitszustand befinden (Begleiterkrankungen, neurologische Defizite), empfiehlt Roa et al. (2004, S. 1584–1586) eine andere Aufteilung der Dosis. Gemeint ist die sogenannte Hypofraktionierung, bei der die Patienten 15 Einzelbestrahlungen mit einer Gesamtdosis von 40 Gy erhalten.

Chemotherapie:

In der Chemotherapie wird als Standardmedikation zuerst auf das Temozolomid zurückgegriffen (Stupp et al. 2009, S. 465). In Thomas et al. (2017, S. 823) wird dieses als ein Zytostatikum (Chemotherapeutikum), welches zur Gruppe der antineoplastischen Alkylanzien gehört, definiert. Besonders wird darin auch belegt, dass Temozolomid die Blut-Hirn-Schranke passiert und sich somit als Therapeutikum bei einem Glioblastom verwenden lässt. Es wird überwiegend in oraler Form eingenommen und bewirkt in den Zellen des Tumors eine Störung der DNA-Replikation (Thomas et al. 2013, S. 3).

Als primäres chemotherapeutisches Verfahren, sollte Temozolomid besonders bei jungen Patienten (unter 65 Jahren) mit gutem Allgemeinzustand zur Anwendung kommen. Liegt ein negativer Tumornachweis postoperativ sowie ein guter Patientenzustand vor, endet die Chemotherapie standardmäßig nach sechs Zyklen. Bleibt in der Bildgebung ein Resttumorgewebe zu erkennen, besteht die Option die Therapie mit Temozolomid individuell zu intensivieren und fortzusetzen. (Aguzzi et al. 2013, S. 34)

Ein besonderes Spektrum in der Chemotherapie sind Patienten im höheren Alter (älter als 65 bis 70) und mit schlechten Allgemeinzustand. Um auch ihnen die richtige Therapie zukommen zu lassen, wird bislang der Status des Biomarkers und DNA-Reparaturenzyms MGMT (Methyl-Guanin-Methyl-Transferase) getestet (Perry et al. 2017, S. 1028). Dieser ist ein prädiktiver Faktor bei der Temozolomidtherapie, zur Bestimmung des Therapieansprechens (Stupp und Hegi 2017, S. 19, 21). Abhängig von der Methylierung des MGMT Promoters, erhalten hochbetagte Patienten eine alleinige Strahlentherapie (ohne Methylierung) oder eine Therapie mit Temozolomid (mit Methylierung) (Wick et al. 2012; Malmström et al. 2012).

Weitere Therapiekonzepte:

Aufgrund der Bösartigkeit des Glioblastoms steht die Forschung zu neuen Therapiekonzepten niemals still.

Eine Studie der Canadian Cancer Trials Group aus Kanada zeigt, dass eine Kombination aus Strahlentherapie und Chemotherapie mit Temozolomid, auch für alte Menschen einen Überlebensvorteil bringt. Hier profitieren Glioblastompatienten mit einer Hypermethylierung des MGMT-Markers. Die Überlebenszeit steigt dabei von 7,7 auf 13,5 Monate an. Sogar Patienten mit ungünstigen, beziehungsweise negativen MGMT-Status, profitieren von der Kombination. In diesen Fällen erhöht sich die Zeit des Überlebens von 7,9 auf 10 Monate. (Perry et al. 2017, S. 1035)

Auch das Pharmazieunternehmen APOGENIX forscht in Kooperation mit dem deutschen Krebsforschungszentrum an Therapiemöglichkeiten. Der in klinischen Studien getestete Wirkstoff APG101, welcher ein CD95 Ligand ist, zeigt Wirksamkeit. In Kombination mit Strahlentherapie, zeigten 20,7% der ersten Gruppe (58 Probanden), ein progressionsfreies Intervall von sechs Monaten. Bei alleiniger Strahlentherapie in Gruppe 2 mit 26 Probanden, erreichten dieses Intervall 3,8% der Patienten. Insgesamt wurden 84 Teilnehmer eingebunden. (Wick et al. 2014, S. 6304)

An einem Konzept mit Chemo- und neuer Antikörpertherapie gegen Glioblastome, forschen Wissenschaftler vom Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurologie der Universitätsmedizin Mainz. Die verwendeten Antikörper Anti-EGFL7 und Anti-VEGF, in Kombination mit Temozolomide, hemmen die Angiogenese und tragen zu einem Wachstumsstopp des Tumors bei. (Dudvarski Stanković et al. 2018, S. 1)

Die verschiedenen, zuvor genannten, Therapieansätze weisen eine Wirksamkeit in den Gebieten des progressionsfreien Überlebens sowie der Tumorwachstumshemmung auf.

Neue Therapieschemata:

Eine neue Chance auf Heilung bringen HDAC und MEK1 Inhibitoren, welche im Rahmen dieser Dissertation, unter anderem im Mittelpunkt stehen. Unter diesen Inhibitoren sind insbesondere die Substanzen TAK-733, MS-275 und Trametinib zu verstehen. Ihre unterschiedlichen Wirkschemata sollen das Zellwachstum in Glioblastomen stoppen und werden im Folgenden kurz erläutert.

TAK-733:

Die vorliegende Substanz besitzt seine Besonderheit in der antineoplastischen Wirkung. Als niedermolekulares und oral verfügbares Medikament, ist es ihr möglich die Mitogen-aktivierenden Proteinkinase - Kinase (MEK1, als auch MEK2) zu hemmen. Der Inhibitor bindet an die Kinase und ist dadurch in der Lage, MEK1 abhängige Transkriptionsfaktoren und Effektorproteine in ihrer Aktivierung zu hemmen. Dies wiederum führt dazu, dass wachstumsfaktorgesteuerte Tumorpheriferationen und Zellsignalwege gehemmt werden. Da MEK1 zur Gruppe der Tyrosin- und Threonin-Kinasen gehört, wird ihr eine entscheidende Schlüsselrolle bei der Tumorentstehung zugeschrieben. Diese Rolle ist unter anderem auf die Aktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs zurückzuführen. Aufgrund der häufigen Hochregulierung von MEK1 in Tumorzelltypen, stellen Inhibitoren wie TAK-733 therapeutische Angriffspunkte dar. (National Center for Biotechnology Information 2008)

Trametinib:

Trametinib gehört, wie TAK-733, ebenfalls zu den MEK1 Inhibitoren und funktioniert nach dem gleichen, oben beschriebenen, Wirkmechanismus.

MS-275:

Auch als Entinostat bezeichnet, weißt MS-275 ebenfalls eine antineoplastische Aktivität auf. Es gehört zu den Histon-Deacetylase (HDAC) Inhibitoren und blockiert die Isoform 1 (HDAC1) und Isoform 3 (HDAC3). Die grundlegende Aufgabe der Histon-Deacetylasen ist die Regulierung der Gentranskription und der Chromatinstruktur, welche durch die Inhibition nicht mehr ausgeführt werden kann. (National Center for Biotechnology Information 2005)

Darüber hinaus bewirkt MS-275 im Glioblastom eine Hemmung der Angiogenese sowie der Metastasierung, eine Apoptose, einen Zellzyklusarrest als auch die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (Marks und Xu 2009, S. 600; Falkenberg und Johnstone 2014, S. 675). Die Möglichkeit der Verwendung von MS-275 als Einzel- oder Kombinationstherapeutikum zur Behandlung eines Glioblastoms, sowie die oben beschriebenen breitgefächerten Auswirkungen auf den Tumor, machen die Substanz Erfolg versprechend (Lee et al. 2017, S. 18580).

Aufgeführte Substanzen, als auch die Bestrahlung, wirken sich durch ihren komplexen Mechanismus letztendlich auch auf den sogenannten Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und seinem Rezeptor (uPAR) aus. Beide sind dem Plasminogen-Plasmin System zugehörig (McMahon und Kwaan 2015, S. 146). Weitere Auswirkungen zeigen sich auch auf microRNA Ebene.

Das Plasminogen-Plasmin System spielt physiologisch eine Rolle bei der Auflösung von Blutgerinnsel. Gemeinsam mit der oben erwähnten Rezeptor-Liganden Kombination (uPA und uPAR) und weiteren Aktivatoren (tPA) und Inhibitoren (PAI-1, PAI-2), ist es jedoch auch an der Wundheilung, an entzündlichen Prozessen, sowie an der Apoptose der Zellen beteiligt. (McMahon und Kwaan 2015, S. 146)

Im Glioblastom bekommen insbesondere der uPA und der uPAR eine weitere Rolle zu tragen. Sie sind in den Tumoren nachweislich erhöht und maßgeblich für die Entstehung von Metastasen, Angiogenese, Migration sowie infiltrativen Wachstum verantwortlich. (Kugaevskaya et al. 2019, S. 97–98)

Eine ähnliche Funktion kommt den microRNAs zu. Diese kleinen RNA Moleküle, bestehend aus Nukleotiden, spielen in der Krebsentstehung eine enorme Rolle (Chuang und Jones 2007, S. 24R-25R). Im Glioblastom sind unter anderem die microRNA-221 und microRNA-222 erhöht und können zu diagnostischen und prognostischen Zwecken, aufgrund ihrer Funktion als molekulare Biomarker, herangezogen werden (Swellam et al. 2019, S. 548, 550). Des Weiteren wird die posttranskriptionale Proteinbiosynthese, durch die als ein Onkogen fungierende microRNA-221, negativ in ihrer Regulation beeinflusst (Xie et al. 2014, S. 455, 462). Angiogenese, infiltratives Wachstum, sowie die Zellproliferation werden von beiden microRNAs gefördert (Xu et al. 2019, S. 22277–22278).

1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden, experimentellen Dissertation ist es, im ersten Schritt das Expressionsniveau der Proteine uPAR und uPA sowie jenes der microRNA (microRNA-221 und microRNA-222) in fünf unterschiedlichen Glioblastomzelllinien (LN229, U87, A172, LN18 und U251) ausfindig zu machen, um einen Referenzwert für nachfolgende Experimente (z.B.: Bestrahlung, Behandlung) zu erhalten.

Anhand von Zellkulturexperimenten soll dann, mittels Vorversuchen, festgestellt werden, wie sich die Bestrahlung von Glioblastomzellen, auf die oben genannten Expressionen, auswirkt. Auftretende Expressionsveränderungen werden auf RNA- und Proteinebene mit entsprechenden Verfahren sichtbar gemacht.

Im Falle einer positiven Reaktion (Erniedrigung der Expression) wird im nächsten Schritt beobachtet, ob die oben beschriebenen HDAC (MS-275) und MEK1 Inhibitoren (TAK-733 und Trametinib) auch Auswirkungen auf das Zellwachstum haben. Zur Überprüfung soll eine 3D-Zellkultur durchgeführt werden.

Wird in diesem Schritt ein verringertes Wachstum festgestellt, werden besagte Substanzen für eine medikamentöse Behandlung der Zellen herangezogen. Im Fokus steht dabei deren Wirksamkeit, in Betracht auf ein verändertes Expressionsniveau auf Protein- und RNA Level.

Alle daraus folgenden Erkenntnisse können dazu beitragen, neuartige therapeutische Strategien im Rahmen einer personalisierten Strahlentherapie mit verbesserten Patientenoutcome zu etablieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Das für die Durchführung dieser Dissertation benötigte Material, wird im folgenden Abschnitt vorgestellt.

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Übersicht der Geräte

Geräte	Produzent
Centrifuge 5424 R	Eppendorf
Centrifuge Biofuge pico	Heraeus
Centrifuge Rotina 420	Hettich Zentrifugen
COMBI SPIN FVL – 2400	peqLab Biotechnologie GmbH
Coulter Particle counter	Beckman Coulter
Countess II	Life Technologies
Criterion™ Blotter	BioRad
Eppendorf Research 2100 Pipette	Eppendorf
Flour Chem HD2 Version: 1.2.1.0	Alpha Innotech
Gradienten Cycler, 96x0, 2ML Block	peqLab Biotechnik GmbH
Incubator Function Line	Heraeus
Magnetic stirrer MR 3000	Heidolph
Maxwell 16 Instrument	Promega
Microscope Axiovert 25 HBO50	Zeiss
Mighty Small II	Amersham Biosciences
Mini Trans-Blot Cell	BioRad
Multiple Gel Caster	Hofer
NanoDrop 1000	Thermo Scientific
Operetta imaging system	PerkinElmer
Pipette accu-jet pro®	BRAND
Power Pac Basic™	BioRad

Precision balance	Sartorius
Roll mixer RS-TR05	Phoenix Instruments
Serological pipette	Greiner bio one
Shaker KS250 basic	IKA Labortechnik
StepOnePlus RT PCR System	Applied Biosystems
Tecan infinite M200	Tecan
Thermomixer Compact	Eppendorf
Vortex – Genie	Bender und Hobein AG
Water bath WB7 with beads	Memmert
X cell 4 Sure Lock™ Midi-Cell	ThermoFisher
X-Strahl RS225	XSTRAHL LTD

2.1.2 Festmaterialien

Tabelle 2: Übersicht der Festmaterialien

Material	Produzent
Adhesive Clear qPCR Seals, Sheets	Biozym
Countess 50 cell counting chamber slides	ThermoFisher
Cryotubes 1,2ml	Kisker Biotech GmbH
Eppendorf Tubes 1,5ml/2ml	Eppendorf
Falcon Tubes 50 ml/15 ml	Greiner bio one
Gravity Trap™ uLA Plate, 96 wells	Inspheero
Nuncleon™ Delta Surface 96 well plate	ThermoFisher
NuPage™4 – 12 % Bis Tris Midi Gel, 10 mm x 26 wells	Invitrogen
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	ThermoFisher
PCR 96-well TW-MT-Platte, farblos	Biozym
PCR Single Cap 8er- SoftStrips, 0,2ml, farblos	Biozym

Protran TM 0,2µM Nitrocell. Blotting Membrane	Amersham TM
Rect. Glass Plates 10x10	Hoefler inc Serva
Zellkulturflaschen 250ml, 75cm ² 50ml, 25cm ² 550ml, 175cm ²	Cellstar cell culture Flasks

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Übersicht der Zellkulturchemikalien

Chemikalien (Zellkultur)	Produzent
0,05% Trypsin – EDTA (1x)	Gibco, Life Technologies
80% Ethanol	Merck
Dimethyl sulfoxide	Sigma life science
DMEM (1x) + GlutaMAX TM -I; +4,5 g/L D-Glucose und Pyruvat	Life Technologies, Gibco
DMEM IF – 12 (1:1) (1x)+ GlutaMAX TM -I F-12 Nutrient Mixture (Ham)	Life Technologies, Gibco
DRAQ7 TM	Cell Signalling Technology
Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific/HyClone
Hoechst 33342	Abcam
PBS	9,55g PBS + 1000 ml MilliQ H2O
Trypan Blue	Invitrogen

Tabelle 4: Übersicht der Western Blot Chemikalien

Chemikalien (Western Blot)	Produzent
Acrylamide/Bis Solution, 37,5:1	Serva
cComplete Tablets, Mini, EDTA-free	Roche

Lämmli Sample Buffer (4x)	Bio-Rad
Luminol Solution ECL Select	Amersham™
Milchpulver, Blotting grade, fettarm	Roth Carl
Peroxide Solution ECL Select	GE Healthcare UK Limited
PhosphoSTOP	Roche
Ponceau Rot	Sigma-Aldrich
Roti-Block; ready-to-use 10 x Konzentrat	Roth Carl
Tamed p.a.; 99%	Roth Carl
T-PER™ Tissue Protein; Extraction Reagent	ThermoFisher

Tabelle 5: Übersicht der RNA-Versuchschemikalien

Chemikalien (RNA Versuche)	Produzent
0,1 M DTT	Invitrogen
10mM dNTP Mix	Invitrogen
5x First Strand Buffer	Invitrogen
Oligo (dT) 12 – 18 Primer; 0,5µg/µl	Invitrogen
Random Hexamers; Qyt: 50µM, 5nmoles	Invitrogen
RNaseOUT™ Recominant; Ribunuclease Inhibitor; 5.000U (40U/µl)	Invitrogen
SuperScript II; Reverse Transkriptase, Qyt: 10.000U (200U/µl)	Invitrogen
TaqMan MicroRNA Reverse Transkription Kit	Applied Biosystems™, Thermo Fisher
TaqMan Universal PCR MasterMix	Applied Biosystems™, Thermo Fisher

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Inhibitoren

HDAC- und MEK-Kinase Inhibitor
10 µM MS – 275

10 μ M TAK 733
10 μ M Trametinib

Tabelle 7: Übersicht Buffer und Lösungen

Buffer und sonstige Lösungen	Zusammensetzung / Produzent
10 x TBST (pro 1 Liter):	4,24g Tris (M= 121,14g/mol) 26g Tris-HCL (M=157,6g/mol) 80g NaCl 990ml Milli Q 10ml Tween 20
5x Running Buffer (pro 1 Liter):	15,1g Tris 94g Glycine 900-1.000ml Milli Q 50ml 10% SDS
Milli Q destilliertes Wasser	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
NuPage MES SDS Running Buffer (20x)	novex by life technologies
Restore TM PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific
Towbin-Buffer (pro 1 Liter):	3,03g Tris 14,4g Glycine 800ml Milli Q 200ml Methanol
T-PER Lysepuffer (10ml)	10ml T-PER + 1 tablet PhosphoSTOP + 1 tablet cComplete

2.1.4 Primer

Tabelle 8: Übersicht verwendeter Primer

Primer
Hs00958880 m1 PLAUR; 250 μ l; 20x Mix

Hs01547054 m1 PLAU; 250µl; 20x Mix
hsa – miR – 221; PN4427975 150µl 5x
hsa – miR – 221; PN4427975 150µl 20x
hsa – miR – 222; PN4427975 150µl 5x
hsa – miR – 222; PN4427975 150µl 20x
RNU44; PN4427975 150µl 5x
RNU44; PN4427975 150µl 20x
TBP 20x

2.1.5 Antikörper

Tabelle 9: Übersicht verwendeter Antikörper

Antikörper	Produzent
Primäre:	
Human uPA (HMW-scuPA, HMW-tsuPA and LMW-scuPA) 49kDa	Abcam
Human u-Plasminogen Activator (uPAR)/ Urokinase Receptor A; 37 – 55 kDa; 1:500	Frauenklinik MRI/ Dr. V. Magdolen
Mouse monoclonal anti human β -Actin antibody, A5441	Sigma-Aldrich
Sekundäre:	
Goat Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase Conjugate, A16066	Invitrogen
Goat Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase Conjugate, A16096	Invitrogen

2.1.6 Kits

Tabelle 10: Übersicht verwendeter Kits

Kit	Produzent
Maxwell 16 miRNA Tissue Kit	Promega
Pierce TM BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher

2.1.7 Software

Tabelle 11: Softwareübersicht

Software	Produzent
GraphPad Prism5, 5.04	GraphPad Software
imageJ, 1.49	SciJava projects

2.2 Methoden

Die für die Durchführung dieser Dissertation notwendigen Methoden, werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die einzelnen Glioblastomzelllinien unterscheiden sich durch den Zusatz „leer“ bzw. „GFP“. Bei letzterem, ist in den Zellen das sogenannte „grün fluoreszierende Protein“ integriert, welches ein grünes Leuchten der Zellen unter ultraviolettem Licht ermöglicht. Zelllinien mit dem Zusatz „leer“ haben dieses Protein nicht enthalten. GFP hat keinen Einfluss auf die Eigenschaften und das Verhalten der Zelllinien, sondern dient lediglich dem Nachweis unter UV Licht.

2.2.1.1 2D-Zellkultur

Die Glioblastomzelllinien wurden für die Vorversuche (LN229leer, U87GFP, A172leer, LN18GFP und U251GFP), und den Behandlungsabschnitt (LN229GFP, A172GFP) der Dissertation, als 2D-Zellkultur, in unterschiedlich großen Zellkulturflaschen angezüchtet. Dabei wurde für die Zelllinien U87, A172, LN18 und U251, unabhängig vom GFP-Status, das Medium DMEM (1x) + GlutaMAXTM-I +4,5g/L D-Glucose und Pyruvat und für die Linie LN229 DMEM IF-12 (1:1) (1x) + GlutaMAXTM-I F-12 Nutrient Mixture (Ham) verwendet. Dem ersten Medium wurden 10% fetales Kälberserum (FCS) beigesetzt, dem zweiten Medium 20%. Nach ausreichend dichter Besiedelung in den Zellkulturflaschen, wurden die Zellen passagiert.

Dazu wurde das Medium vollständig abgesaugt und der Zellrasen mit 20ml (bei T175-Zellkulturflaschen) PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen zum Ablösen von ihrem Untergrund, mit 2ml 0,05% Trypsin-EDTA bedeckt und 5 Minuten lang inkubiert. Die Reaktion wurde mit 8ml frischem entsprechendem Medium gestoppt und die Zellsuspension in einen Falcon gegeben. Um die Zellen vom Medium zu separieren, wurde für 5 Minuten bei 300g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert. Abschließend wurden die passagierten Zellen in, mit Medium befüllte, Zellkulturflaschen überführt.

Zum Wachsen befanden sich die Zellen in einem Inkubator mit 5% CO₂ Gehalt bei 37 Grad Celsius.

Zellzählung und Überführung in T25 Flaschen

Für die Experimente des Vorversuchs- und des Behandlungsabschnittes wurden gleich große Zellproben aus den angezüchteten Grundstöcken benötigt. Dafür wurden die Zellen ausgezählt und in T25 Flaschen überführt.

Zum Zählen wurden die Proben nach dem Zentrifugieren und Resuspendieren verdünnt. Für die Zellen des Vorversuchs wurde der Beckman Coulter Particle Counter verwendet. Dazu entnahm man der Zellsuspension 0,5ml Zelllösung und fügte sie zu 19,5ml Natriumchloridlösung (0,9%) hinzu. Das automatisierte Zählgerät Beckman Countess wurde für die Zellen des Behandlungsabschnittes benutzt.

Nach erfolgtem Zählen wurden die gezüchteten Zellen in T25 Zellkulturflaschen überführt. Die Verwendung dieser kleineren Zellkulturflaschen erklärte sich dadurch, dass die Flaschengröße der Zellzahl angepasst wurde. Jede der Flaschen enthielt eine Zellzahl von einer Million Zellen. Abschließend wurden die neu ausgesäten Flaschen erneut inkubiert, um sie später für die Behandlung bzw. Bestrahlung verwenden zu können.

2.2.1.2 3D-Zellkultur

Dieser Teil der Dissertation, befasste sich mit der Anzüchtung der Zelllinien LN229GFP, A172GFP und U87GFP in einer 3D-Zellkultur.

Dafür verwendete man sogenannte Gravity TrapTM uLA Platten mit 96 Wells. Für jede der drei Linien, wurden zwei Platten angelegt. Eine davon wurde mit 4 Gy bestrahlt, die andere nicht.

Folgender Ablauf stellt den über mehrere Tage reichenden Verlauf des Experiments zur besseren Veranschaulichung dar:

Als erster Schritt, erfolgte das Aussäen der Platten mit entsprechender Zellzahl in unbehandeltem Medium. Nach 48 Stunden, wurde die Behandlung mit Substanzen (TAK-733, MS-275 und Trametinib) der 0 und 4 Gy Platten gestartet. 24 Stunden nach Behandlung (= Tag 0) wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt. Die ersten GFP-Fotoaufnahmen der 0 und 4 Gy Platten entstanden an Tag 1 (= 24 Stunden nach Bestrahlung). Am sechsten Tag, wurden GFP-/Hoechst-/Draq7 Färbungen und Fotoaufnahmen (obere Plattenhälften) der 0 und 4 Gy Platten angefertigt und ein Mediumwechsel der unteren Plattenhälften durchgeführt. Am zehnten und letzten Tag

des Experiments, wurde erneut mit GFP-/Hoechst-/Draq7 gefärbt und Fotoaufnahmen (untere Plattenhälften) der 0 und 4 Gy Platten angefertigt.

Zu Beginn wurden die Zellen des Grundstocks der drei Linien mit dem Beckman Particle Counter, nach gleichem Verfahren, welches auch für den Vorversuchs- und Behandlungsabschnitt angewendet wurde, ausgezählt. Nachfolgend wurde eine passende Verdünnung hergestellt, sodass für die Zelllinien LN229GFP und A172GFP 2.000 Zellen pro Well und für U87GFP 500 Zellen pro Well ausgesät wurden. Sprich, in jedem belegten Well befanden sich 2.000 bzw. 500 Zellen in 100µl entsprechendem Medium. Anschließend wurden die Platten bei 250g für 2 Minuten zentrifugiert und zum Wachstum inkubiert.

Um den wachsenden Zellen nun behandeltes Medium zuzufügen, wurden von den 100µl Gesamtvolumen die Hälfte abgesaugt und gegen besagtes, behandeltes Medium ausgewechselt. Dafür wurde wie folgt vorgegangen: Aufgrund der Verwendung von einer bestrahlten und einer unbestrahlten Platte, auf welcher sich jeweils 2 x 8 Wells pro Substanz befanden, ergaben sich inklusive Reserve 50 Wells. Jedes Well beinhaltete 50µl Medium, wodurch sich ein Gesamtvolumen von 2.500µl berechnete. Darin inkludiert waren 2% DMSO mit inbegriffener Substanz in der Konzentration von 2µM, was gemeinsam einer Summe von 50µl entsprach. Dabei berechnete sich das Substanzvolumen mit 0,5µl. Die Herstellung des Mediums für TAK-733, MS-275 und Trametinib setzte sich demnach jeweils aus 2.450µl Medium, 49,5µl DMSO und 0,5µl Substanz zusammen. Für die Kombination aus TAK-733 und MS-275 wurden 2.450µl Medium, 49,0µl DMSO und zweimal je 0,5µl Substanz herangezogen. Die DMSO-Negativkontrolle wurde ohne Substanzen mit 2.450µl Medium und 50µl DMSO hergestellt.

24 Stunden nach erfolgter Behandlung, wurden die 4 Gy Platten entsprechend bestrahlt. Um einen Ausgangswert zu erhalten, wurden an Tag 1 GFP-Aufnahmen aller Platten und Zelllinien angefertigt. Dafür wurde das Operetta imaging system verwendet. Da die Zellen das GFP-Detektionssignal bereits in sich trugen, waren in diesem Fall keine zusätzlichen Färbungen nötig.

Nach Tag 6 und 10, beobachtete man zusätzlich noch das Verhältnis zwischen lebenden und toten Zellen. Dafür waren die Färbungen Hoechst und Draq7 notwendig.

Um die Zellen zu färben, wurde erneut die Hälfte des Mediums pro Well entnommen und gegen gefärbtes Medium getauscht. Da die Zelllinien U87GFP und A172GFP das gleiche Medium benötigten, wurde für sie eine gemeinsame Färbelösung vorbereitet. Für LN229GFP stellte man eine eigene Lösung her.

Für 10ml Volumen wurden 100 μ l DRAQ7TM und 3 μ l Hoechst 33342 verwendet. Pro Platte wurden 40 Wells eingefärbt.

2.2.1.3 Behandlung von Glioblastomzellen

Die Zelllinien A172GFP und LN229GFP wurden, nach erfolgreicher Überführung in T25 Zellkulturflaschen, einer zusätzlichen Behandlung unterzogen.

Den Zellen wurden die jeweiligen Substanzen in bestimmten Konzentrationen wie folgt zugefügt. Für die Substanzen TAK-733, MS-275 und Trametinib wurden jeweils die gleichen Schemata für die Berechnung herangezogen.

Für jede Substanz mussten, pro biologisches Replikat, zwei T25 Zellkulturflaschen vorbereitet werden. Eine davon wurde später bestrahlt, die andere nicht. In beiden Flaschen befand sich ein Gesamtvolumen (inklusive der Substanzen) von 6ml. Für das bestrahlte und unbestrahlte Fläschchen musste zusammen also ein Volumen von 12ml vorbereitet werden. In diesen 12ml musste 1% DMSO enthalten sein, was einer Menge von 0,12ml entsprach. Zusätzlich musste noch die Menge an Substanz berechnet werden. Da die Ausgangssubstanz in einer Konzentration von 10.000 μ M vorlag und das Gesamtvolumen 12.000 μ l entsprach, wurden 1,2 μ l der entsprechenden Substanz benötigt. Diese 1,2 μ l Substanz waren jedoch in 1% DMSO enthalten. Demzufolge setzte sich die Mischung aus 1% DMSO inklusive der berechneten Substanzmenge von 1,2 μ l und dem restlichen Volumen an Medium zusammen. 100% Behandlungsvolumen (12ml) entsprachen somit 99% Medium (11,88ml) und 1% DMSO inklusive Substanz (118,8 μ l + 1,2 μ l). Für die Kombination von TAK-733 und MS-275 in gleichen Konzentrationen, wurde dasselbe Berechnungsschema verwendet. Mit der Abweichung, dass sich die Zusammensetzung des 1% DMSO inklusive Substanz änderte. Der Anteil des DMSOs beinhaltete nun zwei Substanzen, entsprechend der Menge von 117,6 μ l DMSO und 2 x 1,2 μ l Substanz. Als Negativkontrolle wurden Proben nur mit DMSO, ohne zusätzliche Substanzen, versetzt. Dafür ergaben sich die 12ml Behandlungsvolumen (100%) aus 11,88ml Medium (99%) und 0,12ml DMSO (1%).

Nach erfolgreicher Zusammenstellung des Behandlungsvolumens, wurde das alte Medium der einzelnen T25 Flaschen vollständig abgesaugt und gegen das, mit Substanzen versetzte, Medium ausgetauscht. Auch diese Proben wurden im Brutschrank inkubiert.

Nach diesem erläuterten Verfahren wurde mit allen nötigen Zellproben beider Zelllinien und allen drei biologischen Replikaten, in gleicher Weise verfahren.

2.2.1.4 Bestrahlung von Glioblastomzellen

Nach erfolgter Anzucht wurden die Zellen für den Teil der Vorversuche, der 3D-Zellkultur, als auch für den Behandlungsteil, mit 4 Gy bestrahlt. Der Vorgang der Bestrahlung stellte sich bei allen Teilen gleich dar, weshalb er hier für alle gemeinsam beschrieben wird.

Für alle bestrahlten Zellproben wurde das Bestrahlungsgerät RS225 (X-Strahl, UK) verwendet. Bestrahlt wurde im Abstand von 60cm mit 0,819 Gy pro Minute, bei 10mA, 195KV und Aluminiumfilter. Um 4 Gy zu erzielen, ergab sich dafür eine Bestrahlungszeit von 4 Minuten und 53 Sekunden.

Zum Abschluss des zellbiologischen Abschnittes wurden die Zellproben des Vorversuchs- und des Behandlungsteils zu Zellpellets verarbeitet. Dafür wurden die Zellen nach dem gleichen Prinzip behandelt, welches auch beim Passagieren der Zellen bereits erklärt wurde. Mit der Ausnahme, dass die Zellen am Ende nicht neu angesetzt wurden, sondern nach mehreren Waschgängen in Eppendorf Tubes überführt, zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°Celsius aufbewahrt wurden.

2.2.2 Molekularbiologische Verfahren

2.2.2.1 RNA-Methoden

Mit den entstandenen Zellpellets des zellbiologischen Vorversuchs- und Behandlungsabschnittes wurden im Anschluss folgende Experimente durchgeführt.

Um die Durchführung der PCR zu ermöglichen, musste zuerst aus den vorhandenen Zellpellets die RNA isoliert werden. Dies geschah mit dem RNA-Isolationskit von Maxwell-Promega nach entsprechender Produkthanleitung (Promega).

Nach erfolgter RNA-Konzentrationsmessung der isolierten Proben per NanoDrop 1000, wurde eine Reverse Transkription (RT-PCR) durchgeführt um die microRNA-221 und microRNA-222, als auch uPA und uPAR zu detektieren. Dazu wurde der Gradienten Cyclers von peqLab Biotechnik GmbH verwendet.

Zur Detektion der microRNA-221 und microRNA-222, wurden die Primer hsa-miR-221 PN4427975 150µl 5x und hsa-miR-222 PN4427975 150µl 5x und als Housekeeper RNU44 PN4427975 150µl 5x verwendet. Alle isolierten RNA Proben mussten für die Verwendung auf die gleiche Konzentration gebracht werden. Darauf folgend wurden für jeden Primer und Housekeeper 13µl Mastermix (TaqMan MicroRNA Reverse Transkription Kit) hergestellt und mit 2µl Probenvolumen dem Gradienten Cyclers bereitgestellt. Innerhalb von 1,5 Stunden wurden die Proben auf 16°Celsius, 24°Celsius und 85°Celsius erhitzt.

Ein anderer Schritt bezweckte die Detektion von uPA und uPAR auf RNA-Ebene. Erneut mussten die Proben innerhalb von 8µl die gleiche Konzentration aufweisen. Den 8µl wurden 1,5µl Oligo (dT) 12–18 Primer 0,5µg/µl und 1,5µl Random Hexamers Qyt: 50µM 5nmoles hinzugefügt. Die Proben wurden für 2 Minuten auf 70°Celsius erhitzt um direkt danach in Raumtemperatur 10 Minuten abzukühlen. Innerhalb dieser Pause wurden 4µl 5x First Strand Buffer, 2µl 0,1 M DTT, 1µl 10mM dNTP Mix, 1µl RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor 5.000 U (40U/µl) und 1µl SuperScript II Reverse Transkriptase Qyt: 10.000U (200U/µl) hinzugefügt. Abschließend wurden die Proben für 1 Stunde auf 42°Celsius und für 5 Minuten auf 95°Celsius erhitzt.

Als letzter Schritt der RNA-Experimente, wurde die q-PCR durchgeführt. Dabei wurde die aus der RT-PCR hervorgegangenen cDNA vervielfältigt und quantifiziert. Dies geschah nach dem Prinzip der Polymerasen-Ketten-Reaktion.

Für die q-PCR der microRNAs wurden die Primer hsa-miR-221 PN4427975 150µl 20x, hsa-miR-222 PN4427975 150µl 20x und RNU44 PN4427975 150µl 20x (Housekeeper) verwendet. Bei der uPA und uPAR q-PCR wurde auf die Primer Hs00958880 m1 PLAUR 250µl 20x Mix, Hs01547054 m1 PLAU 250µl 20x Mix und TBP 20x (Housekeeper) zurückgegriffen. Für beide Verfahren wurden 2µl Probenvolumen mit 0,5µl entsprechenden Primer/Housekeeper, 2,5µl RNase freiem Wasser und 5µl TaqMan Universal PCR Mastermix vereinigt. Anschließend wurden die

Proben, in dreifacher Wiederholung, auf eine 96 Well PCR Platte aufgetragen, zentrifugiert und waren bereit das zweistündige Taq-Man Standardprogramm des StepOnePlus RT PCR Systems zu durchlaufen.

Die beschriebenen RNA-Methodendurchführungen liefen für alle Proben, unabhängig ob bestrahlt, unbestrahlt oder behandelt, gleich ab.

2.2.2.2 Western Blot

Neben den RNA Experimenten wurden, mit äquivalenten Probenpellets, auch Western Blots durchgeführt. Bei dieser Experimentform handelte es sich um ein molekularbiologisches Verfahren, mit welchem der uPAR und uPA nachgewiesen wurde.

Um die Proteine aus den Zellen zu extrahieren wurde T-PER protein extraction reagent inklusive PhosphoSTOP in einer Menge von 40-60µl hinzugefügt und nach mehrmaligen Resuspendieren eine Stunde lang auf Eis inkubiert. Nach anschließendem zehn minütigem Zentrifugieren bei 10000g und 4°Celsius wurde der Überstand umpipettiert um die Proteinkonzentrationsmessung durchzuführen. Dazu wurde das PierceTM BCA Protein Assay Kit verwendet. Die Proben mussten dafür 1:25 mit RNase freiem Wasser verdünnt werden, bevor 10µl jeder Probe gemeinsam mit 200µl Working Reagent auf eine 96 Well Platte aufgetragen werden konnte. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°Celsius konnte die Messung mittels Tecan infinite M200 und 562nm Filter durchgeführt werden. Im Anschluss wurden die Proben in der richtigen Konzentration mit 3µl 4x Laemmli und RNase freiem Wasser auf ein gemeinsames Endvolumen gebracht. Für die Denaturierung wurden sie für 5 Minuten bei 95°Celsius erhitzt, für 3 Minuten auf Eis gekühlt und erneut zentrifugiert.

Für die darauffolgende SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese wurden NuPageTM4-12% Bis Tris Midi Gele verwendet. Zusätzlich zu den Proben wurden 10µl PageRuler aufgetragen um im Nachhinein das Molekulargewicht der Proteine ablesen zu können. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x NuPage SDS Running Buffer befüllt und bei 160 Volt und 2500mA für 120 Minuten eingeschalten. Die nun in diesem Gel enthaltenen Proteine, wurden im nächsten Schritt auf eine Nitrocellulosemembran mittels Blotssystem bei 100 Volt in 90 Minuten übertragen. Unmittelbar danach erfolgte die Färbung mit Ponceau Rot für 10 Minuten und die Blockung bei Raumtemperatur mit 20ml 5%iger Milchpulverlösung für 1-4 Stunden unter leichtem Rütteln, um

antikörperunspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Dann wurde der primäre Antikörper aufgetragen und über Nacht bei 4°Celsius inkubiert. Darauf folgten drei Waschgänge à 5 Minuten und 15ml 1x TBST bevor der Sekundäantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur und unter Rütteln in 20ml Verdünnungslösung inkubiert wurde. Erneut wurde für 10 Minuten mit 1x TBST gewaschen.

Zum Abschluss wurden die Membranen eine Minute lang in einer 1:1 Luminol und Peroxide Sodium Lösung im Dunkeln inkubiert um sie anschließend im Alpha Innotech, Version: 1.2.1.0 detektieren zu können.

Um weitere Proteine auf derselben Membran detektieren zu können, musste sie für 15 Minuten in 5ml Restore Stripping Buffer eingelegt und wiederum vier Mal mit 1x TBST gewaschen werden um alte Antikörperückstände zu entfernen. Anschließend wiederholte sich der eben beschriebene Prozess erneut, beginnend mit der Blockung der Membran. Die Art der Durchführung blieb für alle Western Blot Experimente gleich, lediglich in der Verwendung von primären und sekundären Antikörpern traten entsprechende Abweichungen auf

Die mittels Alpha Innotech, Version: 1.2.1.0 erhaltenen Bilder wurden mit dem ImageJ Programm bearbeitet und auf 0 Gy DMSO Kontrollproben normiert.

2.3 Statistische Auswertungsmethodik

Zur Auswertung der experimentellen Ergebnisse der Western Blots des Behandlungsabschnittes und zu ihrer gleichzeitigen grafischen Darstellung, wurde die Statistiksoftware GraphPad Prism 5 für Windows herangezogen. Da es sich bei den auszuwertenden Daten um quantitative Zielgrößen zweier verbundener Gruppen mit anzunehmender Normalverteilung handelte, wurde eine tow way ANOVA (Analysis of variance) durchgeführt. Anhand dieses Verfahrens, konnte vorerst nur ein allgemeiner Unterschied in den Effekten der Behandlung und Bestrahlung gezeigt werden. Um die einzelnen spezifischen Proben mit unterschiedlicher Behandlung auf den kleinsten signifikanten Unterschied zu testen, wurde als „post hoc testing“ (Signifikanztest) innerhalb der Software ein „Bonferroni multiple comparison“ durchgeführt. Für die Darstellung des reinen Effekts der Behandlung, sprich unabhängig von Bestrahlung, wurden die bestrahlten und behandelten Zellen (z.B.: LN229leer 4 Gy und 1µM TAK-733) mit ihren bestrahlten aber nicht behandelten Korrelaten verglichen. Der gleiche Vergleich wurde auch zwischen nicht bestrahlten behandelten und nicht bestrahlten

unbehandelten Proben vorgenommen. Des Weiteren wurde ein Vergleich zwischen unbestrahlten behandelten Proben und bestrahlten behandelten Proben gezogen. Damit konnten die Auswirkungen der Bestrahlung mit 4 Gy in Zusammenhang mit verschiedenen Behandlungen verdeutlicht werden. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ festgelegt. P-Werte $< 0,01$ wurden als statistisch hoch signifikant angesehen.

Zur Auswertung aller PCR Ergebnisse kam aufgrund des Mittelwertvergleichs zweier unverbundener Gruppen mit quantitativer Zielgröße innerhalb einer Normalverteilung ein T-Test für unverbundene Stichproben zur Anwendung. Diese statistische Auswertung bediente sich keinem speziellen Programm, sondern wurde ausschließlich in Excel durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Screening der verwendeten Glioblastomzelllinien (Vorversuch)

Der erste Teil der Dissertation, befasste sich mit einem Screening der Zelllinien LN229leer, U87GFP, A172leer, LN18GFP und U251GFP. Ziel dieser Vorversuche war es, diejenigen Zelllinien mit dem höchsten Gehalt an uPAR, uPA, microRNA-221 und microRNA-222 ausfindig zu machen. Dafür wurden die unterschiedlichen Zelllinien zuerst dementsprechend in der Zellkultur kultiviert, mit 0 Gy und 4 Gy bestrahlt und anschließend pelletiert. Mit den gewonnenen Zellproben, wurden im Anschluss Western Blots und PCR Experimente durchgeführt und die Expressionsveränderungen dargestellt.

3.1.1 Western Blot Vorversuche

Nach erfolgreicher Herstellung von ausreichenden Zellpellets, in bestrahlter und unbestrahlter Form zu unterschiedlichen Zeitpunkten der fünf Zelllinien, wurde zu Beginn ein Western Blot als Übersicht aller Zelllinien durchgeführt. Dazu wurden jeweils eine unbestrahlte und eine bestrahlte Probe eines Zeitpunktes und einer Zelllinie nebeneinander aufgetragen. Mit allen fünf Zelllinien wurde gleich verfahren, sodass sich ein gemeinsamer Western Blot für alle Zelllinien ergab. Detektiert wurden hierbei der uPAR und uPA. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

Der Western Blot vier Stunden nach der Bestrahlung, zeigte in den Zelllinien LN229leer und A172leer eine Reduktion des uPAR Signals in der bestrahlten Probe. Bei uPA konnte hingegen nur in der Zelllinie LN229leer eine Erniedrigung der Proteinexpression nach Bestrahlung gezeigt werden. In den verbleibenden Zelllinien zeigte sich keine signifikante Änderung des uPA. (Abb. 1 und Abb. 2)

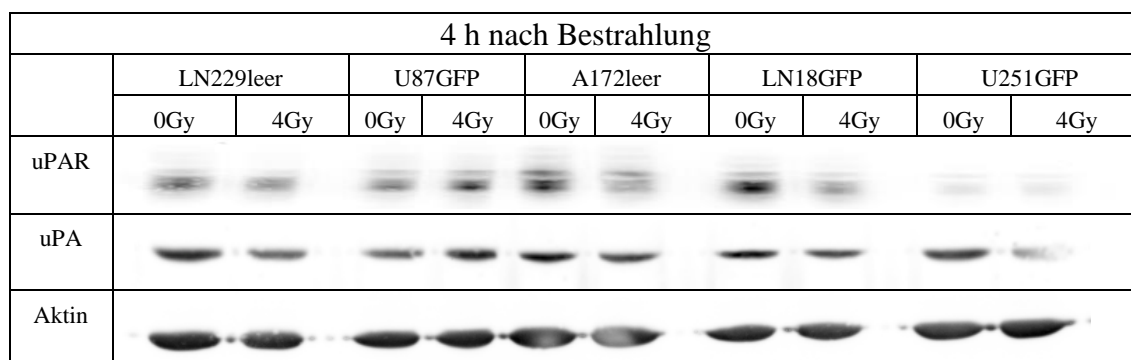


Abbildung 1: Western Blot Übersicht mit allen Zelllinien 4 Stunden nach Bestrahlung

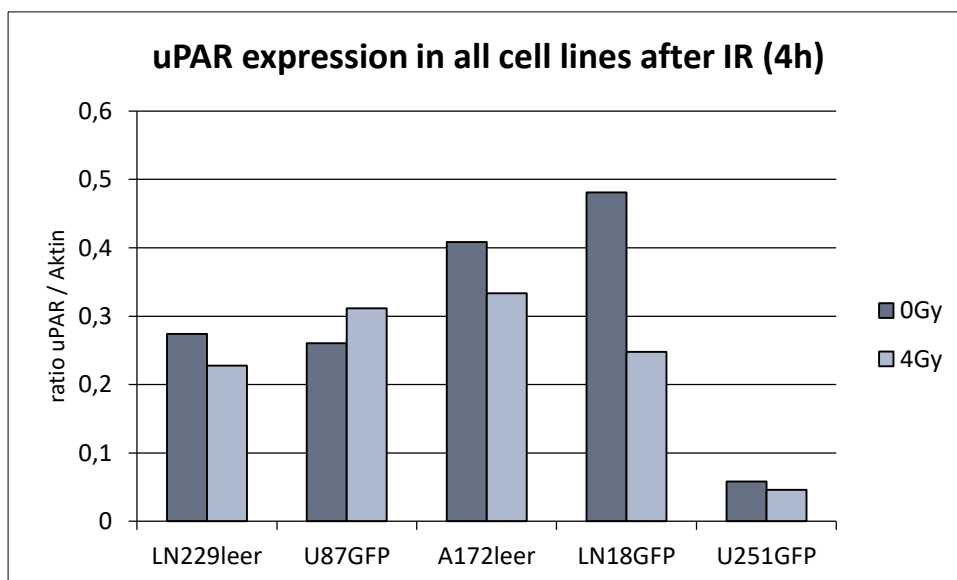


Abbildung 2: Grafische Darstellung der uPAR Expression aller Zelllinien 4 Stunden nach Bestrahlung

Der Western Blot nach 24 Stunden, wurde unter denselben Bedingungen durchgeführt. Zu sehen war ein Anstieg des uPAR Signals in den bestrahlten Proben der Zelllinien LN229leer, U87GFP, A172GFP und LN18GFP (Abb.3 und Abb. 4).

Keine Veränderung über die Zeit, konnte in der Expression des uPA nachgewiesen werden. Nach 24 Stunden waren keine Unterschiede zu sehen.

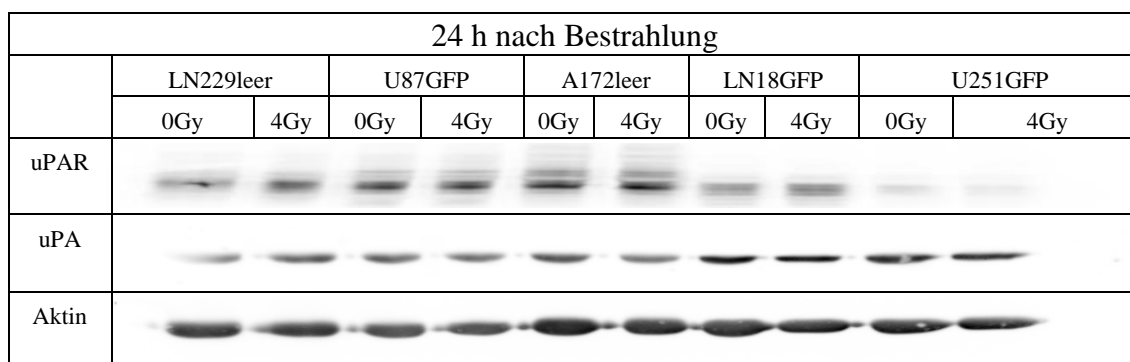


Abbildung 3: Western Blot Übersicht mit allen Zelllinien 24 Stunden nach Bestrahlung

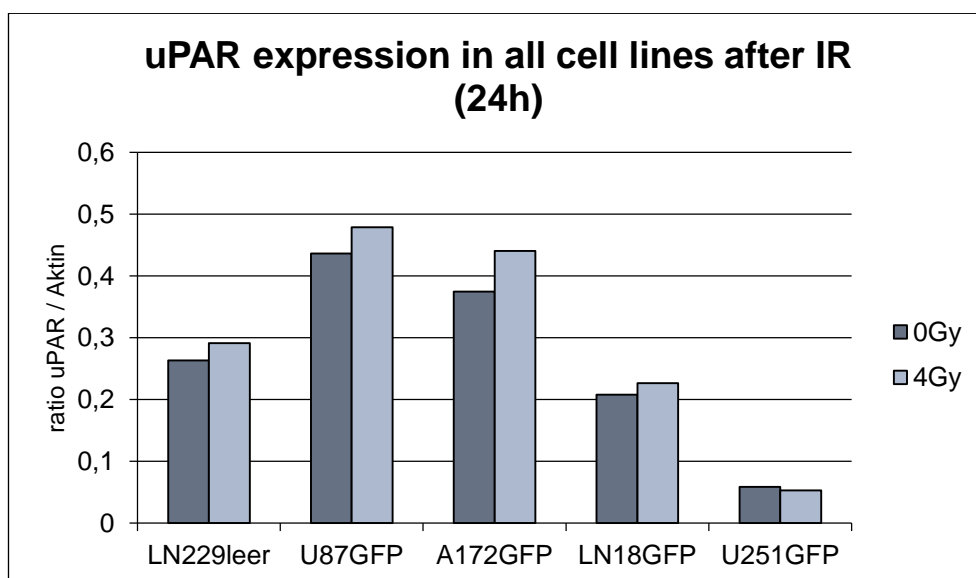


Abbildung 4: Grafische Darstellung der uPAR Expression aller Zelllinien 24 Stunden nach Bestrahlung

Da es sich bei den jeweiligen Einzelbanden (z.B. LN229leer 0 Gy nach 4 Stunden) in der Abbildungen 2 und 4 um ein Gemenge aus drei biologischen Replikaten handelte, konnten keine Standardabweichungen und Signifikanzen berechnet werden. So dienten diese Ergebnisse nur zu Qualifikation der geeigneten Zelllinien.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Western Blots, wurden von jeder Zelllinie separate Western Blots angefertigt.

Repräsentativ hier dargestellt, die Zelllinie A172leer, mit unbestrahlten und bestrahlten Proben 4 und 24 Stunden nach Bestrahlung (Abb. 5). Trotz der teils unvermeidbaren Ungleichheiten der drei biologischen Replikate, ist auf folgendem Bild die Verringerung der Expression von uPA als auch des Rezeptors nach 4 Stunden und ein Anstieg nach 24 Stunden zu sehen. Noch deutlicher konnte dieser Effekt im Übersichtsblot nach 4 und nach 24 Stunden gezeigt werden.

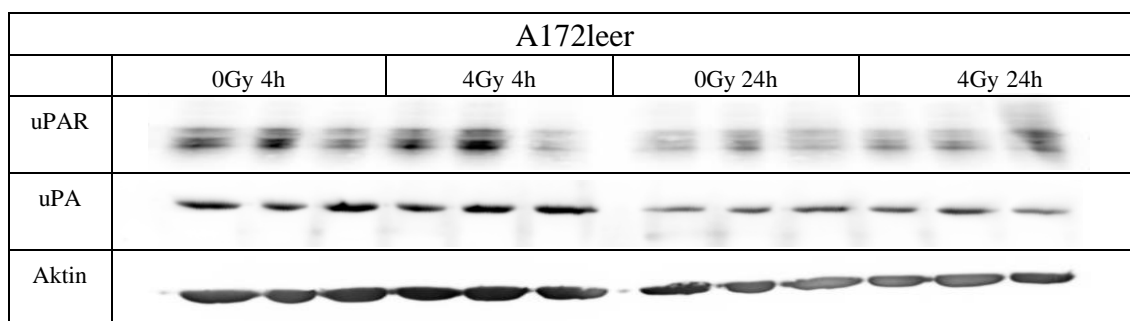


Abbildung 5: uPAR Expression in der Zelllinie A172leer

In den durchgeführten Vorversuchen, mit allen fünf Zelllinien und den daraus hervorgegangenen quantitativen Ergebnissen, wiesen die Zelllinien LN229leer und A172leer, mitunter die höchste Expression des uPARs auf. Aufgrund dessen, wurden die Experimente mit Behandlung und Bestrahlung nur noch mit diesen zwei Zelllinien fortgesetzt.

3.1.2 PCR Vorversuche

Ähnlich wie auf der Proteinebene, wurde auf der RNA Ebene verfahren, um zu Beginn einen Überblick zu erlangen. In dieser Versuchsreihe, stand zuerst die Expression der microRNA-221 und microRNA-222 in den oben genannten Zelllinien im Fokus.

Dafür wurde auch hier eine Übersichts-PCR gemacht. Von jeder der fünf Zelllinien wurde erneut aus den drei unbestrahlten biologischen Replikaten nach 4 und 24 Stunden ein Gemenge hergestellt. Dies war nötig, um alle Proben auf eine PCR-Platte pipettieren zu können und somit die gleichen äußerlichen Umstände zu garantieren.

Da nach vier Stunden die Expression der microRNA-221 und microRNA-222 bereits zu gering war, um die Proben für weitere Experimente zu verwenden, sollen hier vor allem die Ergebnisse der 24 Stunden Werte beachtet werden.

Nach dieser Zeitspanne war in allen Zelllinien eine ausreichend hohe microRNA Expression festzustellen, um selbst mit Behandlung und Bestrahlung der Zellen, immer noch eine Veränderung ableiten zu können (Abb. 6).

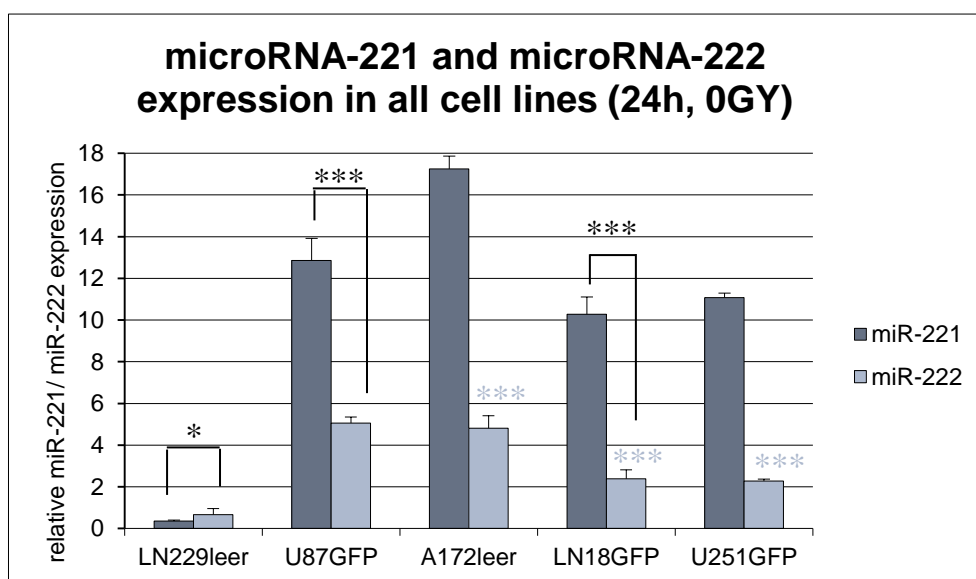


Abbildung 6: microRNA-221 und microRNA-222 Expression in allen Zelllinien nach 24 Stunden ohne Bestrahlung, *= $p < 0,05$, ***= $p < 0,001$,

Im nächsten Schritt wurde erneut eine Übersichts-PCR durchgeführt. Es wurden dieselben Proben (unbestrahlt nach 4 und 24 Stunden) verwendet, jedoch wurde diesmal der uPAR und uPA an sich auf RNA Level nachgewiesen.

Hier war die Expression beider Proteine ausreichend nachweisbar, um damit weiter zu verfahren (Abb.7).

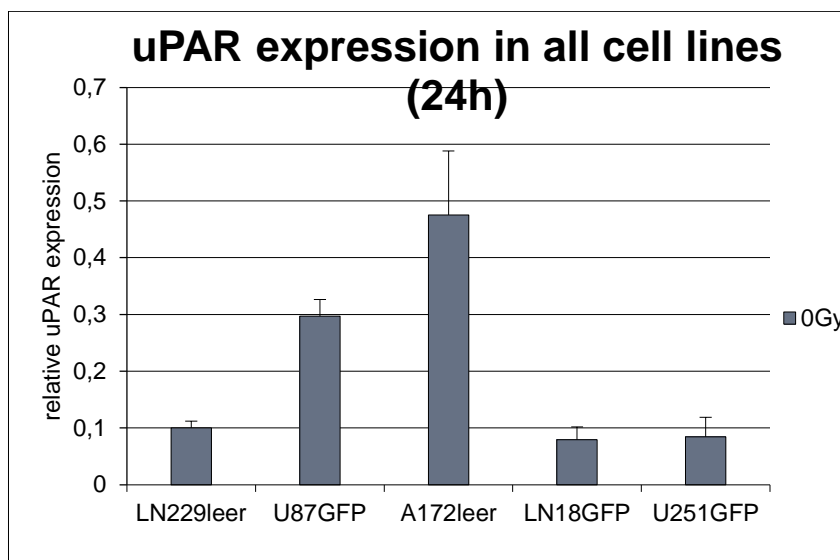


Abbildung 7: uPAR Expression in allen Zelllinien nach 24 Stunden ohne Bestrahlung

Aus diesen Vorversuchswerten hat sich gezeigt, dass die Zelllinien LN229leer und A172leer in den Western Blot Experimenten, als auch in den PCR Ergebnissen, jeweils den höchsten Expressionsgehalt an microRNA-221, microRNA-222, uPA und uPAR erzielten. Der Versuchsabschnitt 3.3 Kombination von Behandlung mit Substanzen und Bestrahlung, wurde somit vorerst nur mit diesen zwei Zelllinien fortgesetzt.

3.2 3D-Zellkultur

Die 3D-Zellkultur wurde durchgeführt, um zu demonstrieren, wie die ausgewählten Substanzen, welche auch für die Behandlungen der Proben ausgesucht wurden, sich auf das Wachstum der Zellen auswirkten.

Dafür wurden drei Zelllinien, LN229GFP, A172GFP und U87GFP, in einer 3D-Zellkultur, nach oben beschriebenem Vorgehen, kultiviert und anschließend in ihrem Wachstum gemessen. Um ebenfalls optisch quantifizieren zu können, wie viele Zellen durch die Substanzen starben, beziehungsweise am Leben blieben, wurden die Zellen zuvor mit den zwei Färbungen DRAQ7 und Hoechst gefärbt.

In allen Zelllinien wurde das Wachstumsverhalten an Tag 0 und ebenso an Tag 6 und Tag 10 nach der Bestrahlung beobachtet.

In allen drei Zelllinien, konnte eine Reduktion des Wachstumsvorgangs durch die angewendeten Substanzen im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO, in den bestrahlten Proben, sowie noch signifikanter in den unbestrahlten Proben, gezeigt werden. Diese Ergebnisse waren vor allem nach Tag 6 und 10 sichtbar. Besonders deutlich zu erkennen, war der Effekt in der Zelllinie U87GFP, welche exemplarisch dargestellt wird (Abb. 8 und Abb. 9).

Im Vergleich zwischen den jeweiligen Substanzen und der Negativkontrolle in den unbestrahlten Proben konnte in allen Fällen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In den bestrahlten Proben konnte im selben Vergleich nur mit den Substanzen TAK-733 und Trametinib eine signifikante Wachstumsreduktion erreicht werden. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der unbestrahlten und der dazugehörigen bestrahlten Probe, zeigte nur in der Negativkontrolle mit DMSO eine Reduktion des Wachstums von signifikanter Bedeutung. Bei den anderen Substanzen kam es in der bestrahlten Probe zu einem Anstieg des Wachstums. Im Fall der Behandlung mit TAK-733 fiel dieser signifikant aus.

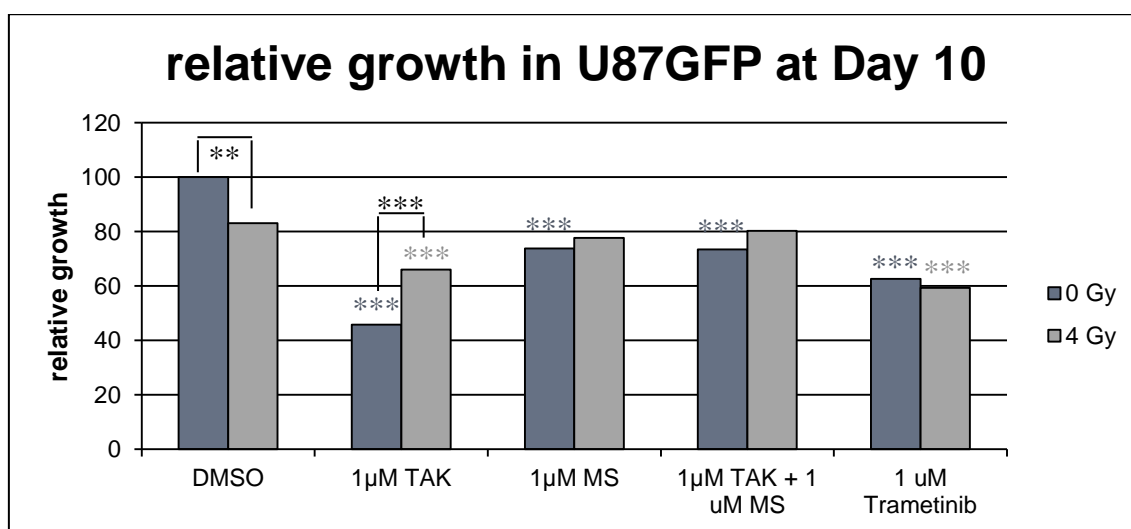


Abbildung 8: relatives Wachstum der Zelllinie U87GFP 10 Tage nach Bestrahlung mit 4 Gy, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$

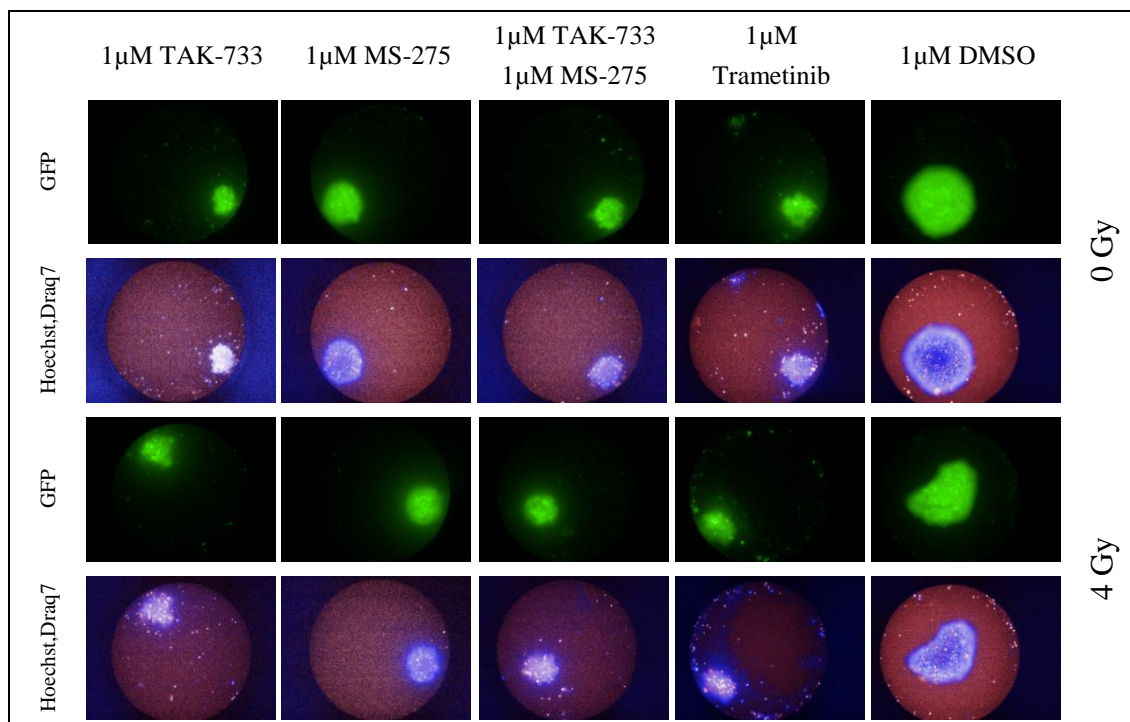


Abbildung 9: U87GFP nach Tag 10 mit allen Substanzen mit Bestrahlung (4 Gy) und GFP, Hoechst (blau = lebendige Zellen) und Draq7 (rot = tote Zellen) Aufnahme

Auch in den Zelllinien LN229GFP und A172GFP konnten Wachstumsreduktionen durch die Substanzenanwendungen im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden. Hier waren die Effekte der Verringerung bereits nach Tag 6 zu sehen. Dies hing mit dem unterschiedlichen Wachstumsverhalten der Zelllinien, unter den Umständen einer 3D-Zellkultur zusammen. Vor allem die Zellen der Linie A172GFP, waren nach Tag 10 bereits so klein, dass keine auswertbaren Aufnahmen mehr gemacht werden konnten.

Zusammengefasst bedeuten diese Ergebnisse folgendes. Unter der Bedingung, dass alle Proben nicht bestrahlt, sondern nur mit den Substanzen behandelt werden, profitiert im Vergleich zur Negativkontrolle jede Probenreihe von ihrer Substanzbehandlung. Im Gegensatz dazu, können unter der Annahme, dass alle bestrahlt werden nur die Proben mit TAK-733 und Trametinib ihr Wachstum tatsächlich reduzieren. Zieht man einen direkten Vergleich zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben einer Substanzklasse, zeigt sich eine echte Verringerung des Wachstums nur dann, wenn neben der Bestrahlung nicht gleichzeitig auch eine Substanzbehandlung stattfindet. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die Kombination aus Behandlung und Bestrahlung im 0 Gy vs. 4 Gy Vergleich schlechtere Ergebnisse bezüglich der Wachstumsreduktion zeigt.

3.3 Kombination von Behandlung mit Substanzen und Bestrahlung

Nachdem anhand der 3D-Zellkultur festgestellt wurde, dass die ausgewählten Substanzen einen hemmenden Effekt auf das Zellwachstum zeigten, wurde mit dem Behandlungsteil der Dissertation fortgefahren.

Diese Versuchsreihe beschäftigte sich erneut mit Western Blot und PCR Experimenten. Diesmal wurden die verwendeten Zellproben der Linien LN229GFP und A172GFP vorab zusätzlich einer Behandlung (Substanzen als auch Bestrahlung) unterzogen.

3.3.1 Western Blot Versuche

Mit den vorhandenen Proben wurden Western Blots mit Fertiggelen durchgeführt. Erneut wurde der uPAR detektiert. Diesmal nach 48 und nach 72 Stunden. Um möglichst genaue Aussagen zu erzielen, wurden jeweils alle drei biologischen unbestrahlten und bestrahlten Replikate einer Substanz nebeneinander aufgetragen. Dies machte die Verwendung von zwei separaten Gelen pro Zeitpunkt nötig. Um trotzdem eine gute Vergleichbarkeit zu gewähren, wurden auf beiden Gelen jeweils die unbestrahlten und bestrahlten DMSO Negativkontrollen mit aufgetragen.

In der Zelllinie A172GFP zeigte sich nach 48 Stunden ein ähnliches Bild, wie es auch schon in der 3D-Zellkultur zu sehen war. Zu diesem Zeitpunkt konnte nachgewiesen werden, dass in den Proben, welche mit den Substanzen TAK-733 und Trametinib behandelt wurden, eine Reduktion der Expression des uPARs vorlag. Die Kombination mit TAK-733 und MS-275 zeigte eine Reduktion, welche jedoch nicht signifikant war. Die Proben mit der Substanz MS-275 allein, zeigten hingegen keine Erniedrigung. Die Expression stieg sogar an (Abb. 10).

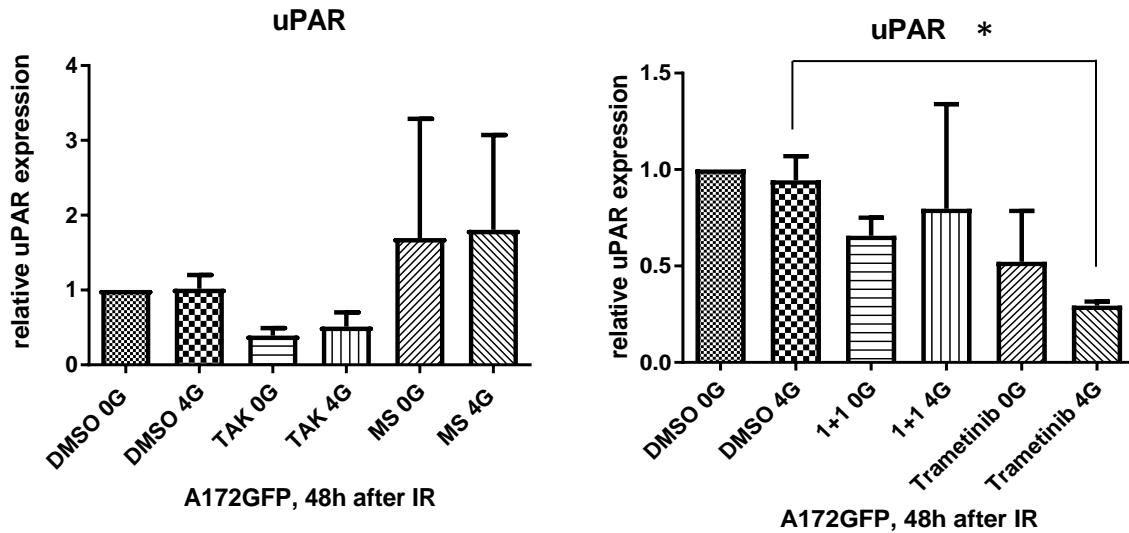


Abbildung 10: uPAR Expression A172GFP 48 Stunden nach Bestrahlung, $*=p<0.05$

Nach einer Zeitspanne von 72 Stunden wurden ähnliche Verläufe beobachtet. Die Substanzen TAK-733 und Trametinib, induzierten erneut eine Reduktion im Vergleich zur Negativkontrolle. Im Vergleich zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben der jeweiligen Substanzen, konnte allein durch die Bestrahlung jedoch kein signifikanter Unterschied gezeigt werden (Abb. 11).

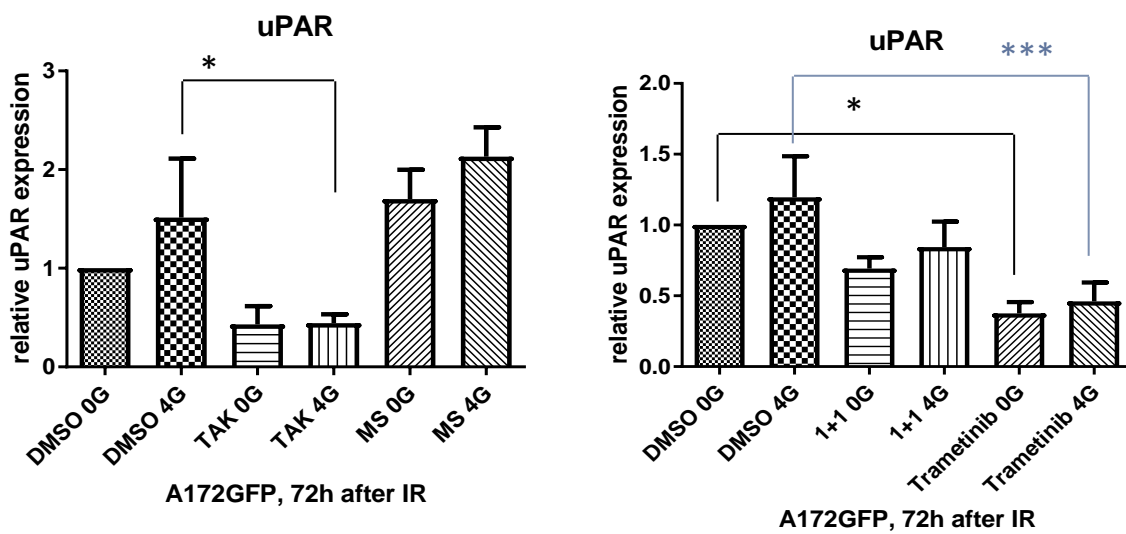


Abbildung 11: uPAR Expression A172GFP 72 Stunden nach Bestrahlung, $*=p<0,05$, $***=p<0,001$

Die zweite Zelllinie (LN229GFP) verhielt sich sehr ähnlich. Das Gesamtexpressionslevel war in dieser Zelllinie von Beginn an zu beiden Zeitpunkten niedriger. Trotzdem zeigten TAK-733 und Trametinib die erwartete Reduktion im Vergleich zur Negativkontrolle an. Dies trat erneut sowohl nach 48 Stunden als auch nach 72 Stunden auf (Abb. 12).

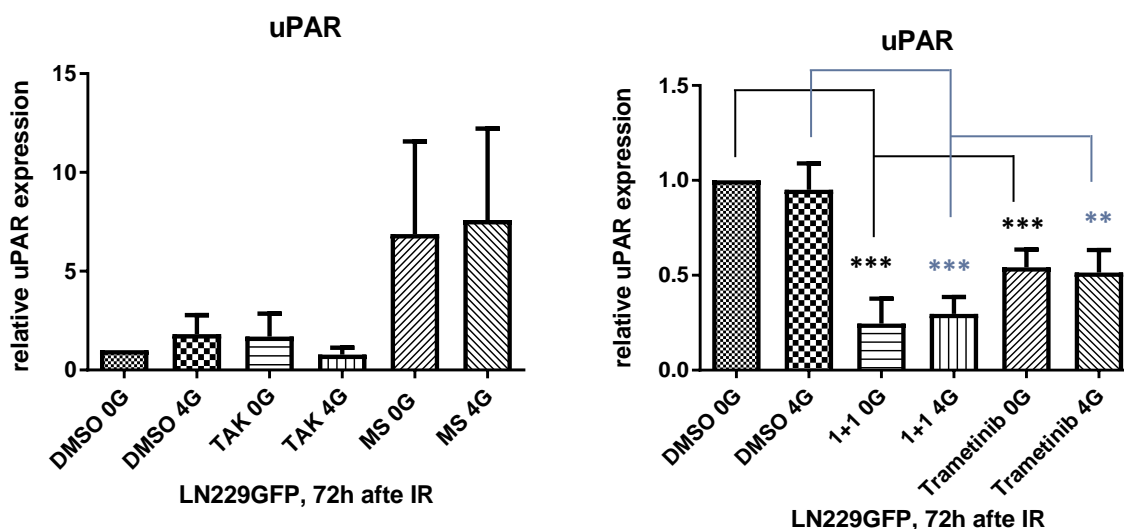


Abbildung 12: uPAR Expression LN229GFP 72 Stunden nach Bestrahlung

Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen Trametinib und der Kombination aus TAK-733 und MS-275 in Bezug auf die DMSO-Negativkontrolle festgestellt. Diese Signifikanz traf auf unbestrahlte, als auch auf bestrahlte Proben nach 72 Stunden zu.

3.3.2 PCR-Versuche

In den oben beschriebenen Western Blot Experimenten wurde gezeigt, dass die Behandlung mit den unterschiedlichen Substanzen, durchaus Erfolg in der Unterdrückung der uPAR Expression zeigte.

Auf RNA Ebene konnte ebenfalls bewiesen werden, dass sich die Expression dieses Rezeptors durch Behandlung erniedrigt. Dafür wurde eine PCR durchgeführt und der uPAR detektiert.

Deutlich zu sehen ist die Übereinstimmung dieser PCR Werte mit den Western Blot Ergebnissen (Abb. 13).

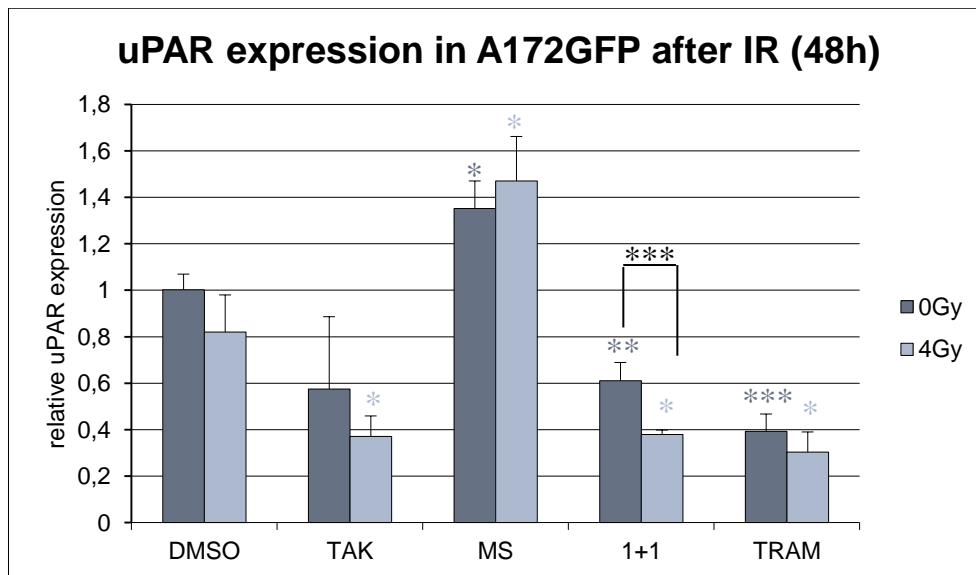


Abbildung 13: uPAR Expression von A172GFP nach 48h auf RNA Ebene

Alle Substanzen zeigten eine Verringerung der Rezeptorbildung. Sowohl im Vergleich zur DMSO-Kontrolle als auch im Vergleich zwischen 0 und 4 Gy. Nur die Substanz MS-275 zeigte gegenläufige Effekte. In der Zelllinie LN229GFP konnten innerhalb dieses Versuchsaufbaus die gleichen Auswirkungen beobachtet werden.

4. Diskussion

Diese experimentelle Dissertation untersuchte die Auswirkungen von Bestrahlung und MEK1-Inhibitoren sowie HDAC-Inhibitoren auf den uPAR und uPA sowie auf die microRNA-221/-222 in Glioblastomen. Im Folgenden werden Ergebnisse und Methodik zusammengefasst und diskutiert.

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Aus den Western Blot Vorversuchen ergab sich in der Übersicht eine Reduktion der uPAR Expression vier Stunden nach Bestrahlung. Dieser Rückgang trat in LN229leer und A172leer auf. In LN229 konnte zusätzlich eine Reduktion des uPA nachgewiesen werden.

Das Screening der Vorversuchsreihe auf RNA-Ebene, diente ausschließlich zur Ermittlung der Zelllinien mit dem höchsten Gehalt an microRNA-221 und microRNA-222 sowie des uPAR und uPA. Übereinstimmend mit den Western Blot Vorversuchen, zeigten auch auf RNA-Ebene die Zelllinien LN229leer und A172leer den höchsten RNA Gehalt.

In dem anschließend durchgeführten 3D-Zellkultur Experiment, zeigte sich in den unbestrahlten Proben der Zelllinie U87GFP mit allen Substanzen ein signifikanter Rückgang der Expression. Innerhalb der bestrahlten Proben wurde nur mit TAK-733 und Trametinib eine signifikante Reduktion beobachtet. Im direkten Vergleich zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben erzielte ausschließlich die Negativkontrolle DMSO einen signifikanten Rückgang.

Im letzten Teil wurde die Kombination aus Behandlung mit Substanzen und Bestrahlung beobachtet. A172GFP zeigte nach 48 Stunden eine Reduktion der uPAR Expression unter TAK-733 und Trametinib. LN229GFP wies nach 72 Stunden signifikante Unterschiede zwischen Trametinib bzw. der Kombination und der Negativkontrolle in bestrahlten wie unbestrahlten Proben auf. Gleichsam effektive Wirkungen, wurden auf der RNA Ebene festgestellt.

4.2 Diskussion der Methodik

Das Experiment startete mit der Anzucht von Glioblastomzellen unterschiedlicher Zelllinien in einer 2D-Zellkultur, aus welcher am Ende der zellbiologischen Verfahren

ein Zellpellet zur weiteren Verwendung entstand. Die Aufzucht der benötigten Glioblastomzellen, sowie deren Behandlung mit den unterschiedlichen Substanzen, erfolgten ausschließlich unter sterilen Bedingungen. Dafür wurde, wie vorab beschrieben, nach einem standardisierten Ablauf vorgegangen. Die besondere Herausforderung der Züchtung bestand darin, eine potentielle Kontamination und Verunreinigung der Zellen infolge von unsauberem Arbeiten zu verhindern. Dafür erforderlich waren Konzentration, Geschick und Erfahrung. Mängel in diesen Bereichen, führten zu einem Sterben der Zellen oder zu fehlerhaften Versuchsabläufen und erforderten einen Neubeginn der Anzucht. Es bewährte sich daher regelmäßig einen Grundstock an verwertbaren Versuchszellen einzufrieren, um bei Bedarf auf ein Backup zurückgreifen zu können.

Innerhalb des 3D-Zellkultur Versuchs, welcher auch unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurde, musste zusätzlich auf folgendes geachtet werden. Die gleichzeitige Bearbeitung von insgesamt sechs Gravity Trap™ uLA Platten, machte einen strukturierten, genau geplanten Handlungsablauf nötig. Durch gute Vorbereitung anhand von Skizzen, Zeitplänen und Teamgesprächen konnte der Ablauf des insgesamt 14 Tage dauernden Experiments optimiert werden. Trotz fehlerfreier und steriler Arbeit konnten Kontaminationen nicht gänzlich verhindert werden. Diese führten letztendlich zu einer Verringerung der auswertbaren Wells pro Platte, wodurch sich die verwertbare Stichprobenanzahl verkleinerte. Die in den Ergebnissen repräsentativ dargestellte Zelllinie U87GFP war nur mit einer Stichprobe betroffen. Die gewählte Art der Durchführung der 3D-Zellkultur, beruhte auch hier auf einem standardisierten Ablauf. Die unterschiedlich ausgesäte Zellzahl pro Linie, erklärte sich durch das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Glioblastomzellen.

Die RNA-Methoden befassten sich mit der Detektion von microRNAs und uPA/uPAR auf RNA Level. Dabei kamen, wie zuvor erwähnt, zwei unterschiedliche Verfahren zur Anwendung. Die Abläufe unterschieden sich unter anderem in der Verwendung anderer Primer. Da es eine große Probenanzahl zu verarbeiten gab, waren in allen Schritten mehrere Gerätedurchläufe nötig. Durch diesen Umstand konnten letztendlich nicht für alle zu vergleichenden PCR Platten die gleichen Einflussbedingungen gewährleistet werden.

Für die Versuchsabschnitte der uPAR und uPA Detektion auf Proteinebene kamen Western Blots zum Einsatz. Dank eines standardisierten Ablaufs konnten alle Proben

unter gleichen Bedingungen bearbeitet werden. Um den Versuchsablauf zu perfektionieren, empfahl es sich zu Beginn einige Probedurchgänge zu starten.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Western Blot und PCR Vorversuche

Die Vorversuchsreihe der Western Blots zeigte die Reduktion des uPAR Signals vier Stunden nach Bestrahlung in den Zelllinien A172leer und LN229leer. Diese könnte auf den Wirkungsmechanismus der Strahlung zurückgeführt werden. Dabei kommt es möglicherweise in den Zellen zu Doppelstrangbrüchen der DNA (Ponnala et al. 2011, S. 1), was unter anderem dazu führt, dass die Zellen aufgrund der geschädigten DNA keinen uPAR mehr exprimieren können. Eine weitere Erklärung liefern Ivanov und Hei (2014, S. 1737), wonach sich unter Bestrahlung reaktive Sauerstoffspezies bilden, welche eine Beeinflussung von Zellsignalwegen mit einer hemmenden Auswirkung auf die Zellproliferation sowie die Genexpression nach sich ziehen würden.

Auch in den Zelllinien LN18GFP und U285GFP konnte ein Rückgang beobachtet werden. Jedoch wiesen diese zwei Zelllinien ein, im Vergleich zu den anderen, deutlich langsames Wachstum in der Zellkultur auf, weshalb sie für weitere Versuche außer Acht gelassen wurden. Zusätzlich wurde bei LN18GFP und U251GFP eine vergleichsweise lange Zeit benötigt, um ein sichtbares Signal detektieren zu können.

Dass es in der Zelllinie U87GFP vier Stunden nach Bestrahlung zu einem Anstieg des uPAR kam, könnte dadurch erklärt werden, dass die Zellen dieser Linie die durch Strahlung entstandenen Doppelstrangbrüche mittels „non homologous end joining“ bereits vor den Messungen wiederherstellen konnten. Dies liegt an der Fähigkeit, dass Glioblastomzellen DNA Schäden sehr gut reparieren können. Somit könnte die Expression des uPAR wieder schneller aufgenommen worden sein. Auch der in allen Zelllinien vorhandene Anstieg des uPAR nach 24 Stunden, dürfte nach diesem Prinzip erklärbar sein. (Ponnala et al. 2011, S. 1)

Es wäre jedoch auch möglich, dass es durch die Strahlung zu einer Aktivierung eines Überlebensprogramms mit einer Veränderung der Genexpression in den Zellen kommt. Dabei entstehen über bestimmte Transkriptionsfaktoren hauptsächlich Zytokine und Wachstumsfaktoren. (Ivanov und Hei 2014, S. 1737)

Dass es nach 24 Stunden in fast allen Zelllinien zu einem uPAR Anstieg kam, würde für die therapeutische Anwendung der Bestrahlung in vivo theoretisch bedeuten, dass einen Tag nach Bestrahlung erhöhte uPAR Werte vorhanden sind und somit erneut gute Bedingungen für das Tumorwachstum herrschen.

Die Versuche auf RNA Ebene wurden durchgeführt, um den Gehalt an microRNA-221 und -222 sowie uPAR in den unterschiedlichen Zelllinien zu ermitteln. Um einen Basiswert zu erhalten wurden hier nur unbestrahlte Proben verwendet.

4.3.2 3D-Zellkultur

Die 3D-Zellkultur zeigte die Auswirkungen der ausgewählten Substanzen TAK-733, MS-275, einer Kombination aus beiden sowie von Trametinib auf das Wachstumsverhalten in den Zelllinien LN229GFP, A172GFP und U87GFP.

Die zum Teil signifikante Reduktion des Wachstums in den bestrahlten sowie unbestrahlten Proben im Vergleich zur DMSO Negativkontrolle in allen drei Zelllinien, lässt sich durch die Wirkung der einzelnen Substanzen in Kombination mit der Bestrahlung erklären. In der exemplarisch dargestellten Zelllinie U87GFP sah man eine signifikante Reduktion des Wachstums durch alle Substanzen in den unbestrahlten Proben. Im Vergleich kam es in den bestrahlten Proben jedoch nur unter TAK-733 und Trametinib zu einer signifikanten Reduktion. Dies könnte darauf hinweisen, dass durch die Bestrahlung Mechanismen in den Zellen in Gang gesetzt werden, welche das Wachstum erneut zu fördern scheinen, anstatt es zu unterdrücken.

Einer dieser möglichen Mechanismen könnte im Zusammenhang mit der microRNA Expression stehen. Dabei ist bekannt, dass es durch Bestrahlung von Glioblastomzellen in den microRNAs-221 und -222 zu einer sogenannten c-jun Transkription kommt. Diese bewirkt über komplexe molekularbiologische Abläufe im Endeffekt eine schnellere Reparatur der durch die Strahlung gesetzten DNA-Schäden. (Li et al. 2014, S. 185)

Das schnellere Ablaufen der Reparaturvorgänge könnte somit für die nicht signifikante Reduktion des Tumorwachstums in zwei von vier Fällen verantwortlich sein. Im Falle der Behandlung mit TAK-733 und Trametinib kam es vermutlich deshalb zu einer signifikanten Verringerung, da nur diese zwei Substanzen die microRNAs vor der

Bestrahlung ausreichend senken konnten und somit die Radiosensibilität der Zellen wieder steigerten (Li et al. 2014, S. 185).

Im Falle einer Durchführung dieser Versuche in vivo mit der Annahme ähnlicher Experimentergebnisse, würde es bedeuten, dass mit den Substanzen MS-275 und der Kombination aus TAK-733 und MS-275 eine schlechtere Tumorstillungsreduktion erzielt werden könnte.

4.3.3 Kombination von Behandlung mit Substanzen und Bestrahlung

Anhand dieser Versuche erfolgte die Darstellung der Auswirkungen der Substanzen auf die uPAR Expression in Kombination mit Bestrahlung in den Zelllinien A172GFP und LN229GFP.

Wie auch in den vorangegangenen Experimenten, zeigten auch hier TAK-733 und Trametinib die stärkste, wenn auch nicht immer signifikante, Reduktion von uPAR in beiden Zelllinien nach jeweils 48 und 72 Stunden. Dies ist wohl auf den Wirkungsmechanismus der Substanzen zurückzuführen, welcher auf molekularbiologischer Ebene, wichtige Transkriptionswege der Zellen beeinflusst und somit die uPAR Expression letztendlich behindert. Die darauffolgende Einwirkung der Strahlung, kann auf Grund der bereits geschädigten Zellen, nun zusätzliche DNA Schäden setzen. Dass es unter der Behandlung mit MS-275 zu keiner Reduktion des uPAR als auch zu keiner Tumorzellwachstumsreduktion kam, könnte unter anderem Artefakt bedingt sein.

Auf RNA Niveau spiegelten sich die Ergebnisse der 3D-Zellkultur sowie der Western Blots wider. In drei von vier Substanzen zeigte sich die erwartete Reduktion des uPAR in der bestrahlten Probe. Diese Ergebnisse repräsentieren den Wirkungsmechanismus der eingesetzten Substanzen.

5. Ausblick

Die letzte Aufgabe, die diese Dissertation erfüllen soll, ist die Bereitstellung der neuen Forschungsinformationen zur adäquaten Nutzung und Umsetzung dieser für die zukünftige Behandlung aller betroffenen Glioblastompatienten.

Um der Durchführung einer klinischen Studie näher zu kommen, würde der nächste Schritt die Übertragung dieses *in vitro* Experiments auf ein *in vivo* Mausmodell darstellen.

Angenommen es können bei der Durchführung in Mäusen dieselben wissenschaftlichen Ergebnisse erwartet werden, könnten sich unter Berücksichtigung der hier vorliegenden Forschungsergebnisse neue, noch stärker individualisierte Behandlungsstrategien und Wege herauskristallisieren.

Solch neue Strategien bestünden darin, den vorliegenden Phänotyp des Glioblastoms zu analysieren, um darauf basierend die therapeutische Vorgehensweise direkt und besser mit aktueller Forschungsliteratur vergleichen zu können. Da sich Glioblastome genetisch nicht immer gleich darstellen, zeigt sich, wie auch in dieser Dissertation belegt, ein sehr unterschiedliches Ansprechen auf neuartige Therapeutika wie TAK-733, MS-275 und Trametinib.

Darüber hinaus könnten die Bedeutung und der Einsatz der Strahlentherapie neu bewertet werden. Unter der Voraussetzung, dass nach wie vor alle Patienten primär bestrahlt werden, könnte nur mit TAK-733 und Trametinib eine aussagekräftige Tumorstillstanderreduktion erzielt werden. Um jedoch möglichst alle hier getesteten Präparate erfolgreich - sprich mit einer signifikanten Reduktion des Wachstums - zur Anwendung zu bringen, wird die medikamentöse Behandlung primär empfohlen, gefolgt von einer sekundären Bestrahlung. Den größten Effekt, hinsichtlich der Einzelwirkungen der Strahlentherapie und der medikamentösen Behandlung, würde wohl erreicht werden, wenn eine zeitgleiche Kombination der beiden Verfahren vermieden wird.

6. Literaturverzeichnis

- Aguzzi, Adriano; Bozinov, Oliver; Brown, Michelle; Eisele, Günter; Grotzer, Michael; Happold, Caroline et al. (2013): Neuroonkologie - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge (3. Auflage).
- Alifieris, Constantinos; Trafalis, Dimitrios T. (2015): Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. In: *Pharmacology & therapeutics* 152, S. 63–82. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.005.
- Bardamu, Ferdinand (2016): Eine Art Tagebuch - Vernichtung. <https://www.facebook.com/WordPresscom>. Online verfügbar unter <https://ostblog.wordpress.com/2016/10/19/vernichtung/>, zuletzt geprüft am 06.04.2019.
- Batash, Ron; Asna, Noam; Schaffer, Pamela; Francis, Nicole; Schaffer, Moshe (2017): Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. In: *Current medicinal chemistry* 24 (27), S. 3002–3009. DOI: 10.2174/0929867324666170516123206.
- Chuang, Jody C.; Jones, Peter A. (2007): Epigenetics and microRNAs. In: *Pediatric research* 61 (5 Pt 2), 24R-29R. DOI: 10.1203/pdr.0b013e3180457684.
- Dohrmann, G. J.; Farwell, J. R.; Flannery, J. T. (1976): Glioblastoma multiforme in children. In: *Journal of neurosurgery* 44 (4), S. 442–448. DOI: 10.3171/jns.1976.44.4.0442.
- Dudvarski Stanković, Nevenka; Bicker, Frank; Keller, Stefanie; Jones, David Tw; Harter, Patrick N.; Kienzle, Arne et al. (2018): EGFL7 enhances surface expression of integrin $\alpha 5\beta 1$ to promote angiogenesis in malignant brain tumors. In: *EMBO molecular medicine* 10 (9). DOI: 10.15252/emmm.201708420.
- Ellor, Susan V.; Pagano-Young, Teri Ann; Avgeropoulos, Nicholas G. (2014): Glioblastoma: background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. In: *The Journal of law, medicine & ethics : a journal of the American Society of Law, Medicine & Ethics* 42 (2), S. 171–182. DOI: 10.1111/jlme.12133.
- Falkenberg, Katrina J.; Johnstone, Ricky W. (2014): Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. In: *Nature reviews. Drug discovery* 13 (9), S. 673–691. DOI: 10.1038/nrd4360.
- Fisher, James L.; Schwartzbaum, Judith A.; Wrensch, Margaret; Wiemels, Joseph L. (2007): Epidemiology of brain tumors. In: *Neurologic clinics* 25 (4), 867-90, vii. DOI: 10.1016/j.ncl.2007.07.002.
- Friedmann-Morvinski, Dinorah; Bushong, Eric A.; Ke, Eugene; Soda, Yasushi; Marumoto, Tomotoshi; Singer, Oded et al. (2012): Dedifferentiation of neurons

- and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. In: *Science (New York, N.Y.)* 338 (6110), S. 1080–1084. DOI: 10.1126/science.1226929.
- Hanif, Farina; Muzaffar, Kanza; Perveen, Kahkashan; Malhi, Saima M.; Simjee, Shabana U. (2017): Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. In: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 18 (1), S. 3–9. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.1.3.
- Iacob, G.; Dinca, E. B. (2009): Current data and strategy in glioblastoma multiforme. In: *Journal of Medicine and Life* 2 (4), S. 386–393.
- Ivanov, Vladimir N.; Hei, Tom K. (2014): Radiation-induced glioblastoma signaling cascade regulates viability, apoptosis and differentiation of neural stem cells (NSC). In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 19 (12), S. 1736–1754. DOI: 10.1007/s10495-014-1040-x.
- Johnson, Derek R.; Fogh, Shannon E.; Giannini, Caterina; Kaufmann, Timothy J.; Raghunathan, Aditya; Theodosopoulos, Philip v.; Clarke, Jennifer L. (2015): Case-Based Review : newly diagnosed glioblastoma. In: *Neuro Oncol Pract* 2 (3), S. 106–121. DOI: 10.1093/nop/npv020.
- Kugaevskaya, E. V.; Gureeva, T. A.; Timoshenko, O. S.; Solovyeva, N. I. (2019): The Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator System In Tumor Progression. In: *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B* 13 (2), S. 97–112. DOI: 10.1134/S1990750819020069.
- Lee, Dong Hoon; Ryu, Hyun-Wook; Won, Hye-Rim; Kwon, So Hee (2017): Advances in epigenetic glioblastoma therapy. In: *Oncotarget* 8 (11), S. 18577–18589. DOI: 10.18632/oncotarget.14612.
- Li, W.; Guo, F.; Wang, P.; Hong, S.; Zhang, C. (2014): miR-221/222 confers radioresistance in glioblastoma cells through activating Akt independent of PTEN status. In: *Current molecular medicine* 14 (1), S. 185–195. DOI: 10.2174/1566524013666131203103147.
- Louis, David N.; Ohgaki, Hiroko; Wiestler, Otmar D.; Cavenee, Webster K.; Burger, Peter C.; Jouvett, Anne et al. (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. In: *Acta neuropathologica* 114 (2), S. 97–109. DOI: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- Malmström, Annika; Grønberg, Bjørn Henning; Marosi, Christine; Stupp, Roger; Frappaz, Didier; Schultz, Henrik et al. (2012): Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. In: *The Lancet Oncology* 13 (9), S. 916–926. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70265-6.

- Marks, P. A.; Xu, W-S (2009): Histone Deacetylase Inhibitors: Potential in Cancer Therapy. In: *Journal of cellular biochemistry* 107 (4), S. 600–608. DOI: 10.1002/jcb.22185.
- McMahon, Brandon J.; Kwaan, Hau C. (2015): Components of the Plasminogen-Plasmin System as Biologic Markers for Cancer. In: *Advances in experimental medicine and biology* 867, S. 145–156. DOI: 10.1007/978-94-017-7215-0_10.
- National Center for Biotechnology Information (2005): Entinostat. Hg. v. PubChem. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4261#section=Top>, zuletzt geprüft am 27.04.2019.
- National Center for Biotechnology Information (2008): RCLQNICOARASSR-SECBINFHSA-N. Hg. v. PubChem. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tak-733>, zuletzt geprüft am 27.04.2019.
- Omuro, Antonio; DeAngelis, Lisa M. (2013): Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. In: *JAMA* 310 (17), S. 1842–1850. DOI: 10.1001/jama.2013.280319.
- Perry, James R.; Laperriere, Normand; O'Callaghan, Christopher J.; Brandes, Alba A.; Menten, Johan; Phillips, Claire et al. (2017): Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. In: *The New England journal of medicine* 376 (11), S. 1027–1037. DOI: 10.1056/NEJMoa1611977.
- Ponnala, Shivani; Veeravalli, Krishna Kumar; Chetty, Chandramu; Dinh, Dzung H.; Rao, Jasti S. (2011): Regulation of DNA repair mechanism in human glioma xenograft cells both in vitro and in vivo in nude mice. In: *PloS one* 6 (10), e26191. DOI: 10.1371/journal.pone.0026191.
- Promega, Corporation: Maxwell 16 miRNA Tissue Kit Quick Protocol, FB187. INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCT AS1470.
- Roa, W.; Brasher, P. M. A.; Bauman, G.; Anthes, M.; Bruera, E.; Chan, A. et al. (2004): Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (9), S. 1583–1588. DOI: 10.1200/JCO.2004.06.082.
- Stensjøen, Anne Line; Solheim, Ole; Kvistad, Kjell Arne; Håberg, Asta K.; Salvesen, Øyvind; Berntsen, Erik Magnus (2015): Growth dynamics of untreated glioblastomas in vivo. In: *Neuro-oncology* 17 (10), S. 1402–1411. DOI: 10.1093/neuonc/nov029.
- Stummer, Walter; Pichlmeier, Uwe; Meinel, Thomas; Wiestler, Otmar Dieter; Zanella, Friedhelm; Reulen, Hans-Jürgen (2006): Fluorescence-guided surgery with 5-

- aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. In: *The Lancet Oncology* 7 (5), S. 392–401. DOI: 10.1016/S1470-2045(06)70665-9.
- Stupp, Roger; Hegi, Monika E. (2017): Sinnvolle Biomarker zur Diagnose und Therapiewahl von Gliomen. In: *pipette - Swiss Laboratory Medicine* (2).
- Stupp, Roger; Hegi, Monika E.; Mason, Warren P.; van den Bent, Martin J.; Taphoorn, Martin J. B.; Janzer, Robert C. et al. (2009): Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. In: *The Lancet Oncology* 10 (5), S. 459–466. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
- Swellam, Menha; Ezz El Arab, Lobna; Al-Posttany, Amr S.; B Said, Samy (2019): Clinical impact of circulating oncogenic MiRNA-221 and MiRNA-222 in glioblastoma multiform. In: *Journal of neuro-oncology* 144 (3), S. 545–551. DOI: 10.1007/s11060-019-03256-2.
- Thakkar, Jigisha P.; Dolecek, Therese A.; Horbinski, Craig; Ostrom, Quinn T.; Lightner, Donita D.; Barnholtz-Sloan, Jill S.; Villano, John L. (2014): Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 23 (10), S. 1985–1996. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275.
- Thomas, Anish; Tanaka, Mamoru; Trepel, Jane; Reinhold, William C.; Rajapakse, Vinodh N.; Pommier, Yves (2017): Temozolomide in the Era of Precision Medicine. In: *Cancer research* 77 (4), S. 823–826. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2983.
- Thomas, Reena P.; Recht, Lawrence; Nagpal, Seema (2013): Advances in the management of glioblastoma: the role of temozolomide and MGMT testing. In: *Clinical pharmacology : advances and applications* 5, S. 1–9. DOI: 10.2147/CPAA.S26586.
- Wick, Wolfgang; Fricke, Harald; Junge, Klaus; Kobayakov, Grigory; Martens, Tobias; Heese, Oliver et al. (2014): A phase II, randomized, study of weekly APG101+reirradiation versus reirradiation in progressive glioblastoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (24), S. 6304–6313. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0951-T.
- Wick, Wolfgang; Platten, Michael; Meisner, Christoph; Felsberg, Jörg; Tabatabai, Ghazaleh; Simon, Matthias et al. (2012): Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08

- randomised, phase 3 trial. In: *The Lancet Oncology* 13 (7), S. 707–715. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70164-X.
- Wirsching, Hans-Georg; Galanis, Evanthia; Weller, Michael (2016): Glioblastoma. In: *Handbook of clinical neurology* 134, S. 381–397. DOI: 10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2.
- Xie, Qiang; Yan, Yongrong; Huang, Zuoping; Zhong, Xueyun; Huang, Lei (2014): MicroRNA-221 targeting PI3-K/Akt signaling axis induces cell proliferation and BCNU resistance in human glioblastoma. In: *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 34 (5), S. 455–464. DOI: 10.1111/neup.12129.
- Xu, Chun-Hua; Liu, Yue; Xiao, Li-Min; Chen, Li-Ke; Zheng, Su-Yue; Zeng, Er-Ming et al. (2019): Silencing microRNA-221/222 cluster suppresses glioblastoma angiogenesis by suppressor of cytokine signaling-3-dependent JAK/STAT pathway. In: *Journal of cellular physiology* 234 (12), S. 22272–22284. DOI: 10.1002/jcp.28794.
- Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (RKI) (2016): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.
- Zülch, K. J. (1986): Brain tumors. Their biology and pathology. 3rd completely rev. ed. Berlin, New York: Springer-Verlag.

