



Bundesamt
für Strahlenschutz

Ressortforschungsberichte zum Strahlenschutz

Strahlenresistenzmechanismen in Tumorstammzellen

Vorhaben 3616S32262

GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH,
Darmstadt

C. Hartel
N. Aeverbeck
I.S. Schroeder

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz
und nukleare Sicherheit (BMU) und im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz
(BfS) durchgeführt.

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMU (Ressortforschungsplan) in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BfS übereinstimmen.

Impressum

Bundesamt für Strahlenschutz
Postfach 10 01 49
38201 Salzgitter

Tel.: +49 30 18333-0

Fax: +49 30 18333-1885

E-Mail: ePost@bfs.de

De-Mail: epost@bfs.de-mail.de

www.bfs.de

BfS-RESFOR-184/21

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:

urn:nbn:de:0221-2021101929343

Salzgitter, Oktober 2021

Schlussbericht

zu

FKZ: 3616S32262

Strahlenresistenzmechanismen in Tumorstammzellen

C. Hartel, N. Aeverbeck, I.S. Schroeder

GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Darmstadt

Das diesem Bericht zu Grunde liegende FE-Vorhaben wurde im Auftrag des Bundesamts für Strahlenschutz für das Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit durchgeführt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Zusammenfassung / Summary

Im Forschungsvorhaben wurde die Wirkung von Röntgenstrahlung und von beschleunigten Kohlenstoffionen auf drei Gliom-/Glioblastomstammzelllinien (GSZ) untersucht, um Strahlenresistenzmechanismen zu identifizieren. Die GSZ zeigten zahlreiche strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen, innerhalb jeder Zelllinie wurden mehrere Subpopulationen identifiziert. Im Tumorsphärenassay ließ ein abflachender Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve bei hohen Dosen auf eine strahlenresistente Subpopulation schließen. Die Analyse der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels eines gamma-H2AX-Foci-Assays zeigte einen typischen biphasischen Verlauf, die Zellzyklusanalysen einen lang anhaltenden Arrest nach Bestrahlung. Insgesamt unterschieden sich die analysierten Endpunkte nur wenig zwischen Kohlenstoff- und Röntgenbestrahlung. Auf Grundlage von Transkriptomanalysen wurden die Gene FoxM1, Parp3 oder AurkB für Knockdown-Experimente ausgewählt. Durch Knockdown jeweils eines Gens erhöhte sich die Strahlenempfindlichkeit mindestens einer der GSZ signifikant.

This project investigated the effect of X-rays and accelerated C-ions on three glioma/glioblastoma stem-like cell (GSC) lines focusing on the identification of radioresistance mechanisms. The GSC had many structural and numerical chromosomal aberrations, within each cell line several subpopulations were identified. In the tumorsphere formation assay, a flattening of the dose-response curve indicated a radioresistant subpopulation. Gamma-H2AX foci assays to determine DNA double-strand break repair kinetics revealed the typical biphasic course. The cell cycle analysis revealed a long cell cycle arrest after irradiation. Altogether, there were only minor differences between X-ray and C-ion irradiation. Based on transcriptome analysis data, the genes FoxM1, Parp3 and AurkB were chosen for knockdown experiments. Knockdown of each of these three genes increased the radiosensitivity significantly in at least one of the three GSC lines.

1 Kurze Darstellung

1.1 Aufgabenstellung

Fast 500.000 Menschen erkranken in Deutschland jährlich an Krebs. Die meisten Patienten werden mit Strahlentherapie, Operation oder Chemotherapie bzw. einer Kombination dieser Therapieverfahren behandelt. Strahlenresistenz der Tumorzellen stellt ein großes Problem bei der Strahlentherapie dar. Insbesondere sogenannte Tumorstammzellen können sehr resistent gegen Bestrahlung sein und dadurch zum Auftreten von Tumorrezidiven führen. Die Tumorstammzellhypothese geht davon aus, dass Tumore aus Tumorstammzellen entstehen, welche alle im Tumor vorhandenen Zelltypen hervorbringen. Die Tumorstammzelle hat damit, wie die normale Stammzelle, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung. Tumorstammzellen gelten als besonders resistent gegenüber Strahlung und Chemotherapie und werden für das Therapieversagen bzw. die Rezidivbildung verantwortlich gemacht.

Im Forschungsvorhaben wurden daher die Strahlenresistenzmechanismen in Gliom-/Glioblastomstammzellen (GSZ) untersucht. Ziel war es, die Wirkung von Röntgenstrahlung (dünn ionisierend) mit der von beschleunigten Kohlenstoffionen (dicht ionisierend) zu vergleichen. Da Kohlenstoffionen insbesondere bei strahlenresistenten Zelltypen eine hohe relative biologische Wirksamkeit (RBW) verglichen mit Röntgenstrahlung zeigen, könnten sie geeignet sein, die intrinsische Strahlenresistenz von GSZ zu überwinden. Im Forschungsvorhaben wurden verschiedene *in vitro* Experimente mit humanen GSZ durchgeführt, um die Strahlenwirkung auf zell- und molekularbiologischer Ebene zu untersuchen. Hierzu wurden die Zellen bestrahlt und mittels Tumorsphärenassay wurde untersucht, ob die Strahlenresistenz gleichermaßen bei dicht und dünn ionisierender Strahlung besteht. Weiterhin sollten geeignete Tumorstammzellmarker identifiziert und deren Expression nach Bestrahlung analysiert werden sowie die Zellzyklusverteilung, DNA-Reparatur, Zytogenetik und Genexpression der GSZ näher untersucht werden.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das FE-Vorhaben durchgeführt wurde

In der Abteilung Biophysik des GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung (GSI) besteht langjährige Erfahrung in der Untersuchung der Strahlenreaktion von Tumorzellen und der Bestimmung der relativen biologischen Wirksamkeit RBW von Ionenstrahlen^{1,2}. Bei GSI wurde von 1997-2008 ein klinisches Pilotprojekt zur Tumorthherapie mit Schwerionenstrahlung durchgeführt^{3,4} und es besteht eine langjährige Zusammenarbeit mit den Kollegen an klinischen Beschleunigeranlagen für die Schwerionentherapie (u.a. HIT Heidelberg, CNAO Pavia, Italien).

Neben der für das Projekt erforderlichen Laborausstattung (Zellkulturlabor, Durchflusszytometer, Fluoreszenzmikroskope etc.) standen die zur Bestrahlung mit Röntgen- und Kohlenstoffionenstrahlen erforderlichen Einrichtungen zur Verfügung (Röntgenröhre,

Schwerionenbeschleuniger SIS bei GSI sowie im Rahmen einer Kollaboration Beschleuniger für Schwerionentherapie am CNAO).

Die im Projekt verwendeten GSZ-Zelllinien sowie die als Vergleich verwendete humane neurale Stammzelllinie (NSC) waren bereits im Labor etabliert und charakterisiert. Es gab Vorarbeiten zur Reaktion dieser Zellen auf Röntgenstrahlung und verschiedene Schwerionenstrahlen.

Neben der langjährigen Erfahrung in der Planung und Durchführung von Schwerionen- und Röntgen-Bestrahlungsexperimenten bestanden in der Abteilung Biophysik Erfahrungen mit allen für das Projekt relevanten Methoden, insbesondere der Bestimmung des Zellüberlebens bzw. der Tumorsphärenbildung nach Bestrahlung, der Fluoreszenz-Mikroskopie, der Zytogenetik, der Durchflusszytometrie sowie der qPCR.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt beinhaltete verschiedene Arbeitspakete. Diese wurden teilweise parallel, teilweise aufeinander aufbauend, bearbeitet.

Zunächst wurde eine Literaturrecherche durchgeführt und der aktuelle Stand von Wissenschaft und Technik auf dem Gebiet aufgearbeitet und in einem Bericht zusammengefasst. Parallel dazu wurde mit der Zellkultivierung und der Vorbereitung der Bestrahlungsexperimente begonnen, welche die Grundlage aller weiteren Arbeitspakete bildeten. Die Untersuchung der Tumorsphärenbildung der GSZ nach Bestrahlung, d. h. der Überlebens- bzw. Selbsterneuerungsfähigkeit der Zellen, war ein weiteres, zentrales Arbeitspaket, auf dessen Ergebnisse die anderen Arbeitspakete aufbauten. Chromosomenanalysen der GSZ-Linien wurden mehrfach im Verlauf des Vorhabens durchgeführt, um die zytogenetische Stabilität der Zellen zu überprüfen, und es wurden Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung analysiert. Auf den Ergebnissen der Tumorsphärenbildung nach Bestrahlung und der Zytogenetik bauten die Untersuchung der DNA-Reparatur und des Zellzyklus nach Bestrahlung auf. Im Rahmen der Literaturrecherche wurden potenzielle Marker für GSZ identifiziert, die Expression dieser Marker wurde in den GSZ und NSC untersucht. Anschließend wurde analysiert, ob sich die Expression ausgewählter Marker nach Bestrahlung verändert. Das letzte Arbeitspaket beinhaltete umfangreiche Genexpressionsanalysen sowie Knockdown-Experimente. Zunächst wurde die Expression aller Gene in den GSZ-Linien sowie in NSC mittels Transkriptom-Analysen quantifiziert, um Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede zwischen GSZ und NSC sowie innerhalb der verschiedenen GSZ-Linien aufzudecken. Die Expression geeigneter Kandidaten-Gene wurde dann mittels real-time qPCR überprüft. Es wurden Bestrahlungsexperimente durchgeführt und mittels real-time qPCR die Bestrahlungswirkung auf die Genexpression untersucht. Schließlich wurden Knockdown-Experimente durchgeführt um zu untersuchen, ob sich durch Herunterregulation der Expression eines Kandidatengenes die Stammzeleigenschaften bzw. Strahlenempfindlichkeit der GSZ verändert.

Der aktuelle Stand des Projektes, die Experimente und deren Ergebnisse sowie eventuell aufgetretene Probleme wurden regelmäßig in Arbeitstreffen der am Projekt beteiligten Wissenschaftlerinnen diskutiert. Die erzielten Ergebnisse wurden auf nationalen und internationalen Konferenzen der Fachöffentlichkeit vorgestellt.

1.4 wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

- Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des FE-Vorhabens benutzt wurden

Biologische Bestrahlungsexperimente sind bei GSI langjährig etabliert und die technischen Voraussetzungen zur Bestrahlung biologischer Proben am Beschleuniger waren vorhanden. Für das Vorhaben wurden Bestrahlungsexperimente am Schwerionensynchrotron SIS der GSI sowie am Scherionenbeschleuniger CNAO, Pavia, Italien, durchgeführt.

Für die einzelnen Arbeitspakete wurden verschiedene, in der Literatur beschriebene und als Standardverfahren etablierte bzw. kommerziell erhältliche Techniken verwendet, z. B. Tumorsphärenassay zur Zellkultur und Bestimmung der Fähigkeit zur Tumorsphärenbildung nach Bestrahlung, multiplex Fluoreszenz in situ Hybridisierung (mFISH) zur Chromosomenanalyse, Durchflusszytometrie für die Zellzyklusanalysen, Immunfluoreszenzanalysen, qPCR-Analysen und si-RNA-vermittelte Herunterregulation der Genexpression (Knockdown).

- Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Relevante Fachliteratur wurde durch Internet-Datenbank-Recherchen (Pubmed-Datenbank) gefunden. Benötigte Artikel, sofern sie nicht frei zugänglich waren, konnten über die GSI Bibliothek beschafft werden. Umfangreiche Literaturrecherchen wurden insbesondere im Rahmen des Arbeitspaketes zur Aufarbeitung des Standes von Wissenschaft und Technik, des Arbeitspaketes zur Identifizierung geeigneter GSZ-Biomarker sowie des Genexpressionsanalysen-Arbeitspaketes durchgeführt. Im Rahmen der Genexpressionsanalysen wurde die KEGG Datenbank genutzt (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>, aufgerufen am 31.8.2020).

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Vorhabens konnten bestehende Zusammenarbeiten mit anderen Forschungseinrichtungen vertieft werden, insbesondere bei den Kohlenstoff-Bestrahlungsexperimenten mit der Fondazione CNAO, Pavia, Italien, sowie bei den Chromosomenanalysen mit Dr. E. Nasonova, JINR, Dubna, Russland. Die Genexpressionanalysen wurden durch die Firma Oak-Labs, Berlin, durchgeführt.

2 Eingehende Darstellung

2.1 Erzielte Ergebnisse

Die in den Arbeitspaketen des Vorhabens erzielten Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

2.1.1 Zellkultur und Bestrahlungsexperimente

Für die Durchführung der Experimente und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen Arbeitspakete spielten einheitliche Zellkulturmethoden und die Durchführung der Bestrahlungsexperimente unter vergleichbaren Bedingungen eine zentrale Rolle. Für die Untersuchung der Strahlenresistenzmechanismen von Tumorstammzellen wurden drei unter serumfreien Stammzellbedingungen kultivierte Zelllinien verwendet: #10, #10-IR und U87-MG^{5, 6}. Bei #10-IR handelt es sich um eine durch wiederholte Bestrahlung selektierte strahlenresistente Tochter-Linie der Zelllinie #10. Die GSZ wurden in serumfreiem Neurobasal Medium unter Zusatz von B27, BSA sowie EGF und bFGF ohne Zusatz von Antibiotika kultiviert. GSZ wachsen unter diesen Bedingungen als Tumorsphären (siehe Abbildung 1). Während #10 und #10-IR runde Sphären mit glatter Oberfläche formten, bildeten U87 etwas unregelmäßigere Sphären. Die Zellen wurden 14-tägig passagiert. Zu Beginn des Vorhabens wurden die Zellen vermehrt und als Vorrat eingefroren. Im Lauf des Projekts wurden mehrfach (alle 4-6 Monate) Zellen aus diesem Vorrat frisch aufgetaut, um eine lange *in vitro* Kultur, die mit (zytogenetischen) Veränderungen verbunden sein kann, zu vermeiden.

Zum Vergleich wurden in einigen Experimenten (Markerexpression, Genexpressionsanalysen) humane NSC verwendet, die im Labor etabliert waren. Die NSC werden durch Differenzierung aus humanen pluripotenten Stammzellen erzeugt; sie können, analog zu den Tumorsphären, als Neurosphären in Suspension kultiviert werden⁷.

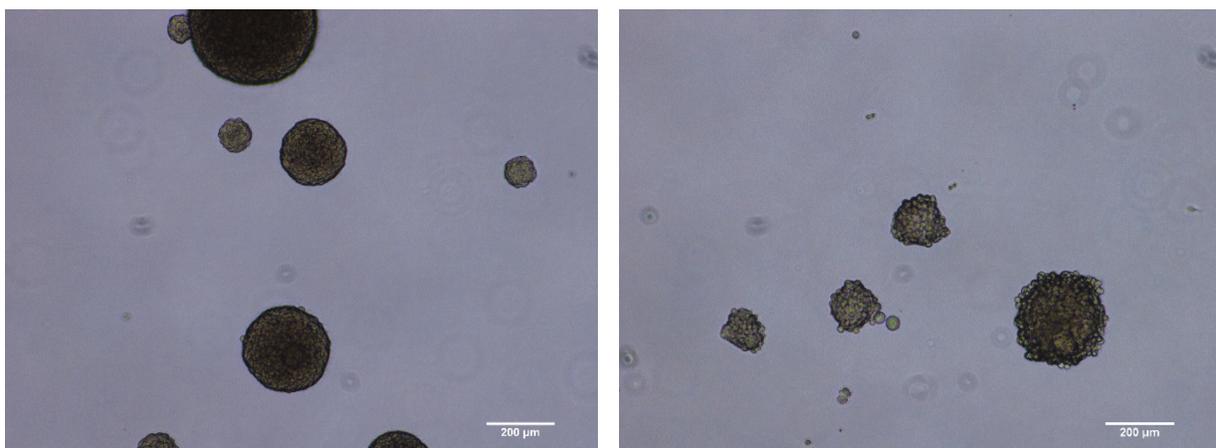


Abbildung 1: Tumorsphären von #10 (links) und U87 (rechts).

Analog zur „plating efficiency“ (PE) beim Koloniebildungstest adhärenent wachsender Zellen, kann mit dem Tumorsphärenassay der Anteil zur Tumorsphärenbildung fähiger Zellen

bestimmt werden. Dies sind die Zellen mit Selbsterneuerungspotenzial, einem Stammzellen-Merkmal.

Bei einer Einsaat von 30.000 Zellen pro 25 cm² Kulturflasche entstanden, abhängig von der Zelllinie und dem Experiment, ca. 200 - 1200 Sphären, was einer Tumorsphärenbildungsrate von 0,6 - 4% entspricht. Es ist also jeweils nur ein geringer Anteil der Zellen zur Tumorsphärenbildung in serumfreier Kultur fähig. In der Literatur wird die PE für unter serumhaltigen Kulturbedingungen adhärent wachsende U87 bei Combs et al. mit 4,7 % angegeben² und liegt damit geringfügig höher als die hier ermittelte Tumorsphärenbildungsrate. Für Bestrahlungsexperimente wurden die Zellen 1 - 2 Tage vor Bestrahlung enzymatisch vereinzelt und die Zellzahl bestimmt. Die Bestrahlung wurde mit 250 kV Röntgenstrahlung sowie mit Kohlenstoffionen (Spread-out Bragg Peak, Rasterscanning-Verfahren, linearer Energietransfer LET 60 - 95 keV/μm) durchgeführt. Die Bestrahlung erfolgte in sterilen 5 ml Röhrchen (Durchmesser 12 mm). Die Zellsuspension wurde direkt nach Bestrahlung wieder in Kulturflaschen überführt. Zur Erstellung von Dosis-Effekt-Kurven wurden für beide Strahlqualitäten 6 Dosen inkl. Kontrolle (0, 1, 2,5, 5, 8, 12 Gy) verwendet. Als Kontrolle dienten Proben, die, abgesehen von der eigentlichen Bestrahlung, identisch behandelt wurden (d. h. Überführung in die zur Bestrahlung verwendeten 5 ml Röhrchen, Transport zum Bestrahlungsplatz, Lagerung außerhalb des Inkubators während der Bestrahlung der anderen Proben). Alle Experimente wurden mindestens 3-fach durchgeführt. Je nach Methode wurden zusätzlich technische Replikate verwendet, z. B. technische 4-fach-Bestimmung beim Tumorsphärenassay.

2.1.2 Einfluss der Bestrahlung auf die Repopulation (Selbsterneuerung)

Die Fähigkeit der Zellen zur Selbsterneuerung nach einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder beschleunigten Kohlenstoffionen wurde im Tumorsphärenassay (d. h. Kultivierung unter Selbsterneuerungsbedingungen) ermittelt. Alle Experimente wurden mindestens 3-fach durchgeführt (biologische Triplikate) und pro Dosis und Experiment wurden 4 Zellkulturflaschen angesetzt und ausgewertet (technische 4-fach Bestimmung). Röntgen- und Kohlenstoffionenstrahlen reduzieren die Sphärenbildung in ähnlicher Weise. Die erstellten Dosis-Effektkurven zeigten für alle drei GSZ-Zelllinien einen linearen oder leicht linear-quadratischen Verlauf im Bereich von 0 - 5 Gy und eine deutliche Abflachung bei höheren Dosen, wie in einem Beispiel in Abbildung 2 gezeigt. Lediglich im Fall der Röntgen-bestrahlten U87 Zellen war eine solche Abflachung nicht feststellbar, siehe Abbildung 3. Die Abflachung trat bei einer Tumorsphärenbildungsrate von ca. 10 % - 25 % der Kontrollrate auf. Diese Abflachung deutet auf eine strahlenresistente Subpopulation hin. Es ist davon auszugehen, dass die Zellpopulationen der Zelllinien heterogen sind und verschieden strahlenempfindliche Zellen enthalten. Die heterogene Zusammensetzung der Zellpopulation stimmt gut mit dem Konzept der Tumorstammzellen überein, welches davon ausgeht, dass aus den Zellen mit Stammzeleigenschaften verschiedenartige Tochterzellen hervorgehen. Der Übergang zu einem sehr flachen Verlauf der Dosis-Effekt Kurve erfolgte bei der strahlen-selektierten Sub-Linie #10-IR früher als bei der Ausgangslinie #10, was ein Hinweis auf einen höheren Anteil strahlenresistenter Zellen ist.

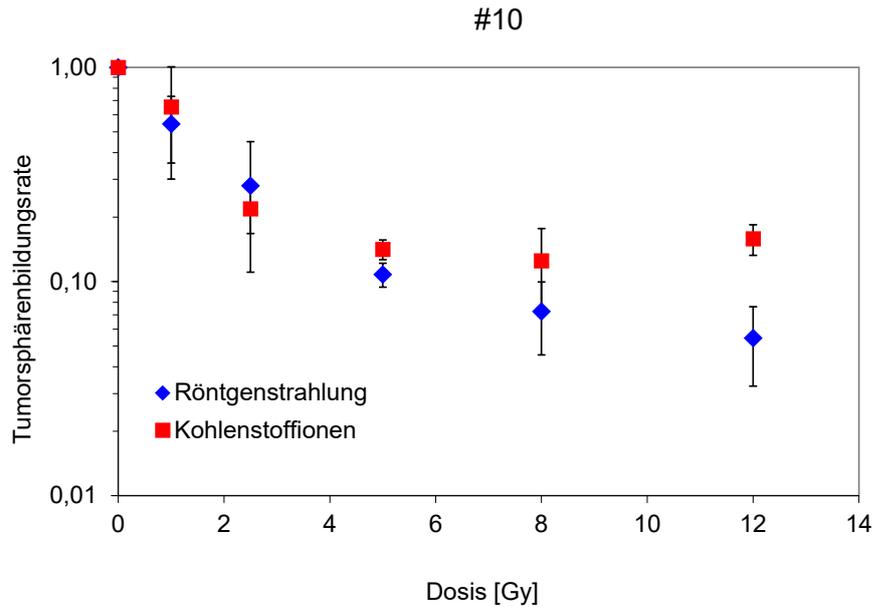


Abbildung 2: Beispiel zweier Dosis-Effekt-Kurven der Tumorsphärenbildungsrate von #10 nach Bestrahlung mit beschleunigten Kohlenstoffionen und Röntgenstrahlung. Es wurden technische 4-fach Bestimmungen verwendet und mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

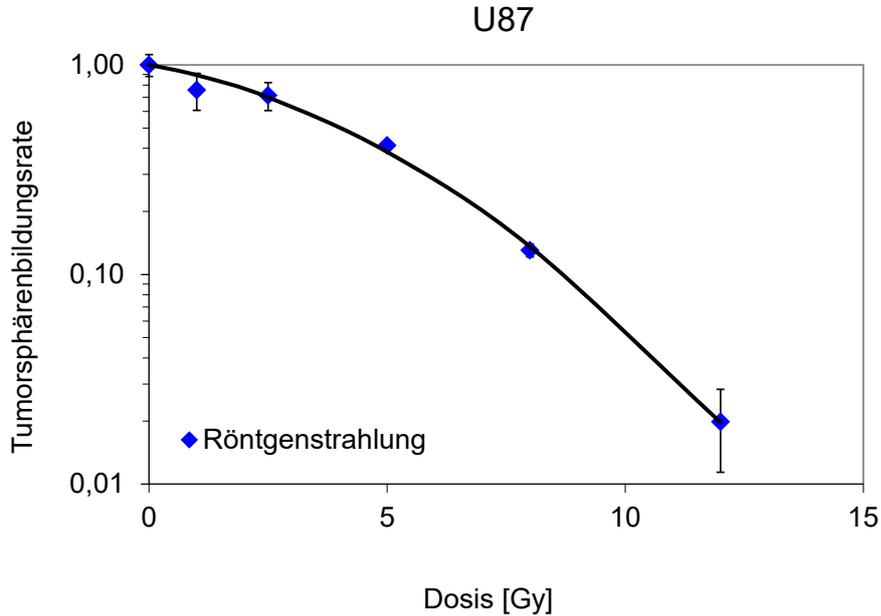


Abbildung 3: Dosis-Effekt-Kurve der Tumorsphärenbildungsrate nach Bestrahlung von U87 mit Röntgenstrahlung. Das Beispiel zeigt ein typisches Experiment mit technischer 4-fach Bestimmung und linear-quadratischem Fit.

Grundsätzlich könnten neben unterschiedlich strahlenempfindlichen Zellen innerhalb der Zellpopulation auch andere Faktoren eine Abflachung der Dosis-Effekt-Kurven verursachen.

Insbesondere eine unzureichende Sauerstoffversorgung eines Teils der Zellen und das Auftreten des sogenannten Sauerstoff-Effekts unter Hypoxie könnten den beobachteten Kurvenverlauf erklären. Eine akute Hypoxie eines Teils der Zellen kann aber angesichts der gewählten experimentellen Bedingungen ausgeschlossen werden. Eine ungleichmäßige Nährstoff- und Sauerstoffverteilung wäre zu erwarten, wenn sich in der Kultur große Sphären gebildet haben. Um zum Zeitpunkt der Bestrahlung eine ausreichende und gleichmäßige Nährstoff- und Sauerstoffverteilung aller Zellen zu gewährleisten, wurden die Sphären enzymatisch dissoziiert und die Zellen vor Bestrahlung 24 h als Einzelzellen kultiviert. Aus diesem Grund kann eine Hypoxie als Ursache für die beobachtete unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der Zellen ausgeschlossen werden kann.

Die relative biologische Wirksamkeit RBW ist definiert als das Verhältnis aus Röntgen-Dosis und Dosis der zu untersuchenden Strahlungsart, die den gleichen biologischen Effekt hervorrufen. Der beobachtete Verlauf der Dosis-Effekt Kurven bedingt, dass die Aussagekraft der RBW im vorliegenden Fall begrenzt ist, da die RBW, die aus den Anfangssteigungen der Dosis-Effekt-Kurven gebildet wird ($RBW_{initial}$), im Wesentlichen durch die strahlenempfindlichere Zellpopulation bestimmt wird. Andererseits ist z. B. die Bestimmung einer RBW für eine Überlebensrate von 10 % nicht möglich, da dieser Effekt-Level im Fall der #10-IR Zellen selbst mit der höchsten verwendeten Dosis nicht erreicht wurde. Zur Bestimmung der $RBW_{initial}$ wurde ein rein exponentieller Fit an die Daten im Niedrigdosisbereich angepasst, daraus ergab sich eine $RBW_{initial}$ von 0,9 - 1,2. Die Hypothese, dass Kohlenstoffionen Tumorstammzellen besonders effizient inaktivieren können, konnte somit im vorliegenden Projekt nicht bestätigt werden.

Bei niedrigen Dosen zeigte sich die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der verwendeten GSZ-Linien. Eine Dosis von 2,5 Gy reduzierte die Tumorsphärenbildungsrate der strahlenempfindlichen #10 auf ca. 25 %, der strahlenselektierten #10-IR auf ca. 43 % und der U87 auf ca. 67 %, siehe Abbildung 4.

Der Vergleich mit Literaturdaten zeigt, dass das Zellüberleben von U87, die unter serumhaltigen Bedingungen kultiviert wurden, nach Bestrahlung mit 2,5 Gy Röntgenstrahlung etwa 50 % beträgt², das Überleben in adhärenter 2D-Kultur ist also geringer als die Tumorsphärenbildung unter serumfreien Bedingungen. Dies deckt sich mit einer Studie von Takahashi et al., in der die Glioblastomzelllinie A172 nach Bestrahlung sowohl zum Koloniebildungstest in serumhaltigem Medium als auch zur Tumorsphärenbildung in serumfreiem Medium kultiviert wurde. Die Strahlenresistenz war unter serumfreien Kulturbedingungen höher⁸. Takahashi et al. verglichen auch die Wirkung von Röntgenstrahlung und Kohlenstoffionen und ermittelten eine $RBW_{10\% \text{ Überleben}}$ von 3,3. Als höchste Dosis verwendeten die Autoren 4 Gy. Die Tumorsphärenbildung lag bei dieser Dosis deutlich über 10 %, weshalb zur RBW-Ermittlung extrapoliert wurde, was zu großen Unsicherheiten führt. Innerhalb des Dosisbereichs 0 - 4 Gy zeigte die Dosis-Effektkurve der A172 einen linear-quadratischen Kurvenverlauf. Ob sich dies fortsetzt, oder wie bei den in diesem Vorhaben erstellen Dosis-Effekt-Kurven bei hohen Dosen in einen flacheren Verlauf übergeht, ist nicht bekannt. In zwei von Chiblak et al. veröffentlichten Studien mit mehreren Glioblastomzelllinien, die serumfrei kultiviert und mit Röntgenstrahlung, Protonen und Kohlenstoffionen bestrahlt wurden, betrug die maximal verwendete Dosis ebenfalls 4 Gy^{9,10}. Da nach dieser Röntgendosis die Tumorsphärenbildung deutlich über 10 % lag, beruhen die

ermittelten RBW(10 %) Werte wie bei Takahashi et al. auf Extrapolation und sollten mit großer Vorsicht verwendet werden. Außerdem ist keine Aussage über den Kurvenverlauf bei hohen Dosen möglich.

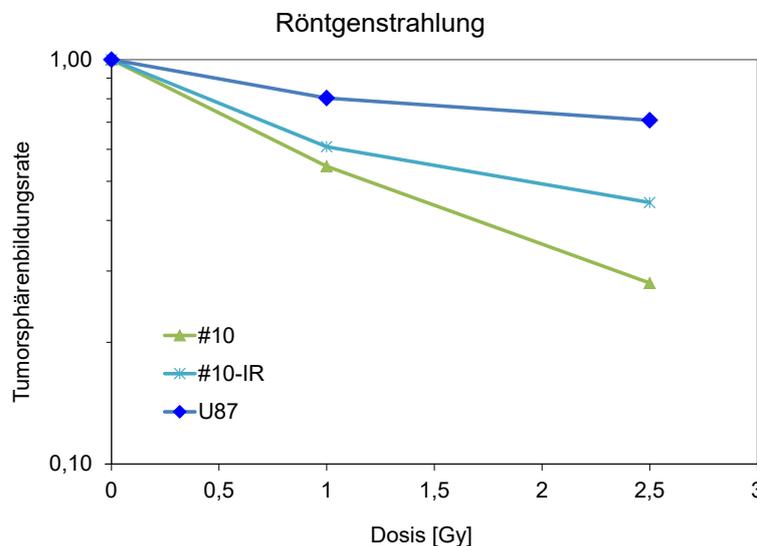


Abbildung 4: Tumorsphärenbildungsrate nach Röntgen-Bestrahlung der drei Zelllinien #10, #10-IR und U87 nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen bis zu 2,5 Gy. Die Daten basieren auf mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

2.1.3 Einfluss der Bestrahlung auf die Zellzyklusverteilung

Die Zell-inaktivierende Wirkung von ionisierender Strahlung ist auf ihre Schädigung der DNA zurückzuführen. Als Reaktion auf einen DNA-Schaden kann die Signalkaskade eines Zellzykluscheckpoints ausgelöst werden, so dass eine weitere Progression der Zelle durch den Zellzyklus verhindert wird. Die Teilung einer geschädigten Zelle wird so verhindert und die Zelle hat Zeit, den entstandenen DNA-Schaden zu reparieren, bevor sie im Zellzyklus voranschreitet und sich teilt. Bei der Krebsentstehung spielen Veränderungen der Zellzyklusregulation eine wichtige Rolle. Auch für die Strahlenresistenz von Tumorzellen ist die Zellzyklusregulation zumindest teilweise verantwortlich. Einige Studien zeigen, dass GSZ DNA-Schäden bevorzugt durch homologe Rekombination (HR) reparieren und ein ausgeprägter G2/M-Zellzyklusarrest nach Bestrahlung auftritt^{11,12}. Die Strahlenempfindlichkeit der Zellen kann durch Inhibierung von Rad51, das eine zentrale Rolle bei der DNA-Reparatur mittels HR spielt, erhöht werden^{13,14}. Andere Studien konnten einen Arrest von GSZ in G2/M-Phase allerdings nicht oder nur teilweise bestätigen^{15,16}.

Für die Zellzyklusanalysen wurde eine Dosis von 8 Gy gewählt, um hauptsächlich die besonders relevante strahlenresistente Zellpopulation zu untersuchen. Alle Experimente wurden mindestens 3-fach durchgeführt und es wurden in der Regel jeweils mindestens 50.000 Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Zellzyklusverteilung wurde nach Färbung der DNA mit FxCycle Far Red Stain bestimmt. Ein Beispiel ist in Abbildung 5 gezeigt.

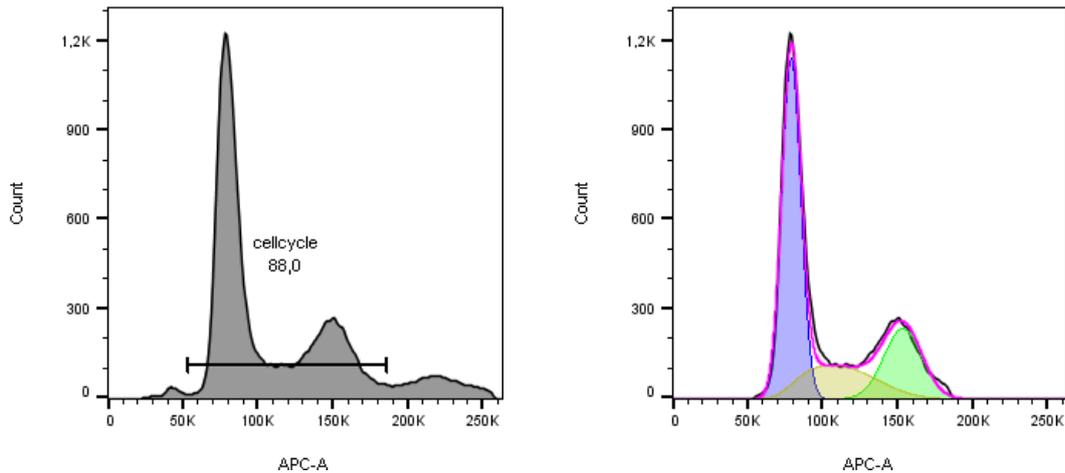


Abbildung 5: Zellzyklusanalyse durch Färbung der DNA mit FxCycle Far Red Stain. Die linke Grafik zeigt die Eingrenzung auf die Hauptpopulation vor der Zellzyklusanalyse. Die rechte Abbildung zeigt den Fit mittels Dean-Jett-Fox-Modell und die Darstellung der einzelnen Zellzyklusphasen G1 (blau), S (gelb) und G2/M (grün).

Alle drei untersuchten Zelllinien zeigen einen Arrest in der G2/M-Phase nach Bestrahlung mit 8 Gy Röntgenstrahlung bzw. Kohlenstoffionen. Ergebnisse einer Zellzyklusanalyse sind in Abbildung 6 gezeigt. Die Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung war für alle drei verwendeten Zelllinien ähnlich, und es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen und mit Röntgenstrahlung. Die Zelllinie #10, die im Tumorsphärenassay die höchste Strahlenempfindlichkeit aufwies, zeigte auch den deutlichsten Zellzyklusarrest nach Bestrahlung. Der Anteil der Zellen in S-Phase verringerte sich nach Bestrahlung. Auch die beiden anderen untersuchten Zelllinien zeigten einen Arrest in der G2/M-Phase sowohl nach Röntgen- als auch nach Kohlenstoffionenbestrahlung.

Tumorzellen weisen häufig Aneuploidien auf. Es traten Zellpopulationen mit annähernd tetraploidem sowie annähernd diploidem Chromosomensatz auf, wie im Abschnitt zytogenetische Charakterisierung beschrieben. Dies erschwerte die Zellzyklusanalyse. Es wurde daher für eine Zelllinie (U87) zusätzlich eine Markierung der Zellen in S-Phase mit EdU durchgeführt, um die Ergebnisse der DNA-Gehalt-basierten Analysen zu validieren. Die EdU-Markierung erlaubt die Verfolgung der zum Markierungszeitpunkt in S-Phase befindlichen Zellen durch den Zellzyklus (Beispiel siehe Abbildung 7). Diese Experimente bestätigten, dass die U87 in der G2/M-Phase arretieren.

Insgesamt zeigten die GSZ nach Bestrahlung einen sehr lang anhaltenden Zellzyklusarrest nach Bestrahlung mit 8 Gy. Ein langer Zellzyklusarrest gibt den Zellen viel Zeit, entstandene Schäden zu reparieren und passt daher gut zum Gesamtbild der Strahlenresistenz.

8 Gy Röntgenstrahlung

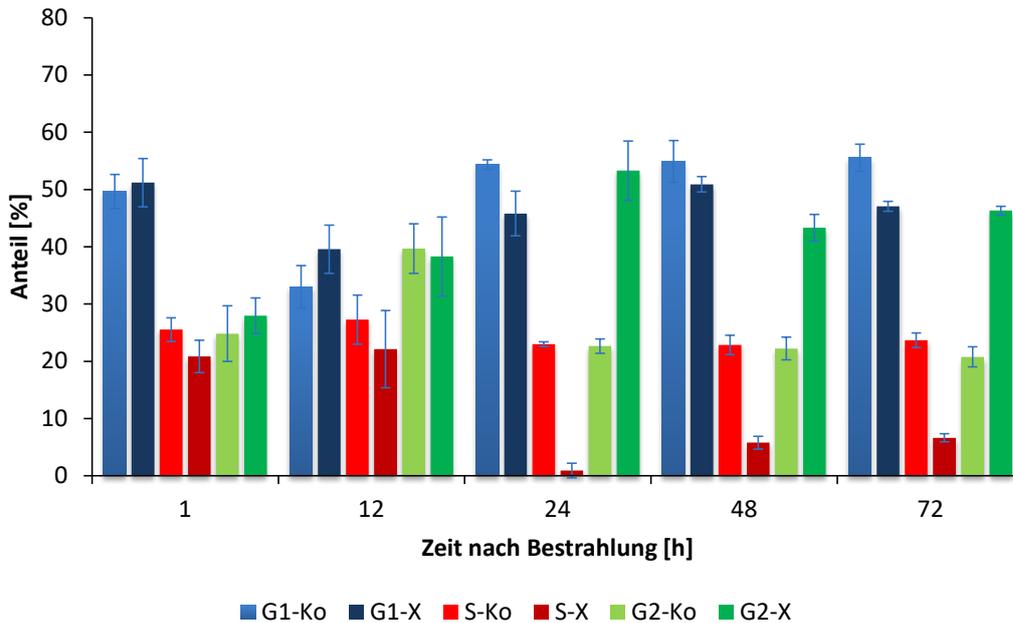


Abbildung 6: Zellzyklusverteilung von #10 Zellen nach 8 Gy Röntgenstrahlung (-X) verglichen mit den unbestrahlten Kontrollproben (-Ko). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen in den Zellzyklusphasen G1 (G1-X und G1-Ko), S (S-X und S-Ko) und G2/M (G2-X und G2-Ko).

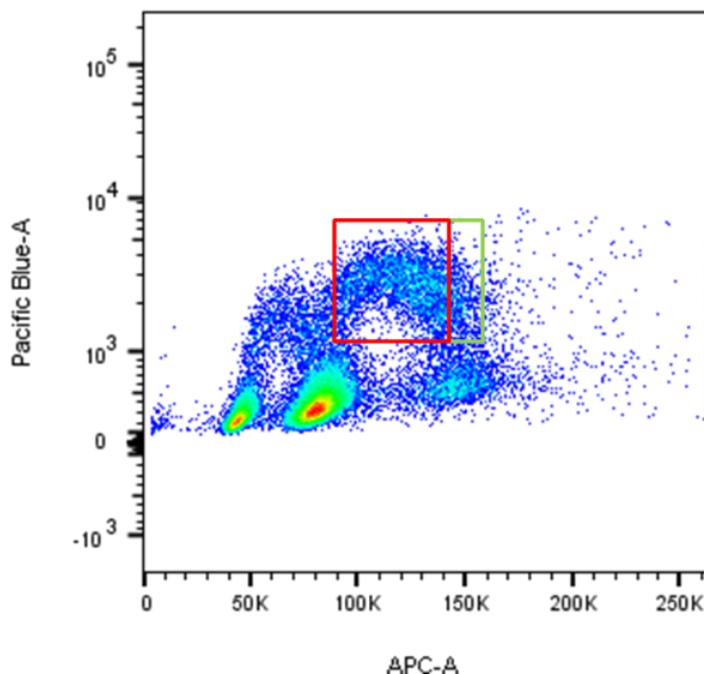


Abbildung 7: Beispiel der Durchflusszytometriemessung in der Darstellung EdU-Signal gegen DNA-Farbstoff. EdU wurde dem Kulturmedium von U87 Zellen zugegeben. Nach einer Stunde wurden die Zellen bestrahlt und für eine weitere Stunde kultiviert bevor sie fixiert und gefärbt wurden. Die EdU-positiven hypotetraploiden Zellen in S-Phase sind in rot, die EdU-positiven hypotetraploiden Zellen in G2/M-Phase sind grün umrandet.

2.1.4 Einfluss der Bestrahlung auf die DNA-Reparatur

γ -H2AX gilt als zuverlässiger Marker zur Untersuchung der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen¹⁷. Während Röntgenstrahlung räumlich gleichmäßig verteilte DNA-Schäden induziert, erzeugen beschleunigte Kohlenstoffionen komplexere DNA-Schäden entlang der Ionenspur. Die Untersuchung von γ -H2AX-Reparaturkinetiken sollte zeigen, ob bei gleicher Dosis Unterschiede in der DNA-Schadensreparatur nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung bzw. beschleunigten Kohlenstoffionen bestehen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob bei den drei verwendeten unterschiedlich strahlenempfindlichen Zelllinien Unterschiede in der DNA-Schadensreparaturkinetik bestehen.

Im Rahmen dieses Projektes wurden die drei verwendeten GSZ-Linien mit 8 Gy Röntgenstrahlung bzw. 8 Gy beschleunigten Kohlenstoffionen bestrahlt und Reparaturkinetiken erstellt. Jedes Experiment wurde mindestens 3-fach durchgeführt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Die Durchflusszytometrie wurde gewählt, da diese Analyse unabhängig von der räumlichen Orientierung der Zelle ist. Da die Zellen in Suspension wuchsen und auch bestrahlt wurden, konnte die räumliche Orientierung der Zellen während der Bestrahlung nicht fixiert und für die spätere Analyse beibehalten werden, was die mikroskopische Analyse erschwert.

Bei allen drei verwendeten Zelllinien zeigte sich eine ähnliche Kinetik des γ -H2AX Signals. Das γ -H2AX Signal war innerhalb der ersten Stunden nach Bestrahlung maximal (Bereich 1 - 4 Stunden nach Bestrahlung), fiel dann steil (Bereich 4-8 Stunden nach Bestrahlung) und anschließend flacher ab (8 - 24 Stunden nach Bestrahlung). Ein Beispiel ist in Abbildung 8 gezeigt. Im Rahmen der Messgenauigkeit gab es keine Unterschiede zwischen der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen und Röntgenstrahlung, sowohl die Signalintensität als auch den zeitlichen Verlauf betreffend. Die Höhe des Restsignals nach 24 h lag für #10 bei 30 - 37 % des Maximalsignals, für #10-IR bei 14 - 33 % des Maximalsignals und für U87 bei 3 - 28 % des Maximalsignals.

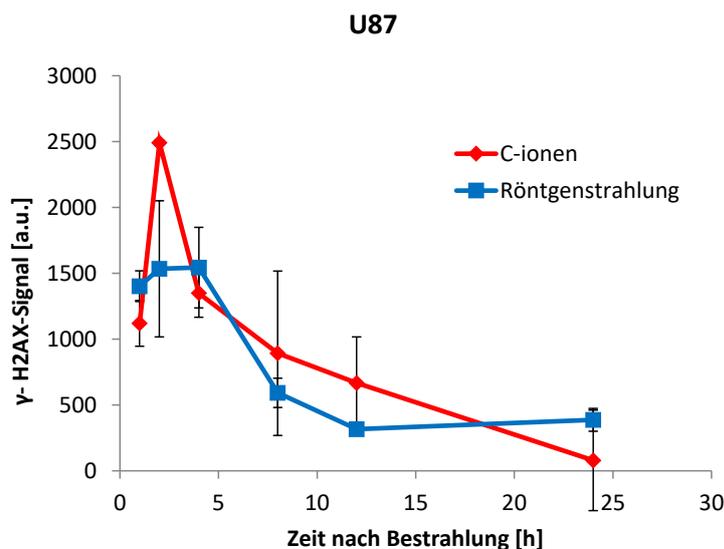


Abbildung 8: Kinetik des γ -H2AX Signals in U87 Zellen in den ersten 24 h nach Bestrahlung, normiert auf die unbestrahlte Kontrolle.

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten der Strahlenreaktion anderer Zellen überein. Groesser et al. zeigten, dass eine ähnliche Anzahl Foci durch Röntgenstrahlung und beschleunigte Fe-Ionen (LET 150 keV/μm) induziert wird¹⁸. Allerdings fanden Groesser et al., ebenso wie Rall et al., 24 h nach Fe-Ionen Bestrahlung verglichen mit Röntgenstrahlung ein deutlich höheres Restsignal, während in der vorliegenden Arbeit (LET 60 - 95 keV/μm) kein signifikanter Unterschied 24 h nach Bestrahlung gefunden wurde^{18, 19}. Averbek et al. fanden 24 h nach Bestrahlung keinen Unterschied bezüglich des Restschadens nach Röntgenstrahlung und 13 keV/μm Kohlenstoffionen sowie zwischen 13 keV/μm und 70 - 85 keV/μm (SOBP) Kohlenstoffionen. Lediglich die Kohlenstoffionen mit dem höchsten LET von 168 keV/μm zeigten nach 24 h ein deutlich erhöhtes γ-H2AX Signal²⁰.

Tendenziell wiesen die strahlenempfindlichsten Zellen #10 den höchsten Restschaden 24 h nach Bestrahlung auf. Wegen der starken Schwankungen war allerdings keine statistisch signifikante Aussage möglich. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Zellzyklusanalysen zeigte sich ebenfalls ein stimmiges Bild. Nicht reparierte DNA-Schäden führen bei intakten Zellzyklus-Kontrollpunkten zum Zellzyklusarrest. Die strahlenempfindlichste Zelllinie #10 zeigte den ausgeprägtesten Zellzyklusarrest und den größten Restschaden 24 h nach Bestrahlung.

2.1.5 Zytogenetische Charakterisierung und Stabilität der Zellen

Tumorzellen weisen in der Regel einen Karyotyp mit zahlreichen Aberrationen auf. Dabei treten spezifische Aberrationen bei bestimmten Tumorarten gehäuft auf. Bei Glioblastomen sind dies unter anderem Amplifikationen der Chromosomen # 7 und #12 und Deletionen in den Chromosomen #9 und #10²¹⁻²³. Da Zelllinien über Jahre *in vitro* kultiviert werden, kann es im Lauf der Zeit zu zusätzlichen Veränderungen kommen. Für das Projekt wurden die verwendeten Zellen zytogenetisch charakterisiert. Nach Bestrahlung von Zellen führt fehlerhafte Reparatur von Schäden in der DNA zu Chromosomenaberrationen. Nach der Bestrahlung mit jeweils 8 Gy wurden die Induktion von Chromosomenschäden und langfristige zytogenetische Veränderungen analysiert.

Analysen von Kontrollproben erfolgten zu verschiedenen Zeiten im Verlauf des Projektes, um die zytogenetische Stabilität und evtl. *in vitro* auftretende Veränderungen zu prüfen. Dabei wurde die Methode der Multiplex Fluoreszenz in situ Hybridisierung (mFISH) verwendet, die es erlaubt, alle Chromosomenpaare in unterschiedlichen Falschfarben darzustellen, und verschiedene Arten von Chromosomenaberrationen, inklusive stabiler (d. h. an Tochterzellen vererbbarer) Chromosomenaberrationen, zu analysieren. Ein Beispiel ist in Abbildung 9 gezeigt.

Die zytogenetische Analyse der Zelllinie #10 (>100 analysierte Metaphasen) zeigte überwiegend einen hypotetraploiden Chromosomensatz (durchschnittlich 87 Chromosomen) sowie zahlreiche strukturelle Chromosomenaberrationen. Die meisten strukturellen Aberrationen waren dabei (klonal) in allen Zellen der Zelllinie vorhanden; weitere Aberrationen traten zusätzlich in einer Subpopulation der Zellen oder in einzelnen Zellen (sporadisch) auf. Es wurden in #10 zwei Subpopulationen von Zellen identifiziert, die sich durch charakteristische Aberrationen unterscheiden (im Folgenden als Typ 1 und Typ 2 bezeichnet). Beispiele sind in Abbildung 10 gezeigt. Typ 1 war dabei deutlich häufiger, er machte zu verschiedenen Zeitpunkten 74 - 96 % der analysierten Zellen aus. Die Zelllinie #10 zeigte eine

vergleichsweise geringe Rate sporadischer Aberrationen von unter 10 %. Zur Analyse strahleninduzierter Chromosomenaberrationen konnte deshalb die mFISH Technik verwendet werden.

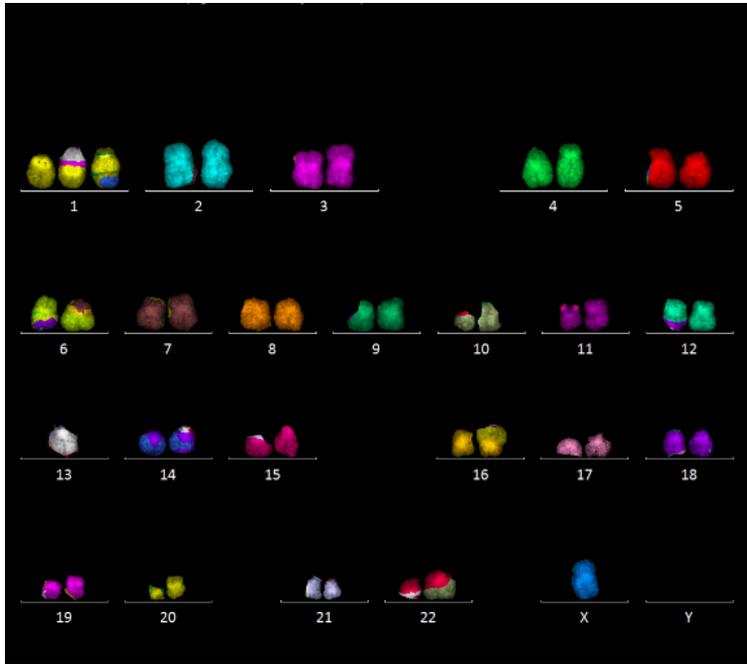


Abbildung 9: Beispiel einer mFISH Färbung (U87 Zellen). Jedes Chromosomenpaar wird in einer anderen Falschfarbe, basierend auf verschiedenen Fluoreszenzfarbstoff-Kombinationen, dargestellt. Das Beispiel zeigt ein hypo-diploides Karyogramm mit mehreren Chromosomenaberrationen (u.a. 1'-13; 20-1'-14; 6'-7; 6'-12; 12'-6; 16'-1).

Die Chromosomenanalyse der #10-IR, der strahlenselektierten Tochter-Zelllinie von #10, zeigte, dass beide Zelllinien gemeinsame Aberrationen aufweisen (>100 Metaphasen analysiert). Darüber hinaus war die #10-IR Zelllinie durch weitere charakterisierende numerische und strukturelle Aberrationen gekennzeichnet. Wie #10, zeigte auch #10-IR überwiegend einen hypotetraploiden Chromosomensatz (durchschnittlich 84 Chromosomen), es wurden 4 hypotetraploide Subtypen identifiziert. Es wurde auch ein hypodiploider Subtyp identifiziert. Zum häufigsten Subtyp gehörten durchschnittlich 60 % der Metaphasen. Die Rate sporadischer Aberrationen lag ähnlich wie bei #10 bei unter 10 %. Trotz der größeren Vielfalt von Subtypen wurde daher beschlossen, auch für #10-IR eine mFISH Analyse nach Bestrahlung durchzuführen.

In der Zelllinie U87 wurden drei Subpopulationen identifiziert, eine davon mit hypodiploidem und zwei mit hypotetraploidem Chromosomensatz. Der Anteil der Subtypen variierte von Experiment zu Experiment, wobei die hypotetraploiden Subtypen dominierten. Auffällig war eine hohe Rate zusätzlicher sporadischer Aberrationen in durchschnittlich 82 % der Zellen. Dabei waren die einzelnen Chromosomen verschieden häufig an sporadischen Aberrationen beteiligt. Für die Chromosomen #3, #4 und #5, die eine ähnliche Größe haben, zeigte sich beispielsweise, dass Chromosom #4 in über 30 % der analysierten Zellen an sporadischen

Aberrationen beteiligt war, während die Chromosomen #3 und #5 nur in 9 - 13 % der analysierten Zellen von sporadischen Aberrationen betroffen waren.

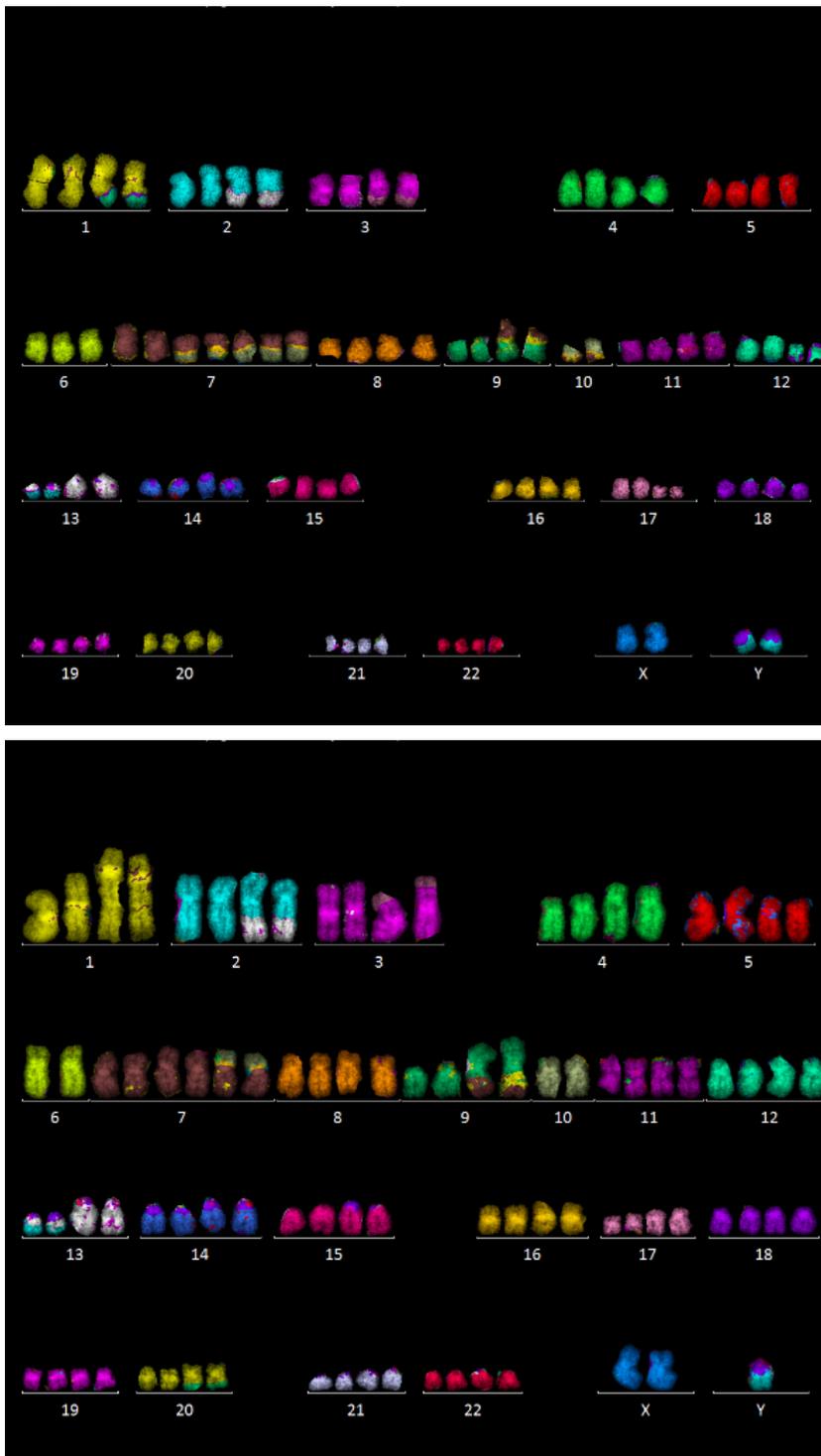


Abbildung 10: Karyogramme der Zelllinie #10, Typ 1 (oben) und Typ 2 (unten). Hypotetraploide Karyotypen mit mehreren gemeinsamen Aberrationen, u.a. 2'-13; 3'-7; 13'-2; 20'-9, sowie weiteren, den Subtyp charakterisierenden Aberrationen, u.a. 2x 1'-12 (Typ 1) vs. 2x N1' (Typ 2), 2x10'-7 (Typ 1) vs. 2x N10' (Typ 2).

Die Zelllinie U87 ist seit langem etabliert und wurde bereits zytogenetisch charakterisiert. Jedoch werden auf der Homepage der Zellbank, ATCC, nicht alle Aberrationen aufgeführt

(<https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-14.aspx#characteristics>, aufgerufen am 1.8.2020), so dass ein Vergleich mit den Angaben des Vertreibers der Zelllinie nur eingeschränkt möglich ist. Die von ATCC beschriebenen strukturellen Aberrationen sind Translokation 1'-3, Translokation 16'-1 und Deletion T9'. Die beiden letzteren wurden im vorliegenden Projekt ebenfalls gefunden, die erste allerdings nicht, sondern eine Translokation 1'-13. Squire et al. beschrieben im Jahr 2001 in U87 Zellen eine Translokation 1'-3-13²⁴. Eine Genomsequenzierung von U87 von Clark et al. aus dem Jahr 2010 zeigte insgesamt 35 interchromosomale Translokationen, darunter 1-13, nicht aber 1-3, was zur vorliegenden mFISH Analyse passt²⁵. Es könnte sich hier um eine *in vitro* Veränderung von 1'-3 über 1'-3-13 zu 1'-13 handeln. Die Translokation 16'-1 wurde von ATCC, Squire et al. sowie im vorliegenden Projekt gefunden, die Genomanalyse von Clark et al. zeigt in dieser Aberration eine zusätzliche Insertion eines kleinen Fragments von Chromosom #2, also 16'-2-1.

Der hohe Anteil sporadischer Aberrationen machte in U87 eine mFISH Auswertung von strahleninduzierten Aberrationen unmöglich. Daher wurde auf die robustere 2-farb FISH Technik zurückgegriffen. Dabei wurden die Chromosomen #5 und #8 gefärbt, da diese Chromosomen nicht an den für die Zelllinie charakteristischen (in allen Zellen auftretenden) Aberrationen und nur selten an spontanen Aberrationen beteiligt waren.

Die GSZ-Linien wachsen generell langsam, und die Zellzyklusanalysen zeigten, dass Bestrahlen mit 8 Gy zu einem lang anhaltenden (mindestens 3 Tage) Zellzyklusarrest führt. Um die strahleninduzierten Chromosomenaberrationen zu analysieren, wurden innerhalb der ersten 10 Tage nach Bestrahlung regelmäßig Chromosomenpräparate hergestellt und das erste Präparat, das eine für die Auswertung ausreichende Anzahl mitotischer Zellen enthielt, wurde verwendet (ca. 7 - 9 Tage nach Bestrahlung). Für spätere Analysen wurden die Zellen passagiert, wenn die Sphären eine geeignete Größe erreicht hatten, und weitere Chromosomenpräparate hergestellt. Nach einem Röntgenexperiment wurden Zellen über mehrere Passagen nach Bestrahlung kultiviert und 8 Wochen nach Bestrahlung analysiert. Nach der Bestrahlung wurden mFISH (#10 und #10-IR) sowie 2-Farb FISH Techniken (U87) eingesetzt.

Die Analyse der #10 nach Bestrahlung zeigt zahlreiche Aberrationen, die auf durchschnittlich 23 Bruchpunkten pro Zelle basierten, ein signifikanter Unterschied zwischen Röntgen- und Kohlenstoffbestrahlung bestand dabei nicht. Ein Beispiel ist in Abbildung 11 gezeigt. Einzelne Zellen waren stark geschädigt (bis zu ca. 100 Bruchpunkte pro Zelle), in diesen Fällen war eine zuverlässige Identifizierung des zugrundeliegenden Subtyps nicht mehr möglich.

Nach Bestrahlung veränderte sich die Zusammensetzung der Gesamtpopulation aus den verschiedenen Subtypen. War in allen Kontrollen der Typ 1 am häufigsten, trat nach Bestrahlung häufiger Typ 2 auf. In dem 8 Wochen nach Bestrahlung hergestellten Präparat war Typ 1 wieder der häufigere Subtyp. Während kurz nach Bestrahlung instabile und stabile Aberrationen gleichermaßen beobachtet wurden, traten 8 Wochen nach Bestrahlung überwiegend stabile Aberrationen auf.

Die Analyse der #10-IR nach Bestrahlung zeigte durchschnittlich ca. 30 Bruchpunkte pro Zelle nach 8 Gy Bestrahlung, ein Unterschied zwischen Röntgen- und Kohlenstoffbestrahlung zeigte sich nicht. Einzelne Zellen waren stark geschädigt (bis zu 100 Bruchpunkte). Nach Bestrahlung veränderte sich, ähnlich wie bei #10, der Anteil der einzelnen Subtypen.

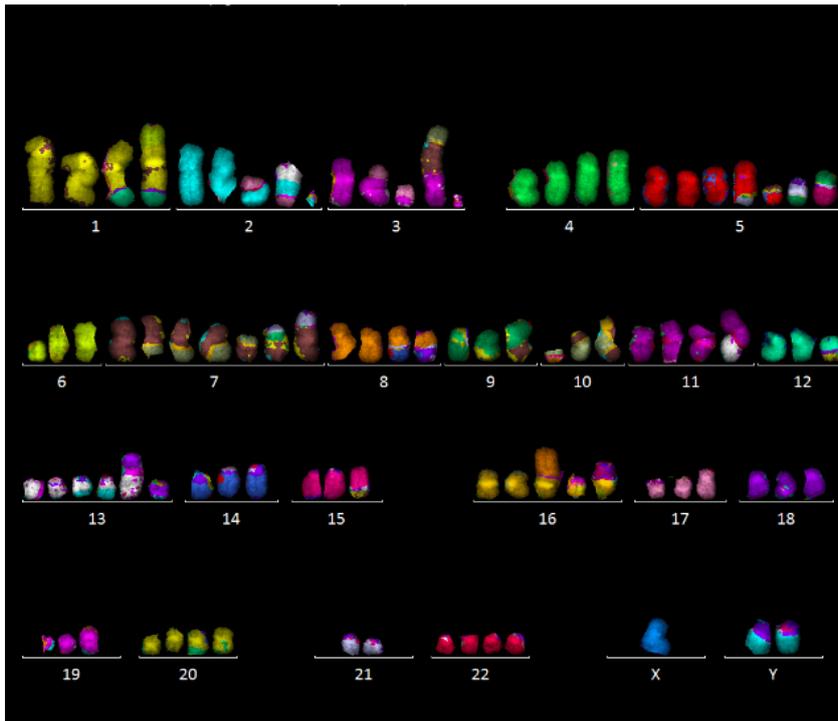


Abbildung 11: Beispiel eines Karyogramms der GSZ-Linie #10 nach Bestrahlung mit 8 Gy Röntgenstrahlung. Typ 1 mit zusätzlichen Chromosomenaberrationen basierend auf 22 Bruchpunkten.

Nach Bestrahlung zeigte sich in den #10 und #10-IR Zelllinien kein Unterschied in der Anzahl der Bruchpunkte pro Zelle, die durch 8 Gy Röntgenstrahlung und 8 Gy Kohlenstoffionen verursacht wurden. Da sich keine Unterschiede in der Wirkung von Kohlenstoffionen- und Röntgenstrahlung auf die Tumorsphärenbildung, DNA-Reparatur und den Zellzyklusarrest gezeigt hatten, überraschte dieses Ergebnis nicht.

Auffällig war die Verschiebung der Häufigkeit der einzelnen Subpopulationen durch Bestrahlung. Mögliche Ursache könnte eine unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der Subpopulationen sein, so dass die Zellen einer Subpopulation mit höherer Wahrscheinlichkeit durch Bestrahlung inaktiviert werden als die anderer. Dies würde zu den Beobachtungen der Tumorsphärenassay-Experimente passen. Der Verlauf der Dosis-Effekt-Kurven ließ auf das Vorhandensein einer strahlenresistenten Subpopulation schließen. Eine weitere Erklärung für die Verschiebung der Häufigkeiten verschiedener zytogenetischer Subpopulationen wäre ein unterschiedlich ausgeprägter Zellzyklusarrest in den verschiedenen Subtypen, so dass die Zellen einer Population früher in Mitose gehen, während die der anderen Population zu diesem Zeitpunkt noch im Arrest sind.

#10 und #10-IR enthielten auch eine Passage nach Bestrahlung noch stark geschädigte Zellen und Zellen mit nicht-vererbaren Aberrationen (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass sich diese Zellen seit der Bestrahlung noch nicht geteilt hatten. Dies passt zu den Zellzyklus-Analysen, die einen langen Zellzyklusarrest nach Bestrahlung gezeigt hatten. Ca. 8 Wochen nach Bestrahlung enthielten die Zellen überwiegend vererbare Aberrationen und es gab keinen Hinweis auf längerfristige chromosomale Instabilitäten.

Wegen der hohen Rate sporadischer Aberrationen wurde für U87 die robustere 2-farb-FISH Technik verwendet. Dazu wurden die Chromosomen #5 und #8 gefärbt und die Bruchpunkte sowie die gefärbten Chromosomen pro Zelle gezählt. Ein Beispiel ist in Abbildung 12 gezeigt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der #10 und #10-IR Zellen, zeigte sich in U87 Zellen nach Bestrahlung mit 8 Gy Kohlenstoff eine höhere Aberrationsrate als nach 8 Gy Röntgenstrahlung. Da eine mFISH Analyse nach Bestrahlung nicht möglich war, konnten die Zellen nicht den verschiedenen Subpopulationen zugeordnet werden.

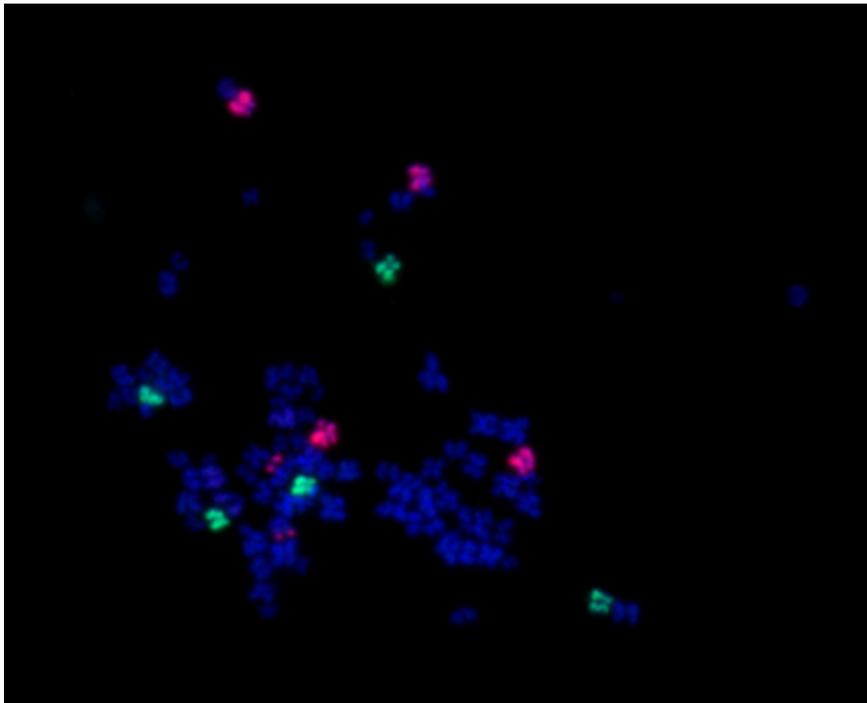


Abbildung 12: 2-Farb-FISH von U87 Zellen nach Bestrahlung. Chromosom #5 (rot) zeigt mehrere Aberrationen, Chromosom #8 (grün) nicht.

2.1.6 Identifizierung von Stammzellmarkern

Die zuverlässigste Möglichkeit, eine Tumorstammzelle zu identifizieren, ist ihre Fähigkeit, *in vivo* einen Tumor zu bilden und alle in diesem Tumor vorhandenen Zelltypen hervorzubringen. Solche Untersuchungen sind jedoch mit großem Aufwand verbunden und eignen sich nicht zur Selektion von Tumorstammzellen. Schon lange werden daher Marker gesucht, deren Expression charakteristisch für Tumorstammzellen ist. Während z. B. für hämatopoetische oder neurale Stammzellen entsprechende Marker bekannt sind, gibt es für Tumorstammzellen bisher keine zuverlässigen Marker. Zwar wurden in Publikationen zahlreiche Marker vorgeschlagen und diskutiert, deren Allgemeingültigkeit konnte aber bisher nicht bestätigt werden²⁶.

Im Rahmen des Vorhabens wurde daher die Expression von insgesamt 13 in der Literatur beschriebenen Markern (Zell-Oberflächenmarker sowie intrazelluläre Marker) nach einer Antikörperfärbung im Durchflusszytometer analysiert. Die Expression dieser Marker wurde in den drei GSZ-Zelllinien sowie zum Vergleich in NSC untersucht. Alle Experimente wurden mehrfach (in der Regel 3-fach oder öfter) durchgeführt, es wurden pro Probe mindestens 50.000

Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Ein Beispiel einer Durchflusszytometriemessung ist in Abbildung 13 gezeigt.

Die Analysen der Kontrollpopulationen zeigten, dass einige Marker von allen drei GSZ-Linien und von NSC exprimiert werden (z. B. CD44, Nestin), andere nur von GSZ oder NSC (z. B. NG2, Musashi1) oder sich die Expression von Zelllinie zu Zelllinie unterscheidet (z. B. CD15, Sox2). Eine Übersicht der analysierten Marker ist in

Tabelle 1 zusammengestellt. Obwohl bei den Experimenten besonders sorgfältig auf einheitliche Kulturbedingungen und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (z. B. ähnliche Passagenzahl) gelegt wurde, zeigten sich deutliche Schwankungen von Experiment zu Experiment (technische Replikate zeigten nur sehr geringe Schwankungen). Eine mögliche Ursache ist die Heterogenität der Zellpopulationen, welche die Chromosomenanalysen aufzeigten. Dort wurden von Experiment zu Experiment unterschiedliche Anteile der verschiedenen Subtypen in der Kultur gefunden. Zugleich kann dies ein Hinweis auf eine mögliche Ursache der kontroversen Literaturdaten sein.

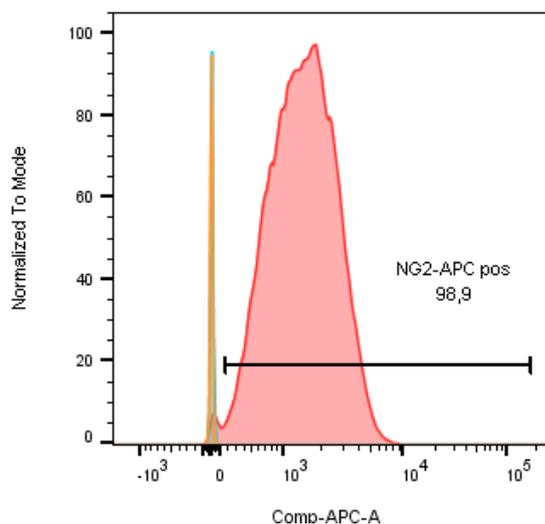


Abbildung 13: Durchflusszytometrieanalyse der #10 GSZ, gefärbt mit Anti-NG2 (rot), Isotypkontrolle (blau) sowie ungefärbte Probe (gelb).

Anschließend wurde untersucht, ob sich die Expression von Stammzellmarkern nach einer Bestrahlung mit 8 Gy Kohlenstoffionen bzw. Röntgenstrahlung ändert. Hierzu wurde die Expression der Oberflächenmarker CD15, CD44 und NG2 sowie der intrazellulären Marker GFAP, Nestin und Sox2 zwei Wochen nach Bestrahlung untersucht und mit der Kontrolle verglichen. Die Expression der Marker nach Bestrahlung unterlag ebenfalls starken Schwankungen von Experiment zu Experiment, was die Aussagekraft der Ergebnisse einschränkt.

CD15 (auch SSEA-1, Lewis-X) ist ein seit einigen Jahren diskutierter Marker für GSZ²⁷. CD15 wurde in #10-IR exprimiert, nicht aber in #10. Nach Bestrahlung war die Expression von CD15 in #10-IR Zellen tendenziell geringer als in der unbestrahlten Kontrolle. Gleichzeitig war die CD44 Expression in den #10-IR Zellen deutlich niedriger als in der Ausgangszelllinie #10. Dies zeigt, ebenso wie die Ergebnisse der Tumorsphärenbildung nach Bestrahlung und der

zytogenetischen Analysen, dass durch die Strahlenselektion eine Veränderung der Zellen stattgefunden hat und sich die #10-IR von #10 unterscheiden.

Antikörper gegen	Expression in			
	#10	#10-IR	U87	NSC
CD44	✓	✓	✓	✓
CD15	X	✓	X	(✓)
CD133	X	X	X	✓
NG2	✓	✓	✓	X
cMET	X	X	X	n.a.
A2B5	X	X	X	n.a.
GFAP	✓	✓	✓	✓
Nestin	✓	✓	✓	✓
Sox2	✓	✓	(✓)	(✓)
Nanog	X	X	X	n.a.
Oct 3/4	X	X	X	n.a.
Musashi 1	X	X	X	✓
S100A4	X	X	X	n.a.

Tabelle 1: Expression der verschiedenen getesteten Marker in den drei GSZ und in NSC. X=keine Expression, ✓= Expression, (✓) = schwache Expression, n.a. = nicht analysiert.

In keiner der drei untersuchten GSZ wurde eine Expression von CD133 (auch Prominin-1) gefunden, jedoch in den NSC, sodass ein methodischer Fehler ausgeschlossen werden kann. Bereits seit mehr als 10 Jahren wird CD133 als Marker für GSZ diskutiert^{11,28}, seine Eignung ist jedoch nach wie vor umstritten²⁹. Neuere Arbeiten legen den Schluss nahe, dass CD133-Expression alleine kein geeigneter Marker für GSZ ist, sondern das Zusammenspiel verschiedener Marker betrachtet werden muss²⁷. Die fehlende Expression von CD133 in den GSZ Zellen lässt also keine Aussage über das Vorhandensein von Stammzeleigenschaften zu. Dass die Zellen unter serumfreien Kulturbedingungen dauerhaft wachsen können und Selbsterneuerungspotenzial besitzen, wurde bereits gezeigt und ist ein Hinweis auf die Stammzeleigenschaften der Zellen⁶.

Die Expression von GFAP, einem Marker für Astrozyten, veränderte sich durch Bestrahlung nicht. Barrantes-Freer et al. zeigten, dass GFAP-Expression durch die Überführung der Zellen von serumfreiem in serumhaltiges Medium ansteigt und ein Hinweis auf Differenzierung der Zellen ist⁶. Strahlung scheint sich also, anders als die Änderung der Kulturbedingungen, nicht auf die Expression von GFAP und die Zelldifferenzierung auszuwirken.

2.1.7 Transkriptomanalysen

Tumorstammzellen sind definitionsgemäß Tumorzellen, die Stammzeleigenschaften zeigen (wie oben bereits beschrieben). Daher sind Gemeinsamkeiten von GSZ und NSC zu erwarten. Es gibt aber auch Unterschiede, so weisen GSZ eine hohe Resistenz gegenüber Strahlung (und Chemotherapeutika) auf, während NSC strahlenempfindlich sind. mRNA-Expressionsanalysen von GSZ und NSC wurden durchgeführt, um Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede zwischen GSZ und NSC sowie innerhalb der drei GSZ Linien aufzuzeigen. Dabei wurde die Gesamtheit der Transkripte in einer sogenannten Transkriptom (RNA-Seq)-Analyse untersucht, um potentielle für die Strahlenresistenz verantwortliche Gene zu identifizieren.

Insgesamt erfasste die RNA-Seq-Analyse die Expression von 56.666 Transkripten. Der Anteil zwischen in zwei Zelllinien unterschiedlich exprimierter mRNAs ist in Tabelle 2 dargestellt. Am geringsten war der Unterschied zwischen #10 und #10-IR mit 1,3 % aller untersuchten Transkripte. Dies bestätigt die enge Verwandtschaft der Zelllinie #10 und ihrer strahlenselektierten Tochterlinie #10-IR auf RNA-Ebene. Am stärksten unterschied sich die Expression in U87 und NSC (21 % der untersuchten Transkripte).

Vergleich	#10 vs #10-IR	#10 vs U87	#10-IR vs U87	#10 vs. NSC	#10-IR vs NSC	U87 vs NSC
Anzahl mRNA	758	9481	9837	7210	8946	11931
Anteil Transkriptom	0,013	0,17	0,17	0,13	0,16	0,21

Tabelle 2: Anzahl zwischen zwei Zelllinien signifikant unterschiedlich exprimierter mRNA, sowie Anteil am untersuchten Transkriptom (56.666 Transkripte).

Es wurden Heat-Maps für alle paarweisen Vergleiche erstellt, welche die 50 am stärksten unterschiedlich exprimierten RNAs darstellen. Ein Beispiel ist in Abbildung 14 gezeigt.

Heat-Maps zeigen die am stärksten unterschiedlich exprimierten RNAs, berücksichtigen jedoch nicht ihre Funktion. Pathway-Analysen dagegen berücksichtigen die Funktion der Transkripte. 415 in der KEGG-Datenbank (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) enthaltene Pathways wurden analysiert. In der grafischen Darstellung des Pathways wurden die Veränderungen in der Regulation der beteiligten mRNAs farbig dargestellt, siehe Beispiel in Abbildung 15. In den paarweisen Vergleichen der Zelllinien waren zwischen 47 und 74 Pathways signifikant verändert. Die meisten der veränderten Signalwege hatten jedoch keinen Bezug zu Stammzeleigenschaften oder zur Strahlenreaktion. Es handelte sich dabei beispielsweise um Signalwege des Kohlenhydrat- oder Aminosäuren-Metabolismus. Jedoch wurden auch in einigen Signalwegen, die für die Strahlenantwort relevant sind, z. B. Zellzyklus-, Apoptose- und p53-Signalwege, signifikante Veränderungen gefunden.

Die #10 und #10-IR Zellen unterschieden sich unter anderem in der Expression der DNA-Replikations-, Zellzyklus-, p53-, Autophagie- und Apoptose-Pathways. Weiterhin waren auch Signalwege aus dem Bereich des Nervensystems verändert. In 43 Pathways unterschieden sich NSC signifikant von allen drei GSZ-Linien, unter anderem in der Expression der DNA-

Replikations-, Zellzyklus-, HIF-1-, mTOR-Pathways. Nach Bestrahlung waren in #10, U87 und NSC 85, 67 und 23 Pathways signifikant gegenüber ihren jeweiligen unbestrahlten Kontrollen verändert.

Um Unterschiede zwischen GSZ und NSC aufzudecken, sind die insgesamt 3530 Transkripte von besonderem Interesse, die in allen drei Vergleichen zwischen GSZ und NSC unterschiedlich exprimiert waren. Davon waren 3045 RNAs in allen drei Vergleichen in dieselbe Richtung reguliert, also in den NSC signifikant höher (oder niedriger) exprimiert, als in allen drei GSZ. Diese Gene wurden in der Pubmed-Datenbank zusammen mit dem Begriff „Glioblastoma“ bzw. „radiation“ gesucht. So wurden 666 Gene/Transkripte identifiziert, die in den drei GSZ-Linien signifikant anders reguliert waren als in NSC und für die es mindestens ein Suchergebnis zusammen mit einem der beiden Begriffe in der Pubmed-Datenbank gab.

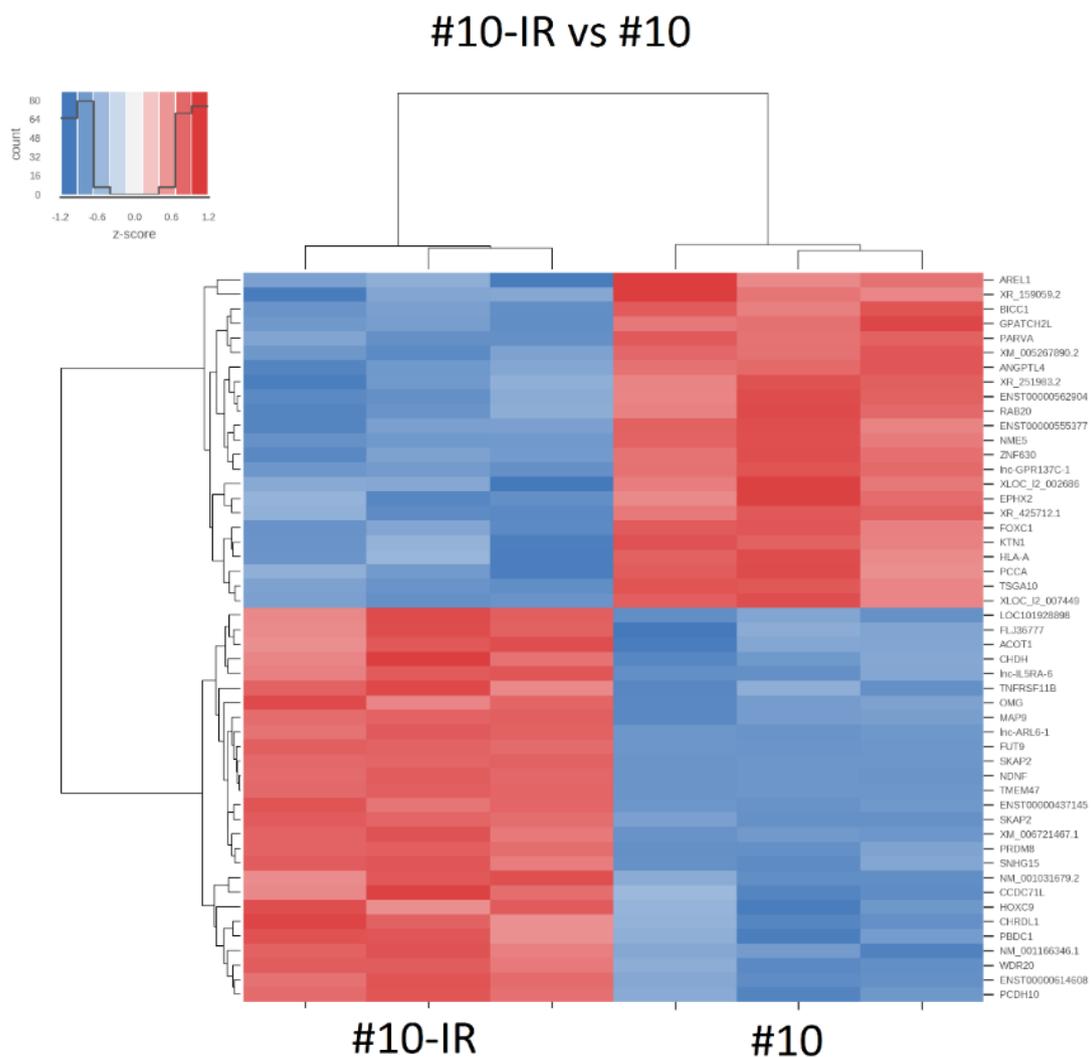


Abbildung 14: Heatmap der 50 im Vergleich #10-IR mit #10 am stärksten unterschiedlich exprimierten RNAs.

Anschließend wurde der Einfluss der Strahlenexposition auf die RNA-Expression analysiert. Nach Bestrahlung änderte sich die Expression von 1,3 - 3,3 % der im Array untersuchten Gene signifikant. In jeweils zwei der drei paarweisen Vergleiche waren 87, 111 bzw. 119 Transkripte signifikant unterschiedlich exprimiert. Davon waren zehn in allen drei Vergleichen signifikant unterschiedlich exprimiert. RNAs, die in mehr als einem Vergleich signifikant verändert waren, wurden ebenfalls in der Pubmed-Datenbank zusammen mit den Begriffen „Glioblastoma“ bzw. „radiation“ gesucht.

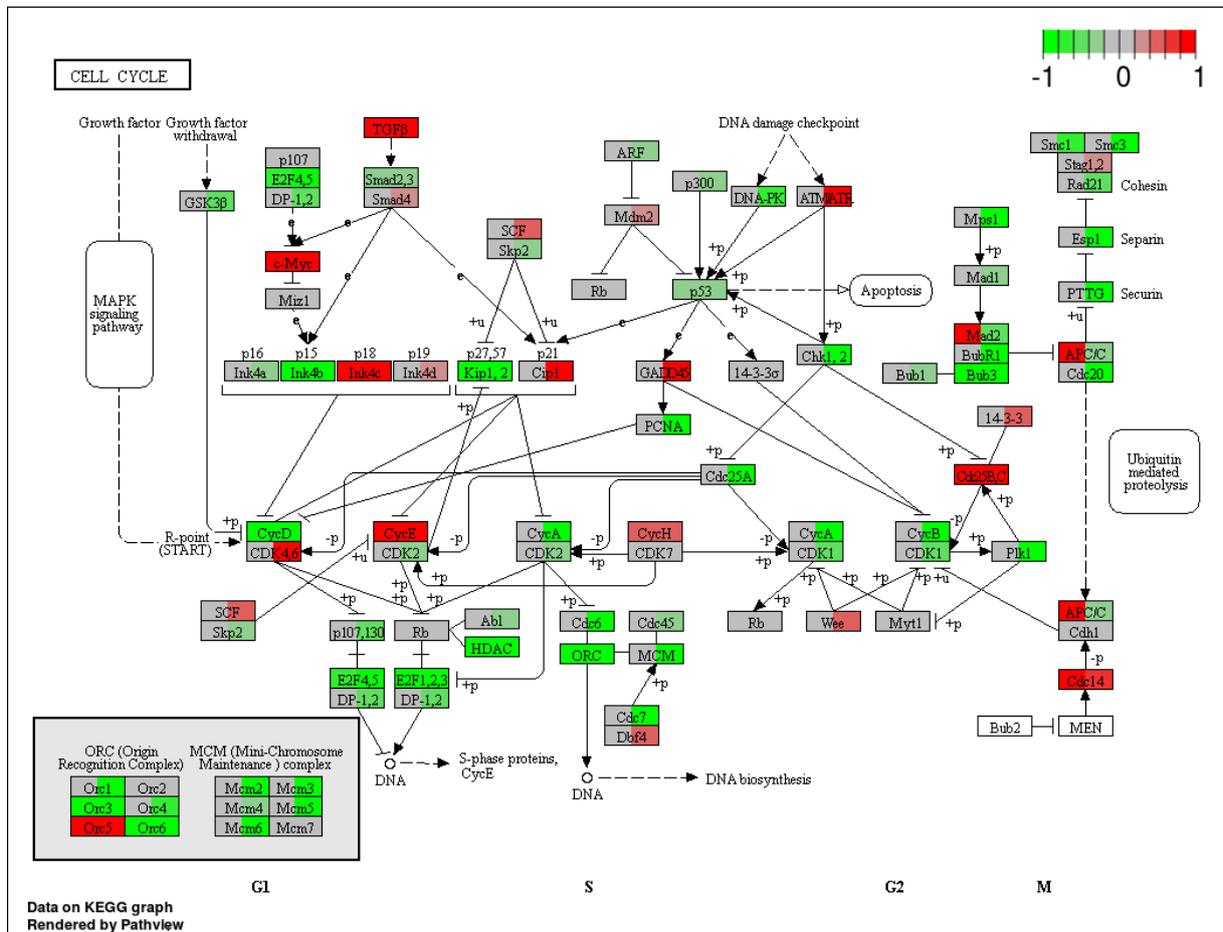


Abbildung 15: Beispiel der Pathway-Analysen. Vergleich der Expression der zum Zellzyklus-Pathway gehörigen mRNAs zwischen #10 und NSC. Signifikant unterschiedlich exprimierte Gene sind farbig dargestellt.

Als nächstes wurden drei vielversprechende Transkripte ausgewählt und deren Expression mittels real-time qPCR überprüft, anschließend durch si-RNA vermittelten Knockdown in den Zellen herunterreguliert und der Einfluss auf die Tumorsphärenbildung überprüft. Basierend auf den Array-Ergebnissen und der Literaturrecherche wurden die Gene FoxM1, Parp3 und AurkB ausgewählt. Der Transkriptionsfaktor *Forkhead box M1* (FoxM1) spielt eine Schlüsselrolle bei der Zellproliferation. Das FoxM1 Gen gilt als Proto-Onkogen. FoxM1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Tumormetastasen³⁰. Die FoxM1 Expression korreliert mit dem Malignitätsgrad von Astrozytomen. Niedrig-gradige Astrozytome zeigen eine geringe Expression von Fox M1 während Glioblastome (Astrozytome IV. Grades) eine hohe Expression zeigen^{31 32}. In Glioblastom-Patienten war die FoxM1 Expression mit

verkürztem Überleben assoziiert³¹. In Experimenten führte FoxM1 Überexpression zu erhöhter Tumorigenität, FoxM1 Inhibierung verringerte das Tumorwachstum in Mäusen³¹. In Experimenten mit GBM und GSZ Zelllinien führte FoxM1 Inhibierung zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit^{33,34}. Quan et al. beschrieben eine Interaktion von Parp3 und FoxM1 zur Aufrechterhaltung der Strahlenresistenz von Glioblastomzellen³⁵. FoxM1 ist ein aussichtsreiches Kandidatengen, um eine Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit durch Knockdown zu erreichen.

Parp3 wurde als zweites vielversprechendes Kandidatengen für einen Knockdown ausgewählt. Die *Poly(ADP-Ribose) Polymerase 3*, Parp3, gehört zur Familie der Poly(ADP-Ribose) Polymerasen, die für eine Reihe von zellulären Prozessen, u.a. DNA Reparatur, Mitose und Apoptose verantwortlich ist. Parp3 Knockdown führte in Experimenten mit Glioblastomzelllinien zu verringerter Zellproliferation und erhöhter Strahlenempfindlichkeit³⁵. Inhibierung von Parp1, einem anderen Mitglied der Parp Familie, erhöhte die Empfindlichkeit von GSZ gegenüber Temozolomid, dem Standard-Chemotherapeutikum beim Glioblastom³⁶. Parp-Inhibitoren werden bei der Therapie unter anderem von Brustkrebs eingesetzt und in klinischen Studien wird die Möglichkeit einer Therapie von Glioblastomen mit Parp-Inhibitoren zusammen mit IMRT und Temozolomid untersucht^{37,38}.

Als drittes Gen für die Knockdown-Experimente wurde Aurorakinase B ausgewählt. Aurorakinase B ist genau wie Aurorakinase A und C eine Proteinkinase aus der Gruppe der Serin/Threoninkinasen. Aurorakinasen gelten als Onkogene. Aurorakinase B ist Teil des „Chromosomal Passenger Complex“ CPC³⁹. Die Expression von Aurorakinase A und B ist in Glioblastomgewebe verglichen mit normalem Hirngewebe erhöht⁴⁰. Die Proliferation von Glioblastomzelllinien wird durch Aurorakinaseinhibitoren deutlich erniedrigt^{40,41}. Mit Aurorakinaseinhibitoren behandelte Zellen zeigen vermehrt strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen, Polyploidie, Mikrokerne und mehrkernige Zellen^{41,42}. Die Empfindlichkeit von Glioblastomzellen gegenüber Temozolomid und Bestrahlung wird durch Aurorakinaseinhibitoren erhöht⁴⁰. Li et al. untersuchten die Wirkung des Aurorakinase-Inhibitors VX-680 (der gegen alle Aurorakinasen, am effizientesten jedoch gegen Aurorakinase A wirkt) auf GSZ und zeigte G2/M Arrest, Apoptose, verringerte Proliferation und erhöhte Strahlenempfindlichkeit⁴³.

Die Knockdown-Experimente wurden für alle drei getesteten Gene erfolgreich durchgeführt (immer mindestens 3-fache Durchführung der Versuche). Die Expression der Gene wurde auf 39-84 % des Kontrollwertes verringert. Die Fähigkeit zur Tumorsphärenbildung wurde durch den Knockdown nicht beeinflusst. Nach Bestrahlung zeigten die Dosis-Effekt-Kurven der Knockdown-Zellen den gleichen zweiphasigen Verlauf, der auch ohne Knockdown beobachtet wurde, siehe Abbildung 16. Nach Knockdown waren die GSZ tendenziell, in einigen Fällen auch signifikant strahlenempfindlicher als die Kontrollen. In den #10 Zellen führte der Knockdown von Parp3 und AuroraB zu einer signifikant erniedrigten Sphärenbildungsrate nach Bestrahlung, in den besonders strahlenresistenten #10-IR zeigten sich bei allen drei Genen signifikante Unterschiede. In den U87 Zellen führte nur der AuroraB Knockdown zu einer signifikanten Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit.

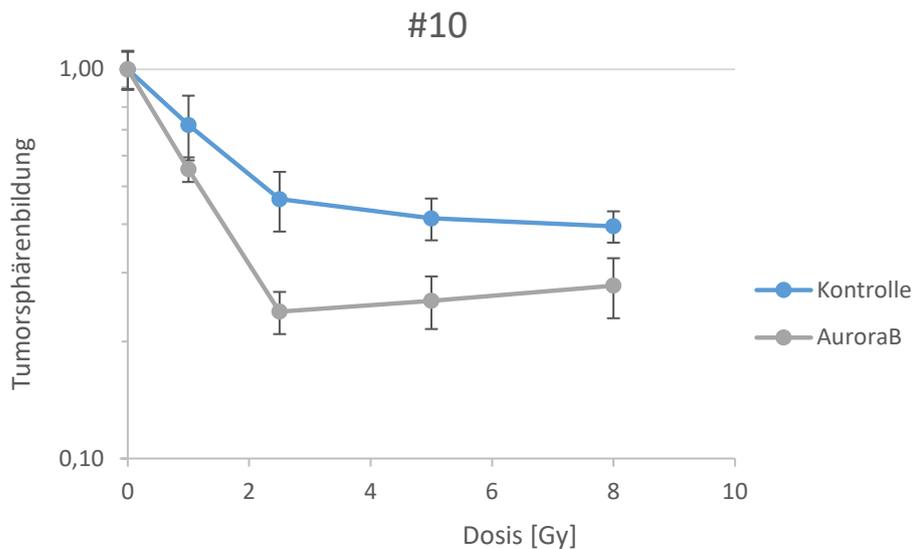


Abbildung 16: Tumorsphärenbildung nach Röntgen-Bestrahlung von #10 Zellen nach einem si-RNA-vermittelten Knockdown von AuroraB verglichen mit der Kontrolle.

Es bestand keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Unterdrückung der RNA-Expression und der Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Strahlenempfindlichkeit ein komplexer, von der Expression zahlreicher Gene abhängiger Prozess ist, aber bereits die Veränderung der Expression eines einzigen Gens zu sichtbaren Veränderungen führen kann. Gleichzeitig wirft es die Frage auf, ob eine kombinierte Veränderung in der Expression mehrerer Gene zu einem additiven Effekt führen würde, den man sich bei der Bekämpfung besonders strahlenresistenter GSZ zunutze machen könnte.

2.2 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses

Das wesentliche Ziel des Vorhabens war es, ein besseres Verständnis der Strahlenresistenzmechanismen von Tumorstammzellen zu gewinnen. Es ist dem Bereich der Grundlagenforschung zuzuordnen. Im Hinblick auf die klinische Forschung und letztlich klinische Anwendung in der Tumorthherapie besteht ein großes Interesse an einem besseren Verständnis der Mechanismen, die zur Resistenz von Tumorstammzellen gegen Strahlung führen, um Möglichkeiten zu finden, diese Resistenzmechanismen zu umgehen bzw. zu überwinden und die Therapie von Tumorerkrankungen zu optimieren. Langfristig können daher die Ergebnisse des Vorhabens einen Beitrag zu Optimierungen im Bereich der Tumorthherapie leisten. Da Strahlentherapie ein wichtiges Standardverfahren in der Tumorthherapie ist, tragen alle Forschungsergebnisse, die zu einem besseren Verständnis der Therapieresistenz bzw. zu Verbesserungen der Therapieverfahren führen, letztlich zu einer besseren Gesundheitsversorgung für die Gesellschaft bei.

Die Knockdown-Experimente zeigten, dass die Herunterregulation bestimmter Gene die Strahlenresistenz verringert. Dieser Effekt zeigte sich auch bei hohen Dosen, die besonders therapierelevant sind, während die erwartete hohe Effektivität von Kohlenstoffionen im Vergleich zu Röntgenstrahlung bei hohen Dosen nicht beobachtet wurde. Die Herunterregulation jeweils eines Genes verringerte die Strahlenresistenz derselben Zelllinie jeweils moderat. Daraus ergibt sich die Frage, ob diese Effekte additiv kombiniert werden könnten, um eine weitere Steigerung der Strahlensensitivität zu erreichen. Weitere Forschungen auf dem Gebiet der Strahlenresistenzmechanismen von Tumorstammzellen sind erforderlich, um die Beeinflussung der Strahlenresistenz von GSZ besser zu verstehen und mögliche klinische Nutzungsmöglichkeiten zu untersuchen.

Die wissenschaftlichen Ergebnisse dieses Vorhabens wurden bzw. werden auf nationalen und internationalen Konferenzen vorgestellt und in der Fachliteratur publiziert, um sie anderen Forschern und der interessierten Öffentlichkeit zugänglich zu machen. Die gewonnenen Erkenntnisse können so als Grundlage für weitere Forschung auf dem Gebiet verwendet werden.

2.3 Während der Durchführung des FE-Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Die Strahlenreaktion von Glioblastomzellen ist angesichts der schlechten Prognose dieser Erkrankung ein drängendes Problem und wird weltweit erforscht. Während der Laufzeit des Vorhabens erschienen entsprechende Publikationen in Fachzeitschriften. Für das vorliegende Vorhaben relevant war eine 2019 erschienene Publikation von Chiblak et al., in der unter anderem die Reaktion einer humanen GSZ-Linie auf Röntgenstrahlung, Protonen und Kohlenstoffionen im Überlebensassay untersucht wurde¹⁰. Die Studie wurde zur Diskussion der Ergebnisse des Tumorsphärenassays herangezogen (siehe oben). Der Schwerpunkt der Studie von Chiblak et al. lag allerdings auf Mäuse-Experimenten und war daher nicht mit dem vorliegenden Vorhaben vergleichbar.

2.4 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des FE-Ergebnisses

Die Ergebnisse des Vorhabens wurden auf der Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für biologische Strahlenforschung deGBS und der europäischen Strahlenforschungsgesellschaft European Radiation Research Society ERRS präsentiert. Eine Publikation in einer Fachzeitschrift ist in Vorbereitung.

Literaturliste

1. Weyrather WK, Ritter S, Scholz M, Kraft G. RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity. *Int J Radiat Biol* 1999;75(11):1357-1364.
2. Combs SE, Bohl J, Elsasser T et al. Radiobiological evaluation and correlation with the local effect model (LEM) of carbon ion radiation therapy and temozolomide in glioblastoma cell lines. *Int J Radiat Biol* 2009;85(2):126-137.
3. Schulz-Ertner D, Karger CP, Feuerhake A et al. Effectiveness of carbon ion radiotherapy in the treatment of skull-base chordomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68(2):449-457.
4. Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Hof H et al. Carbon ion radiotherapy of skull base chondrosarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67(1):171-177.
5. Ponten J, Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1968;74(4):465-486.
6. Barrantes-Freer A, Kim E, Bielanska J et al. Human glioma-initiating cells show a distinct immature phenotype resembling but not identical to NG2 glia. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013;72(4):307-324.
7. Mayer M, Arrizabalaga O, Lieb F, Ciba M, Ritter S, Thielemann C. Electrophysiological investigation of human embryonic stem cell derived neurospheres using a novel spike detection algorithm. *Biosens Bioelectron* 2018;100:462-468.
8. Takahashi M, Hirakawa H, Yajima H, Izumi-Nakajima N, Okayasu R, Fujimori A. Carbon ion beam is more effective to induce cell death in sphere-type A172 human glioblastoma cells compared with X-rays. *Int J Radiat Biol* 2014;90(12):1125-1132.
9. Chiblak S, Tang Z, Campos B et al. Radiosensitivity of Patient-Derived Glioma Stem Cell 3-Dimensional Cultures to Photon, Proton, and Carbon Irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016;95(1):112-119.
10. Chiblak S, Tang Z, Lemke D et al. Carbon irradiation overcomes glioma radioresistance by eradicating stem cells and forming an antiangiogenic and immunopermissive niche. *JCI Insight* 2019;4(2).
11. Bao S, Wu Q, McLendon RE et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444(7120):756-760.
12. Lim YC, Roberts TL, Day BW et al. A role for homologous recombination and abnormal cell-cycle progression in radioresistance of glioma-initiating cells. *Mol Cancer Ther* 2012;11(9):1863-1872.
13. Lim YC, Roberts TL, Day BW et al. Increased sensitivity to ionizing radiation by targeting the homologous recombination pathway in glioma initiating cells. *Mol Oncol* 2014;8(8):1603-1615.
14. Tachon G, Cortes U, Guichet PO et al. Cell Cycle Changes after Glioblastoma Stem Cell Irradiation: The Major Role of RAD51. *Int J Mol Sci* 2018;19(10).
15. Liu J, Liu Y, Xie T et al. Radiation-induced G2/M arrest rarely occurred in glioblastoma stem-like cells. *Int J Radiat Biol* 2018;94(4):394-402.

16. Pecchia I, Dini V, Ricci-Vitiani L et al. Glioblastoma stem cells: radiobiological response to ionising radiations of different qualities. *Radiat Prot Dosimetry* 2015;166(1-4):374-378.
17. Lobrich M, Shibata A, Beucher A et al. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 2010;9(4):662-669.
18. Groesser T, Chang H, Fontenay G et al. Persistence of gamma-H2AX and 53BP1 foci in proliferating and non-proliferating human mammary epithelial cells after exposure to gamma-rays or iron ions. *Int J Radiat Biol* 2011;87(7):696-710.
19. Rall M, Kraft D, Volcic M et al. Impact of Charged Particle Exposure on Homologous DNA Double-Strand Break Repair in Human Blood-Derived Cells. *Front Oncol* 2015;5:250.
20. Averbeck NB, Topsch J, Scholz M, Kraft-Weyrather W, Durante M, Taucher-Scholz G. Efficient Rejoining of DNA Double-Strand Breaks despite Increased Cell-Killing Effectiveness following Spread-Out Bragg Peak Carbon-Ion Irradiation. *Front Oncol* 2016;6:28.
21. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008;455(7216):1061-1068.
22. Baysan M, Woolard K, Cam MC et al. Detailed longitudinal sampling of glioma stem cells in situ reveals Chr7 gain and Chr10 loss as repeated events in primary tumor formation and recurrence. *Int J Cancer* 2017;141(10):2002-2013.
23. Koshiyama DB, Trevisan P, Graziadio C et al. Frequency and clinical significance of chromosome 7 and 10 aneuploidies, amplification of the EGFR gene, deletion of PTEN and TP53 genes, and 1p/19q deficiency in a sample of adult patients diagnosed with glioblastoma from Southern Brazil. *J Neurooncol* 2017;135(3):465-472.
24. Squire JA, Arab S, Marrano P et al. Molecular cytogenetic analysis of glial tumors using spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. *Mol Diagn* 2001;6(2):93-108.
25. Clark MJ, Homer N, O'Connor BD et al. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet* 2010;6(1):e1000832.
26. Ludwig K, Kornblum HI. Molecular markers in glioma. *J Neurooncol* 2017;134(3):505-512.
27. Brown DV, Filiz G, Daniel PM et al. Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intra-tumor heterogeneity. *PLoS One* 2017;12(2):e0172791.
28. Lathia JD, Gallagher J, Myers JT et al. Direct in vivo evidence for tumor propagation by glioblastoma cancer stem cells. *PLoS One* 2011;6(9):e24807.
29. Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O et al. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 2008;122(4):761-768.
30. Raychaudhuri P, Park HJ. FoxM1: a master regulator of tumor metastasis. *Cancer Res* 2011;71(13):4329-4333.
31. Liu M, Dai B, Kang SH et al. FoxM1B is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells. *Cancer Res* 2006;66(7):3593-3602.
32. Rickman DS, Bobek MP, Misek DE et al. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* 2001;61(18):6885-6891.

33. Gouaze-Andersson V, Gherardi MJ, Lemarie A et al. FGFR1/FOXM1 pathway: a key regulator of glioblastoma stem cells radioresistance and a prognosis biomarker. *Oncotarget* 2018;9(60):31637-31649.
34. Maachani UB, Shankavaram U, Kramp T, Tofilon PJ, Camphausen K, Tandle AT. FOXM1 and STAT3 interaction confers radioresistance in glioblastoma cells. *Oncotarget* 2016;7(47):77365-77377.
35. Quan JJ, Song JN, Qu JQ. PARP3 interacts with FoxM1 to confer glioblastoma cell radioresistance. *Tumour Biol* 2015;36(11):8617-8624.
36. Tentori L, Ricci-Vitiani L, Muzi A et al. Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates resistance of human glioblastoma stem cells to temozolomide. *BMC Cancer* 2014;14:151.
37. Fulton B, Short SC, James A et al. PARADIGM-2: Two parallel phase I studies of olaparib and radiotherapy or olaparib and radiotherapy plus temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma, with treatment stratified by MGMT status. *Clin Transl Radiat Oncol* 2018;8:12-16.
38. Lesueur P, Lequesne J, Grellard JM et al. Phase I/IIa study of concomitant radiotherapy with olaparib and temozolomide in unresectable or partially resectable glioblastoma: OLA-TMZ-RTE-01 trial protocol. *BMC Cancer* 2019;19(1):198.
39. Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(12):789-803.
40. Borges KS, Castro-Gamero AM, Moreno DA et al. Inhibition of Aurora kinases enhances chemosensitivity to temozolomide and causes radiosensitization in glioblastoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138(3):405-414.
41. Ryu J, Pyo J, Lee CW, Kim JE. An Aurora kinase inhibitor, AMG900, inhibits glioblastoma cell proliferation by disrupting mitotic progression. *Cancer Med* 2018;7(11):5589-5603.
42. Wiedemuth R, Klink B, Fujiwara M et al. Janus face-like effects of Aurora B inhibition: antitumoral mode of action versus induction of aneuploid progeny. *Carcinogenesis* 2016;37(10):993-1003.
43. Li N, Maly DJ, Chanthery YH et al. Radiotherapy followed by aurora kinase inhibition targets tumor-propagating cells in human glioblastoma. *Mol Cancer Ther* 2015;14(2):419-428.