



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Medicine and Health

Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf die Radiosensitivität von
Glioblastomzellen

Christina Michaela Lieb

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der
Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Bernhard Haslinger

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Stephanie E. Combs
2. apl. Prof. Dr. Thomas E. Schmid

Die Dissertation wurde am 11.06.2025 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 08.10.2025
angenommen.

Für meine Oma

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Symbolverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Glioblastom	1
1.1.1 Epidemiologie und Prognose	1
1.1.2 Klassifikation	1
1.1.3 Tumorentstehung	3
1.1.4 Therapie	4
1.2 Der Proteasominhibitor Bortezomib	6
1.2.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System	6
1.2.2 Wirkung von Bortezomib	7
1.2.3 Radiosensitivierung durch Bortezomib	8
1.3 Radiotherapie	10
1.3.1 Ionisierende Strahlung	10
1.3.2 DNA-Schäden und Reparaturmechanismen	11
1.3.3 Radiosensitivität	11
2 Zielsetzung	13
3 Material und Methoden	14
3.1 Material	14
3.1.1 Zelllinien	16

3.1.2	Bortezomib	16
3.2	Methoden.....	18
3.2.1	Statistische Methoden	18
3.2.2	Bestrahlung	18
3.2.3	Zellkultur	18
3.2.4	Zellzyklusanalyse	19
3.2.4.1	Zellzyklusanalyse LN229 und U251	19
3.2.4.2	Zellzyklusanalyse LN18	22
3.2.5	AlamarBlue Assay	22
3.2.6	Colony Formation Assay	23
3.2.6.1	Colony Formation Assay Bortezomib.....	25
3.2.6.2	Colony Formation Assay Bortezomib und Bestrahlung.....	26
4	Ergebnisse	28
4.1	Zellzyklusanalyse	28
4.1.1	Zellzyklusanalyse LN18.....	28
4.1.2	Zellzyklusanalyse LN18, LN229, U251	30
4.2	AlamarBlue Assay	33
4.3	Colony Formation Assay	37
4.3.1	Colony Formation Assay Bortezomib	37
4.3.2	Colony Formation Assay Bortezomib und Bestrahlung.....	38
5	Diskussion	46
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	46
5.2	Diskussion der Methoden.....	47
5.2.1	Etablierung von Konzentration und Dauer der Bortezomib- behandlung	47
5.2.2	Diskussion der Colony Formation Assays nach Kombinations- behandlung mit Bortezomib und Bestrahlung.....	49

5.3	Diskussion der Ergebnisse	49
5.3.1	G ₂ M-Arrest durch Bortezomib	49
5.3.2	Radiosensitivierung durch Bortezomib	50
5.4	Ausblick.....	53
6	Zusammenfassung.....	55
7	Abstract.....	57
8	Literaturverzeichnis	58
9	Danksagung.....	64

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AG	Aktiengesellschaft
Akt	Name einer Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
ATRX	ATP-dependent Helicase
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
BTZ	Bortezomib
bzw.	Beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CDKN2A/B	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A/B
CFA	Colony Formation Assay
cIMPACT-NOW	Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy – not officially WHO
CNS	Central Nervous System
Co	Compagnie
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	5'-C-Phosphat-G-3'
DER	Dose Enhancement Ratio
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ESCC	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (Esophageal Squamous Cell Carcinoma)

et al.	Et alia
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FDA	Food and Drug Administration
G₁-/ G₂-Phase	Gap-1-/ Gap-2-Phase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GSC	Glioma stem-like cells
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor 1
HNC	Kopf-Hals-Tumore (Head and Neck Cancer)
HR	Homologe Rekombination
I-Phase	Interphase
IκB	Inhibitor of Nuclear Factor- κ B
IC₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IDH	Isocitratdehydrogenase
LET	Linearer Energietransfer
Ltd.	Limited
M-Phase	Mitosephase
MAP	Mitogen-activated Protein
MGMT	O ₆ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NF-κB	Nuclear Factor- κ B
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (non-homologous end joining)
NOTCH	Name eines Rezeptors
ns	Nicht signifikant
o. J.	Ohne Jahr
OD	Optische Dichte
OSCC	Orales Plattenepithelkarzinom (Oral Squamous Cell Carcinoma)
p16	Protein 16 (CDK-Inhibitor 2A)

PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Plating Efficiency
PI	Propidium Iodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RB	Retinoblastomprotein- bzw. -gen
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S-Phase	Synthesephase
SD	Standardabweichung
SEM	Standard Error of the Mean
SER	Sensitization Enhancement Ratio
SF	Survival Fraction
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TMZ	Temozolomid
TP53	TP53-Tumorsuppressorgen
TRAF-6	TNF Receptor Associated Factor
TTF	Tumor Treating Fields
TUM	Technische Universität München
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	Vergleiche
vs.	Versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wnt	Name eines Wachstumsfaktors
XRCC-7	Name eines Gens
z. B.	Zum Beispiel

ZNS	Zentrales Nervensystem
------------	------------------------

Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung
α	Alpha
β	Beta
κ	Kappa
®	Eingetragene Marke
%	Prozent
+	Plus
–	Minus
=	Gleichheitszeichen
<	Kleinerzeichen
>	Größerzeichen
&	Und
°C	Grad Celsius
D	Bestrahlungsdosis
e	Eulersche Zahl
G	G-Zahl (Beschleunigungsgröße der Zentrifuge)
cm	Zentimeter
d	Tag
eV	Elektronenvolt
g/mol	Gramm pro Mol
Gy	Gray
h	Stunde
kV	Kilovolt
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
mg	Milligramm

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
n	Anzahl
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch den Proteasominhibitor Bortezomib (Paramore & Frantz, 2003).....	7
Abbildung 2: Direkte und indirekte Wirkung von ionisierender Strahlung (Hall & Giaccia, 2012c).....	10
Abbildung 3: Überblick über die vorherrschenden Formen der DNA-Reparatur und deren Fehleranfälligkeit in verschiedenen Zellzyklusphasen (Hall & Giaccia, 2012b).....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Zellzyklusanalyse.....	20
Abbildung 5: Auswertung der Zellzyklusanalyse von LN229, U251 und LN18 im Programm ModFit – Vergleich 0 nM versus 20 nM Bortezomib nach 24 Stunden	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des alamarBlue Assays	23
Abbildung 7: Beispiel für die Bestimmung der Anzahl an Kolonien bei der Zelllinie LN18 nach Behandlung mit 10 nM Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung mit 1 Gy.....	24
Abbildung 8: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Colony Formation Assays nach Behandlung mit Bortezomib	25
Abbildung 9: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Colony Formation Assays nach Behandlung mit Bortezomib und anschließender Bestrahlung.....	26
Abbildung 10: Beispielhafte Belegung einer 12-well-Platte für eine Bestrahlungsdosis im Colony Formation Assay nach Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden	27
Abbildung 11: Anteil der LN18-Zellen in der G ₂ M-Phase im Zeitverlauf für verschiedene Bortezomibkonzentrationen; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n = 3.....	28

Abbildung 12: Zellzyklusanalyse von LN18 nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen und Fixierung nach verschiedenen Zeitpunkten; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n = 3; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001	29
Abbildung 13: Direkter Vergleich des Anteils der Zellen drei verschiedener Glioblastomzelllinien in der G ₂ M-Phase nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen für 24 Stunden; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n = 3; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001	30
Abbildung 14: Zellzyklusanalyse von LN18, LN229 und U251 nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen für 24 Stunden; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n = 3; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001	32
Abbildung 15: Vergleich der Zellviabilität der Zelllinien LN18, LN229 und U251 nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen für 24, 48 und 72 Stunden; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n = 3 (LN18, LN229); n = 5 (U251); Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001	34
Abbildung 16: Direkter Vergleich der Zellviabilität nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen für 24, 48 und 72 Stunden bei den Zelllinien LN18, LN229 und U251; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n = 3 (LN18, LN229); n = 5 (U251); Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001	36
Abbildung 17: Survival Fraction drei verschiedener Glioblastomzelllinien nach Behandlung mit unterschiedlichen Bortezomibkonzentrationen für 24 Stunden; Fit: Inhibitor vs. normalized response – variable slope; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n = 3; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001	37
Abbildung 18: Vergleich der Survival Fraction von LN18, LN229 und U251 nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung; Fit mittels linear-quadratischem Modell (LN18, LN229) bzw. linearem Modell (U251); Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n=4	

(LN18, LN229), n=5 (U251); Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 Gy mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	39
Abbildung 19: Survival Fraction von LN18 nach Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung; Fit mittels linear-quadratischem Modell; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n=4; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	40
Abbildung 20: Survival Fraction von LN229 nach Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung; Fit mittels linear-quadratischem Modell; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n=4; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	40
Abbildung 21: Survival Fraction von U251 nach Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung; Fit mittels linearem Modell; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n=5; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	41
Abbildung 22: Vergleich der Survival Fraction von LN18, LN229 und U251 nach Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung mit Röntgenstrahlung; Fit mittels linear-quadratischem Modell (LN18, LN229) bzw. linearem Modell (U251); Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n=4 (LN18, LN229), n=5 (U251).....	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der diffusen Gliome im Erwachsenenalter anhand der WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS von 2021 (Louis et al., 2021; Weller et al., 2022).....	2
Tabelle 2: Beispiele aus der Literatur für eine Radiosensitivierung verschiedener Tumorentitäten durch Bortezomib.....	9
Tabelle 3: Auflistung verwendeter Materialien	15
Tabelle 4: Auflistung verwendeter Geräte.....	15
Tabelle 5: Auflistung verwendeter Programme.....	15
Tabelle 6: Charakterisierung der Glioblastomzelllinien LN18, LN229, U251	16
Tabelle 7: Charakterisierung des Proteasominhibitors Bortezomib (Selleckchem, o. J.)	17
Tabelle 8: Beispiel einer Verdünnungsreihe für Bortezomib im alamarBlue Assay	18
Tabelle 9: Zusammensetzung der PI-Färbelösung	20
Tabelle 10: Beispielhafte Belegung einer 96-well-Platte im alamarBlue Assay	23
Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Zellzahlen je Zelllinie und Bortezomibkonzentration im Colony Formation Assay nach alleiniger Behandlung mit Bortezomib.....	26
Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Zellzahlen je Zelllinie und Bestrahlungs- bzw. Bortezomibkonzentration im Colony Formation Assay nach Behandlung mit Bortezomib und anschließender Bestrahlung	27
Tabelle 13: Unterschiede des Anteils an Zellen in der G ₂ M-Phase nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen für 24 Stunden zwischen den Zelllinien LN18, LN229 und U251; Bestimmung signifikanter Unterschiede mittels T-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001	31
Tabelle 14: Unterschiede der Zellviabilität nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen für 24, 48 und 72 Stunden zwischen den Zelllinien	

LN18, LN229 und U251; Bestimmung signifikanter Unterschiede mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	36
Tabelle 15: Unterschiede der Survival Fraction für verschiedene Bortezomibkonzentrationen zwischen den Zelllinien LN18, LN229 und U251; Bestimmung signifikanter Unterschiede mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	38
Tabelle 16: Unterschiede der Survival Fraction zwischen den Zelllinien LN18, LN229 und U251 nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung; Bestimmung signifikanter Unterschiede mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	39
Tabelle 17: Unterschiede der Survival Fraction nach Behandlung mit Bortezomib und Bestrahlung bei den Zelllinien LN18, LN229 und U251; Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen 10 nM und 20 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	42
Tabelle 18: Unterschiede der Survival Fraction zwischen den Zelllinien LN18, LN229 und U251 nach Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung; Bestimmung signifikanter Unterschiede mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	43
Tabelle 19: Parameter zur Charakterisierung der Radiosensitivierung durch Bortezomib bei der Zelllinie LN18, berechnet aus Daten des Colony Formation Assays; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	44
Tabelle 20: Parameter zur Charakterisierung der Radiosensitivierung durch Bortezomib bei der Zelllinie LN229, berechnet aus Daten des Colony Formation Assays; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	44
Tabelle 21: Parameter zur Charakterisierung der Radiosensitivierung durch Bortezomib bei der Zelllinie U251, berechnet aus Daten des Colony Formation Assays; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	45
Tabelle 22: Verwendete Bortezomibkonzentrationen bei Beispielen für eine Radiosensitivierung durch Bortezomib bei verschiedenen Tumorentitäten aus der Literatur	48

Tabelle 23: Vergleich der D_{50} und SER (50 %) von LN18, LN229 und U251 nach Behandlung mit 10 nM oder 20 nM Bortezomib für 24 Stunden und nachfolgender Bestrahlung	52
---	----

1 Einleitung

1.1 Das Glioblastom

1.1.1 Epidemiologie und Prognose

Das Glioblastom ist der häufigste maligne primäre Hirntumor bei Erwachsenen (Stupp et al., 2005). Als typische Symptome gelten unter anderem Kopfschmerzen, fokale neurologische Defizite, epileptische Anfälle (Davis, 2016) oder Wesensveränderungen (Wick, 2021). Glioblastome finden sich meist frontal, parietotemporal oder occipital in supratentoriellen Regionen (Davis, 2016). Das mittlere Alter bei Diagnose liegt bei 64 Jahren (Davis, 2016). Nach Diagnosestellung beträgt das mittlere Überleben weniger als 15 Monate (Davis, 2016). Zwei-Jahres-Überlebensraten liegen bei 27 % (Stupp et al., 2005) und bei weniger als 5 % nach fünf Jahren (Davis, 2016). Die Inzidenzrate liegt zwischen 0,59 und 3,69 pro hunderttausend Personen pro Jahr (Ostrom et al., 2014). Insgesamt sind Männer und Weiße häufiger betroffen (Urbanska, Sokolowska, Szmidt, & Sysa, 2014). Glioblastome treten in der Regel sporadisch ohne bekannte genetische Prädisposition auf, werden allerdings häufiger bei hereditären Tumorsyndromen wie dem Li-Fraumeni-Syndrom beobachtet (Ostrom et al., 2014; Thakkar et al., 2014). Als weitere Risikofaktoren gelten frühere Bestrahlung oder immunologische Faktoren (Thakkar et al., 2014). Prognostisch relevant sind das Ausmaß der Resektion, Tumorlokalisation und -größe, Alter und Komorbiditäten des Patienten sowie Allgemeinzustand und neurologischer Status (Thakkar et al., 2014).

1.1.2 Klassifikation

Nach Einteilung der WHO zählt das Glioblastom zu den Grad 4 Astrozytomen (Thakkar et al., 2014). Histologisch zeigen sich eine palisadenartige Anordnung von Tumorzellen und nekrotische Areale (Davis, 2016). Anhand charakteristischer genetischer Veränderungen und des molekularen Profils können vier Subtypen unterschieden werden: klassischer, proneuraler, neuraler und mesenchymaler Typ (Ostrom et al., 2014). In der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems von 2016 werden neben histologischen Merkmalen erstmals auch molekulare Marker einbezogen (Louis et al., 2016). Im Jahr 2021 erscheint die fünfte Auflage der WHO-Klassifikation, in die

Empfehlungen des internationalen Konsortiums cIMPACT-NOW (Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy - not officially WHO) einfließen (Weller, Knobbe-Thomsen, Le Rhun, & Reifenberger, 2022). Eine Neuerung ist die Unterscheidung zwischen diffusen Gliomen im Erwachsenenalter (adult-type diffuse gliomas) und den selteneren diffusen Gliomen des Kindesalters (pediatric-type diffuse gliomas). In der Gruppe der diffusen Gliome im Erwachsenenalter werden drei wesentliche Typen unterschieden: Astrozytom, IDH-mutiert; Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert und Glioblastom, IDH-Wildtyp. Zudem erfolgt eine Graduierung innerhalb der einzelnen Tumortypen wie in Tabelle 1 dargestellt. Ebenfalls aufgeführt werden für die verschiedenen Tumortypen charakteristische genetische und molekulare Veränderungen.

Tumortyp	ZNS-WHO-Grad	Typische genetische und molekulare Veränderungen
Astrozytom, IDH-mutiert	2, 3 oder 4	IDH-1-/ IDH-2-Mutation ATRX-Mutation Homozygote Deletion CDKN2A/B TP53-Mutation
Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/ 19q-kodeletiert	2 oder 3	IDH-1-/ IDH-2-Mutation 1p/ 19q-Kodeletion TERT-Promotor-Mutation
Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	IDH-1-/ IDH-2-Wildtyp TERT-Promotor-Mutation EGFR-Amplifikation Kopienzahlveränderung +7/ -10 MGMT-Promotormethylierung

Tabelle 1: Einteilung der diffusen Gliome im Erwachsenenalter anhand der WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS von 2021 (Louis et al., 2021; Weller et al., 2022)

Die Diagnose eines IDH-mutierten Astrozytoms ZNS-WHO-Grad 4 ist nun auch ohne histologische Veränderungen wie Gefäßproliferationen und/ oder Nekrosen möglich, wenn eine homozygote CDKN2A/B-Deletion nachgewiesen werden kann (Weller et al., 2022).

IDH-Wildtyp-Astrozytome, bei denen eine Mutation des TERT-Promotors, eine EGFR-Amplifikation oder eine +7/ -10-Kopienzahlveränderung vorliegt, werden

aufgrund der vergleichbar schlechten Prognose ebenfalls zu den IDH-Wildtyp-Glioblastomen ZNS-WHO-Grad 4 gezählt (Weller et al., 2022). Für das Glioblastom typische histologische Veränderungen wie Nekrosen und Gefäßveränderungen sind für die Zuordnung nicht erforderlich.

Typische genetische Veränderungen beim Glioblastom sind ein Gewinn von Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10 (+7/ -10), eine EGFR-Amplifikation, Veränderungen im p53-Signalweg sowie PTEN- und TERT-Promotor-Mutationen (Gritsch, Batchelor, & Gonzalez Castro, 2022).

1.1.3 Tumorentstehung

Die Tumorentstehung beruht auf einer Ansammlung erworbener somatischer Mutationen, beispielsweise in TP53, PTEN, RB oder IDH-1 (Ostrom et al., 2014). Beim Glioblastom kommt es aber zu zahlreichen komplexen genetischen und molekularen Veränderungen, die Einfluss auf verschiedene Signalwege haben. Beispielhaft zu nennen sind hier Rezeptortyrosinkinasen wie der epidermal growth factor receptor (EGFR), die Proliferation, Migration, Zelldifferenzierung und -überleben beeinflussen (Thakkar et al., 2014). Resultat sind eine genetische Instabilität und Heterogenität, sowohl innerhalb des Tumors als auch zwischen den Patienten (Ohgaki & Kleihues, 2013). Klinisch relevant sind aktuell EGFR- und IDH-Mutationen sowie die MGMT-Promotormethylierung (Saadeh, Mahfouz, & Assi, 2018; Thakkar et al., 2014). EGFR-Mutationen sind prädiktive Biomarker für ein Ansprechen auf zielgerichtete Therapien gegen den EGF-Rezeptor, beispielsweise mit Erlotinib (Saadeh et al., 2018). Insgesamt sind sie aber prognostisch ungünstig und gehen mit einer hohen Malignität einher (Saadeh et al., 2018). IDH-mutierte Gliome weisen eine Punktmutation im Isocitratdehydrogenase-1- oder -2-Gen auf. Es entstehen Onkometabolite, welche die Methylierung von CpG-Inseln stimulieren (Han et al., 2020; Thakkar et al., 2014). Im Vergleich zu IDH-Wildtyp Gliomen weisen IDH-mutierte Gliome eine bessere Prognose auf (Gritsch et al., 2022). Der MGMT-Status ist prädiktiv für ein Ansprechen auf Chemotherapie mit Alkylantien, wie zum Beispiel Temozolomid (TMZ) (Thakkar et al., 2014).

In Zusammenhang mit der genetischen Heterogenität von Glioblastomen stehen Tumor-initiiierende Zellen, sogenannte Tumorstammzellen, aktuell im Fokus der Wissenschaft (Singh et al., 2003). Dabei handelt es sich um größtenteils CD133

positive Zellen, welche in vivo Tumoren induzieren können. Diese Theorie geht davon aus, dass Tumore Zellen verschiedener Differenzierungsstufen enthalten. Tumorwachstum und -progress gehen insbesondere von den Tumorstammzellen aus. Diese sind somit Grund für Rezidive und Therapieresistenz.

Glioblastome sind charakterisiert durch schnelles und infiltratives Wachstum in gesundes Hirngewebe, welches eine vollständige Resektion unmöglich macht und für Rezidive prädisponiert (Davis, 2016; Urbanska et al., 2014). Invasion und Migration sind komplexe Vorgänge, die sowohl durch zelleigene Faktoren als auch durch die Umgebung der Zellen beeinflusst werden (Iwadata, 2016). Eine wichtige Rolle hierbei spielt unter anderem die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT). Epitheliale Zellen entwickeln einen mesenchymalen Phänotyp und somit stammzellartige Fähigkeiten. Involviert sind beispielsweise Wnt, NOTCH oder TGF- β . Typische Merkmale des Glioblastoms sind darüber hinaus eine ausgeprägte Mikrovaskularisation und zentrale Nekrose (Urbanska et al., 2014). Sauerstoffmangel der umliegenden Tumorzellen führt über HIF-1 und VEGF zu Angiogenese. Hypoxie-induzierte Migration und Autophagie fördern zudem Zellüberleben und Aggressivität (Reardon et al., 2011).

Obwohl es sich beim Glioblastom um einen ZNS-WHO-Grad 4 Tumor handelt, treten extrakranielle Metastasen in lediglich 0,4 % bis 2 % der Fälle auf (Liu et al., 2020). Daher erlangt das Tumor-Microenvironment wachsende Bedeutung für das Verständnis der Aggressivität von Glioblastomen und gilt als zukünftiger Angriffspunkt für neue Therapieansätze, beispielsweise auf antiangiogenetischer oder immunologischer Ebene.

1.1.4 Therapie

Die Standardtherapie des Glioblastoms beruht auf drei Säulen: Chirurgie, Radio- und Chemotherapie (Stupp et al., 2005). Primäre Ziele der Operation sind eine maximal sichere Resektion und die Gewinnung von Gewebe für eine pathologische Untersuchung (Wilson, Karajannis, & Harter, 2014). Zudem werden durch die Zytoreduktion und Dekompression die Lebensqualität sowie die Bedingungen für anschließende Therapien verbessert. Aufgrund der Invasivität des Tumors ist eine radikale Resektion nicht kurativ. Dennoch ist das Ausmaß der Resektion für das Gesamtüberleben prognostisch relevant (Thakkar et al., 2014). Anschließend erfolgt eine Radiochemotherapie mit Temozolomid

(Stupp et al., 2005). TMZ wird dabei in einer Dosis von 75 mg/ m² pro Tag für sechs Wochen verabreicht. Die Bestrahlung (external beam) erfolgt mit 60 Gy in 30 Fraktionen zu je 2 Gy. Sechs Zyklen Temozolomid folgen als Erhaltungskemotherapie. 150 – 200 mg/ m²/ d werden dabei an den ersten fünf Tagen eines 28-Tage-Zyklus verabreicht.

Promotorhypermethylierung der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist ein prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf eine Therapie mit alkylierenden Substanzen wie Temozolomid und bei circa 50 % aller Glioblastome zu finden (Thakkar et al., 2014; Wilson et al., 2014). Hypermethylierung des Promotors des MGMT-Gens senkt dessen Expression. Folglich kommt es zu einer Abnahme des kodierten DNA-Reparaturenzyms und DNA-Schäden, zum Beispiel durch Alkylantien, können nicht mehr repariert werden.

Die ausgeprägte Vaskularisierung von Glioblastomen spricht zudem für eine antiangiogenetische Therapie (Wilson et al., 2014). Der monoklonale Antikörper Bevacizumab bindet freies VEGF-A und verhindert dessen Interaktion mit dem VEGF-Rezeptor. Dadurch werden endotheliale Proliferation und Gefäßwachstum vermindert. Das Medikament erhöht allerdings lediglich das progressionsfreie Überleben, das Gesamtüberleben bleibt unbeeinflusst.

Neu in die NCCN-Leitlinien (National Comprehensive Cancer Network) aufgenommen wurde die Behandlung mit alternierenden elektrischen Feldern, den sogenannten Tumor-Treating-Fields (TTFields) (Stupp et al., 2012).

Tumorprogress oder Rezidive treten bei nahezu allen Glioblastompatienten im Verlauf der Erkrankung auf. Therapiestandards hierfür gibt es aufgrund der Heterogenität dieses Tumors und des relativ kleinen Patientenkollektivs kaum (Davis, 2016; Wilson et al., 2014). Trotz multidisziplinärer Therapie hat sich das Outcome der Patienten in den letzten Jahren nicht wesentlich verbessert. Daher ist es dringend erforderlich, biologische, genetische bzw. epigenetische und molekulare Vorgänge besser zu verstehen, um neue Therapieoptionen zu schaffen.

1.2 Der Proteasominhibitor Bortezomib

Bortezomib (Velcade ®) wurde 2003 als erster Vertreter der Proteasominhibitoren durch die FDA zur Therapie des multiplen Myeloms und später auch zur Therapie des Mantelzelllymphoms zugelassen (Robak & Robak, 2019). Neben Erfolgen bei der Behandlung hämatologischer Neoplasien gibt es zumindest in präklinischen Studien erfolgsversprechende Daten zur Anwendung bei soliden Tumoren (Manasanch & Orlowski, 2017).

1.2.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Proteasomen sind ubiquitär in Zellen vorkommende Enzymkomplexe, die am kontrollierten Abbau zelleigener Proteine beteiligt sind (Accardi et al., 2015). Somit regulieren sie durch die Beeinflussung zahlreicher Signalwege verschiedenste Zellfunktionen wie Wachstum, Apoptose, Zellzyklus oder Angiogenese. Ubiquitin-markierte Proteine werden vom Proteasom gebunden und proteolytisch gespalten. Das 26S-Proteasom ist ein ATP-abhängiger Proteasekomplex, bestehend aus einer 20S-Untereinheit mit unspezifischer Peptidaseaktivität und zwei 19S-Untereinheiten, die Ubiquitin zur Wiederverwertung abspalten.

In welchem Ausmaß Zellen auf Proteasominhibitoren reagieren, hängt mit dem Ungleichgewicht zwischen der Menge abzubauender Proteine und der Abbaukapazität der Proteasomen zusammen (Manasanch & Orlowski, 2017). Eine Dysregulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems kann sowohl zum gesteigerten als auch zum verminderten Abbau von Proteinen führen, die an verschiedenen Signalwegen beteiligt sind. Plasmazellen, insbesondere maligne Myelomzellen reagieren sehr sensibel auf eine Hemmung ihrer Proteasomaktivität. Einer der Gründe hierfür ist die konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der Zellüberleben fördert und mit für Chemo- und Radioresistenz verantwortlich ist. Die Inhibition von NF- κ B durch Bortezomib ist in Abbildung 1 dargestellt.

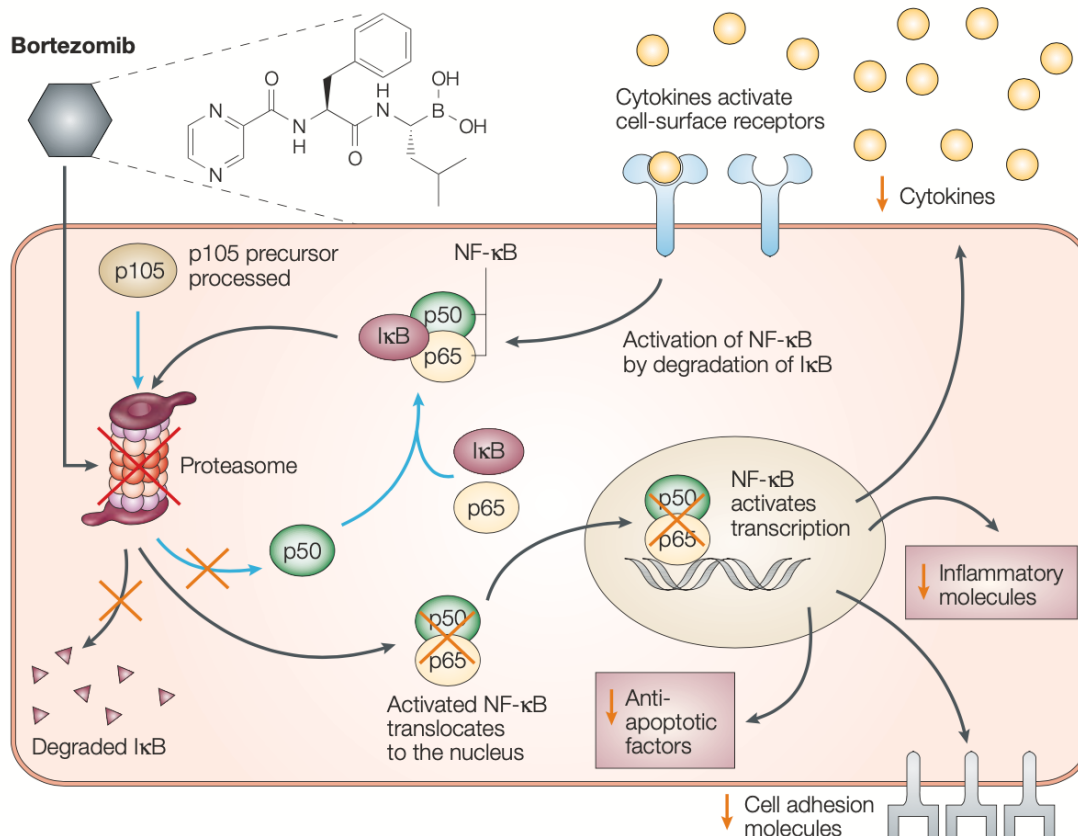


Abbildung 1: Inhibition des Transkriptionsfaktors NF-κB durch den Proteasominhibitor Bortezomib (Paramore & Frantz, 2003)

Gebunden an seinen Inhibitor IκB befindet sich NF-κB inaktiv im Zytoplasma (Manasanch & Orlowski, 2017). Durch verschiedene Trigger kommt es zu einer Phosphorylierung und Ubiquitinierung von IκB und folglich zu dessen Abbau im Proteasom. NF-κB transloziert in den Nukleus und bindet dort an Promotorregionen verschiedener Gene, die zum Beispiel an der Transkription wachstumsfördernder, antiapoptotischer oder angiogenetischer Faktoren beteiligt sind. Eine Hemmung des Proteasoms hemmt somit die Aktivität von NF-κB.

1.2.2 Wirkung von Bortezomib

Bortezomib hemmt das 26S-Proteasom hochselektiv und reversibel (Dou & Zonder, 2014). Verantwortlich für die reversible Bindung des Proteasominhibitors an die katalytische 20S-Untereinheit ist seine Boronsäurestruktur. Bortezomib kann sowohl intravenös als auch subkutan verabreicht werden. Häufig beschriebene Nebenwirkungen sind Neuropathien, Thrombozytopenie, Neutropenie, Übelkeit, Diarrhö, Fatigue oder Infektionen wie Herpes zoster

(Manasanch & Orlowski, 2017). Über die Beeinflussung diverser Signalwege kommt es zu einer Regulationsstörung zahlreicher Zellfunktionen. Der genaue Wirkmechanismus ist allerdings bis heute nicht vollständig geklärt. Wichtige Endpunkte sind insbesondere die Induktion von Apoptose sowie eine Steigerung der Radio- und Chemosensitivität (Paramore & Frantz, 2003). Anders als Tumorzellen erholen sich normale Zellen innerhalb von 72 Stunden von der Proteasominhibition (Dou & Zonder, 2014). Mutationen in Genen, die Apoptose und Zellzyklus regulieren, sind häufig an der Tumorentstehung beteiligt. Eine Beeinflussung der Effekte dieser Mutationen durch Hemmung des Proteasoms liefert eine mögliche Erklärung, warum maligne Zellen sensibler auf Proteasominhibitoren reagieren (Adams, 2004). Des Weiteren sind stark proliferierende Tumorzellen vermutlich stärker auf den Abbau überflüssiger Proteine im Proteasom angewiesen (Accardi et al., 2015). Für die Radio- und Pharmakoresistenz vieler Tumorzellen spielt zudem die Proteasom-abhängige Aktivierung von NF- κ B wie im vorherigen Abschnitt beschrieben eine wichtige Rolle (Adams, 2004).

1.2.3 Radiosensitivierung durch Bortezomib

In der Literatur wird eine Steigerung der Radiosensitivität durch Bortezomib bei verschiedenen Tumorentitäten beschrieben. Cui et al. zeigen in einer in-vitro-Studie eine erhöhte Radiosensitivität bei Cervixkarzinomzellen nach Behandlung mit Bortezomib durch Hemmung der HIF-1 α -Expression (Cui et al., 2015). Weitere Beispiele sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Autor	Tumorentität	Durchführung	Wirkstoff	Wirkmechanismus
(Cui et al., 2015)	Cervixkarzinom Zelllinien: HeLa, SiHa	In vitro	Bortezomib	Hemmung HIF-1 α -Expression
(Kamer, Ren, & Dicker, 2009)	Cervixkarzinom Zelllinien: HeLa, SiHa Radiosensitivierung nur in SiHa-Zellen	In vitro	Bortezomib	Hemmung NF- κ B-Signalweg
(Cao et al., 2008)	Prostatakarzinom Zelllinie: PC-3-Bcl-2	In vitro	Bortezomib + Docetaxel	Downregulation Bcl-2-Expression
(Goktas et al., 2010)	Prostatakarzinom Zelllinie: DU145	In vitro	Bortezomib	Hemmung Bcl-2, Induktion von Caspase-3-Genen

(Wu et al., 2018)	Orales Plattenepithelkarzinom (OSCC) Zelllinien: SCC-9, SAS, SCC25	In vitro In vivo	Bortezomib	Hemmung TRAF6-NF- κ B-Aktivierung, Downregulation TRAF6-Akt-Signalweg
(Tamatani et al., 2013)	Orales Plattenepithelkarzinom (OSCC) Zelllinien: B88, BHY, HNt	In vitro In vivo	Bortezomib	Hemmung NF- κ B-Signalweg
(Weber, Cerniglia, Maity, & Gupta, 2007)	Kopf-Hals-Tumore (HNC) Zelllinie: SQ20B	In vitro	Bortezomib	Downregulation PI3K-Akt-Signalweg
(D. Wang, Qin, Jiang, & Wang, 2016)	Plattenepithelkarzinom Ösophagus (ESCC) Zelllinien: Eca109, TE-13	In vitro In vivo	Bortezomib	Verminderte Expression von HIF-1 α und VEGF, Induktion von Apoptose, verzögerte DNA-Reparatur
(Lioni et al., 2008)	Plattenepithelkarzinom Ösophagus (ESCC) Zelllinien: TE-1, -3, -8, -10, -11, -12	In vitro	Bortezomib	P38-MAP-Kinase-abhängige Apoptose
(Russo et al., 2001)	Kolorektales Karzinom Zelllinie: LOVO	In vitro In vivo	Bortezomib	Hemmung NF- κ B-Aktivierung
(Rae, Tesson, Babich, Boyd, & Mairs, 2013)	Neuroblastom Zelllinien: SK-N-BE(2c), UVW/NAT	In vitro	Bortezomib	ROS-abhängige klonogene Zytotoxizität

Tabelle 2: Beispiele aus der Literatur für eine Radiosensitivierung verschiedener Tumorentitäten durch Bortezomib

In der vorangehenden Tabelle werden Beispiele für die Mechanismen der Radiosensitivierung durch Bortezomib bei verschiedenen Tumorentitäten aufgeführt. Diese verdeutlichen erneut die komplexe Wirkungsweise von Proteasominhibitoren. Charakteristisch für das Glioblastom ist seine genetische Heterogenität und Instabilität. Es erscheint somit aus biologischer Sicht vielversprechend, ein Medikament, das diverse Signalwege beeinflusst, zu

untersuchen und erklärt, warum Glioblastomzellen für die nachfolgenden Versuche ausgewählt wurden.

1.3 Radiotherapie

Neben operativer und systemischer Therapie zählt die Strahlentherapie zu den drei großen Bereichen der Behandlung maligner Tumorerkrankungen (Maier, Hartmann, Wenz, & Herskind, 2016). Die Kombination aus Radio- und Chemotherapie kann zudem die Strahlensensitivität von Tumorzellen erhöhen. Grundprinzip ist der Einsatz von ionisierender Strahlung zur Schädigung der DNA und Hemmung der Zellteilung (Schulz, Meyer, Dubrovskaja, & Borgmann, 2019).

1.3.1 Ionisierende Strahlung

Ionisierende Strahlung besitzt genug Energie, um Elektronen aus Atomen oder Molekülen zu entfernen (Hall & Giaccia, 2012c). Dafür wird eine Energie von mindestens 5 eV benötigt. Üblich ist eine Einteilung in elektromagnetische und Teilchenstrahlung. Die in den nachfolgenden Experimenten eingesetzte Röntgenstrahlung zählt wie die Gammastrahlung zur elektromagnetischen Strahlung und kann auch als Photonenstrahlung betrachtet werden. Zur Teilchenstrahlung gehören Elektronen, Protonen, Alphapartikel, Neutronen oder schwere geladene Teilchen. Des Weiteren kann, wie in Abbildung 2 dargestellt,

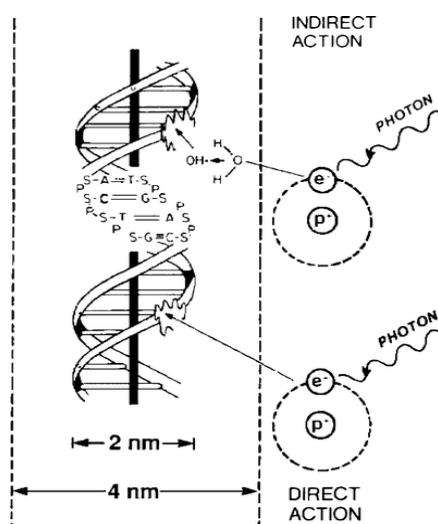


Abbildung 2: Direkte und indirekte Wirkung von ionisierender Strahlung (Hall & Giaccia, 2012c)

Hydroxylradikale verursacht.

zwischen direkten und indirekten Schäden durch ionisierende Strahlung unterschieden werden. Entscheidend für die biologischen Auswirkungen von Strahlung ist eine Schädigung der DNA. Strahlen mit hohem linearen Energietransfer (LET) wie Neutronen oder Alphapartikel können die DNA direkt schädigen. Darüber hinaus können über die Bildung freier Radikale indirekte Strahlenschäden erzeugt werden. Über zwei Drittel der DNA-Schäden durch Röntgenstrahlen werden indirekt durch

1.3.2 DNA-Schäden und Reparaturmechanismen

Wie zuvor beschrieben nimmt die Veränderung der DNA eine Schlüsselrolle in der schädigenden Wirkung ionisierender Strahlung ein. Die DNA-Doppelhelix besteht aus zwei gegenläufigen komplementären Strängen aus den vier Basen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin (Hall & Giaccia, 2012b). Durch Bestrahlung kann diese Struktur auf verschiedene Arten geschädigt werden. Es entstehen Basenschäden, DNA-Protein-Crosslinks, Einzel- oder Doppelstrangbrüche. Einzelstrangbrüche oder weit voneinander entfernte Doppelstrangbrüche können in der Regel einfach repariert werden. Der Gegenstrang dient dabei als Vorlage. Doppelstrangbrüche in gegenüber- oder dicht aneinander liegenden Bereichen können dahingegen zu Chromosomenaberrationen führen, welche die Zellteilung stören und folglich häufiger zum Zelltod führen. Zellen besitzen allerdings verschiedene Mechanismen, Fehler in der DNA zu reparieren. Bei der Basen- oder Nukleotidexzisionsreparatur werden fehlerhafte Basen oder Nukleotide entfernt. Die Mismatch-Reparatur behebt Fehlpaarungen von Basen. Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen kann entweder als homologe Rekombination (HR) oder als nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) erfolgen. Bei der homologen Rekombination erfolgt die Reparatur durch Austausch von homologen Abschnitten zwischen zwei DNA-Molekülen (Schwesterchromatiden). Sie findet vor allem in der späten S-Phase oder in der G₂-Phase statt. Da der Fehler anhand des komplementären Strangs behoben werden kann, ist die Reparatur meist fehlerfrei. Die nicht-homologe Endverknüpfung, bei der zwei DNA-Fragmentenden verknüpft werden, findet in der G₁-Phase statt. Da zu dieser Zellzyklusphase kein unbeschädigtes Schwesterchromatid vorliegt, ist dieser Reparaturmechanismus fehleranfällig. Die zuvor genannten Strangbrüche können bei fehlerhafter Reparatur zu Chromosomen- und Chromatidabberationen führen.

1.3.3 Radiosensitivität

Defekte in DNA-Reparaturgenen wie dem XRCC7-Gen können mit erhöhter Radiosensitivität einhergehen (Hall & Giaccia, 2012a). Auch Patienten mit Syndromen wie der Ataxia teleangiectasia weisen eine gesteigerte Radiosensitivität auf (Maier et al., 2016). Zudem wurde beobachtet, dass Tumorstammzellen eine gewisse Strahlenresistenz aufweisen. Vermutet wird ein

Zusammenhang mit der zelleigenen Fähigkeit Radikale zu eliminieren (Rycaj & Tang, 2014). Auch Mutationen durch Radio- oder Chemotherapie können zu einer zunehmenden Resistenz gegenüber der Bestrahlung führen und deren Erfolg mindern.

Sich teilende Zellen durchlaufen im Zellzyklus eine periodische Abfolge von Ereignissen, nämlich Mitose- (M) und Interphase (I) (Hall & Giaccia, 2012d). Die Interphase wird unterteilt in G_1 -, Synthese- (S) und G_2 -Phase. Die Dauer dieser Vorgänge hängt vom Zelltyp ab und die Länge variiert besonders in der G_1 -Phase. An der Regulation sind Cyclin-abhängige Kinasen beteiligt. In der M-Phase findet die Zellteilung statt. In der G_1 -Phase werden Proteine und Zellorganellen gebildet, die im Verlauf für die Zellteilung benötigt werden. Die S-Phase wird von der DNA-Synthese dominiert. Die G_2 -Phase dient schließlich der Reparatur von Replikationsfehlern. Das Zellüberleben nach Bestrahlung ist je

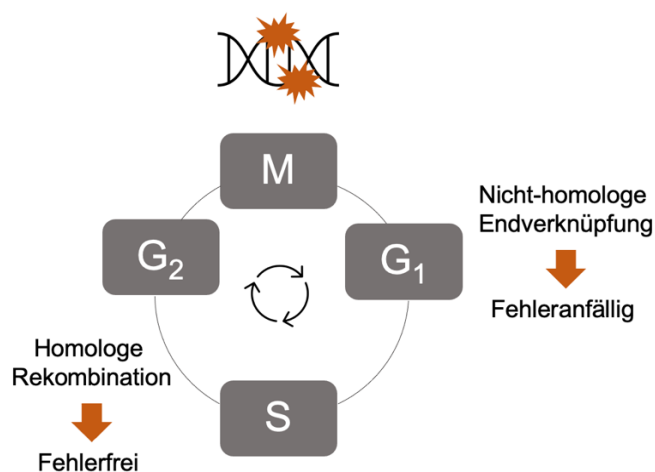


Abbildung 3: Überblick über die vorherrschenden Formen der DNA-Reparatur und deren Fehleranfälligkeit in verschiedenen Zellzyklusphasen (Hall & Giaccia, 2012b)

nach Zellzyklusphase verschieden. Die höchste Sensitivität weisen Zellen in der G_2 M-Phase auf, also während und kurz vor der Mitose. Besonders resistent gegenüber Bestrahlung sind Zellen in der späten S-Phase. Verantwortlich hierfür scheint die in dieser Phase vorherrschende Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination zu

sein. Am Ende der S-Phase liegt bereits ein komplementärer DNA-Strang vor. Somit ist die Reparatur im Gegensatz zur nicht-homologen Endverknüpfung, wie bereits oben beschrieben, nicht fehlerbehaftet.

Diese Beobachtungen geben Hinweis auf einen möglichen therapeutischen Nutzen. Ein Arrest von Tumorzellen in der G_2 M-Phase, zum Beispiel durch Proteasominhibitoren, würde Zellen sensibler für Bestrahlung machen und somit die Effektivität derselben erhöhen.

2 Zielsetzung

Radiotherapie bildet eine der drei Hauptsäulen in der Therapie des Glioblastoms (Stupp et al., 2005). Die Entwicklung einer Resistenz gegenüber der Bestrahlung stellt einen Grund für die weiterhin infauste Prognose dieser Erkrankung dar (Nguyen, Shabani, Awad, Kaushal, & Doan, 2018).

In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem Proteasominhibitor Bortezomib und einer Bestrahlung mit niederenergetischer Röntgenstrahlung (niedriger LET) an Glioblastomzellen untersucht. Ziel war es, potenzielle additive oder supraadditive Effekte zu analysieren. Dazu wurden drei humane Glioblastomzelllinien zunächst mit Bortezomib behandelt und anschließend mit 200-kV-Röntgenstrahlung bestrahlt. Zur quantitativen Bestimmung des Zellüberlebens kam der Koloniebildungstest zum Einsatz, der als Goldstandard zur Messung des klonogenen Zellüberlebens gilt. Dieser Test erlaubt Rückschlüsse auf die intrinsische Strahlenempfindlichkeit der Zellen.

In der Literatur (vgl. Tabelle 2) wird ein Arrest von Zellen in der G₂M-Phase des Zellzyklus durch Bortezomib beschrieben (Vlachostergios, Voutsadakis, & Papandreou, 2012). Zellen in dieser Phase weisen die höchste Radiosensitivität auf (Hall & Giaccia, 2012d). Deshalb wurde die Analyse der Zellzyklusphasen von Glioblastomzellen nach Behandlung mit Bortezomib als weiterer Endpunkt der nachfolgenden Untersuchungen gewählt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

In den nachfolgenden Tabellen werden verwendete Materialien, Geräte und Programme aufgeführt.

Material	Hersteller
12-well-Platten	Sigma-Aldrich
96-well-Platten	TPP Techno Plastic Products AG
alamarBlue Cell Viability Reagent	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Bortezomib (PS-341)	Selleck Chemicals
CellStar serologische Pipetten	Greiner Bio-One International GmbH
CellStar Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One International GmbH
CellStar Zellkulturschalen	Greiner Bio-One International GmbH
CellStar-Röhrchen	Greiner Bio-One International GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DNase-freie RNase-A	Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – high glucose, D5671	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D8537 (PBS)	Sigma-Aldrich
Eppendorf Research plus Pipetten	Eppendorf AG
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG
Ethanol	Carl Roth GmbH
FACS-Röhrchen	Sarstedt AG & Co
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
Kristallviolett	Apotheke TUM Klinikum rechts der Isar
Methanol	Carl Roth GmbH
Penicillin/ Streptomycin	Sigma-Aldrich
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co
Propidium Iodid (PI)	Sigma-Aldrich

RPMI-1640 Medium, R8758	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin – EDTA Solution, T4299	Sigma-Aldrich
Zählkammer C-Chip	Carl Roth GmbH

Tabelle 3: Auflistung verwendeter Materialien

Gerät	Modell	Hersteller
Bestrahlungsgerät	RS225A Gulmay	Gulmay Medical Ltd.
CO₂-Inkubator	Thermo Scientific BBD 6220	Fisher Scientific GmbH
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Biosciences
GelCount	GelCount	Oxford Optronix
Mikroskop	ZEISS Primovert	Carl Zeiss GmbH
Photospektrometer	BioTek EL808	BIO-TEK Instruments
Pipettierhilfe	Corning Stripettor Plus	Corning Incorporated
Sicherheitswerkbank	Maxisafe 2020	Unity Lab Services
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	TB1 Thermoblock	Biometra GmbH
Zentrifuge	Mega Star 3.0 R	VWR

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Geräte

Programm	Entwickler
GraphPad Prism	GraphPad Software
Microsoft Excel	Microsoft Corporation
ModFit LT	Verity Software House

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Programme

3.1.1 Zelllinien

Die Durchführung aller Experimente erfolgte mit drei etablierten humanen Glioblastomzelllinien, die durch das Universitätsklinikum Heidelberg zur Verfügung gestellt wurden. Eine detaillierte Charakterisierung der Zelllinien ist in Tabelle 6 dargestellt.

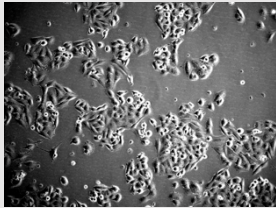
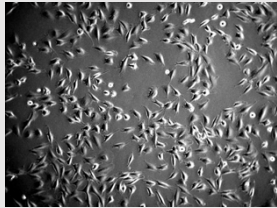
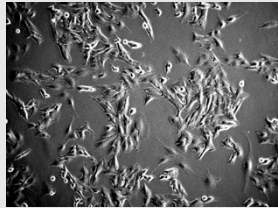
	LN18	LN229	U251 (früher U373 MG)
Organismus	Homo sapiens, männlich, 65 Jahre	Homo sapiens, weiblich, 60 Jahre	Homo sapiens, männlich
Gewebe	Grad 4 Gliom, rechter Temporallappen	Grad 4 Gliom, rechts frontotemporoparietal	Grad 4 Gliom
p53	Mutation	Mutation	Mutation
PTEN	Wildtyp	Wildtyp	Mutation
p16	Deletion	Deletion	Deletion
Morphologie	Epithelial, adhärent	Epithelial, adhärent	Epithelial, adhärent
Foto			

Tabelle 6: Charakterisierung der Glioblastomzelllinien LN18, LN229, U251

3.1.2 Bortezomib

Der Proteasominhibitor Bortezomib (PS-341) wurde von Selleck Chemicals erworben. Zur Herstellung einer Ausgangskonzentration von 10 mM wurden 5 mg pulverisiertes Bortezomib in 1,3013 ml DMSO entsprechend den Angaben des Herstellers gelöst. Aliquots zu je 20 µl wurden bei –80 °C für sechs Monate aufbewahrt und verwendet. Weitere charakteristische Merkmale von Bortezomib sind in Tabelle 7 dargestellt.

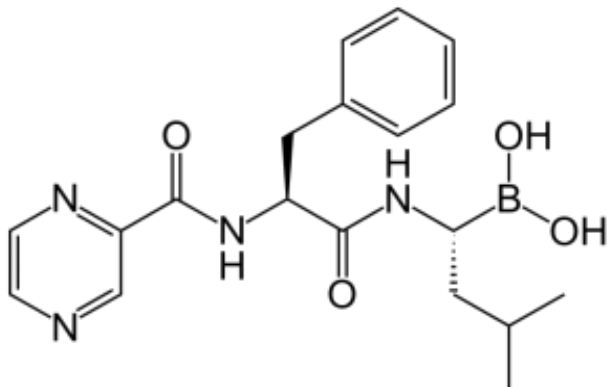
	Bortezomib (PS-341)
	Handelsname: Velcade ®
	Formel: C ₁₉ H ₂₅ BN ₄ O ₄
	Molekulargewicht: 384,24 g/mol

Tabelle 7: Charakterisierung des Proteasominhibitors Bortezomib (Selleckchem, o. J.)

In der nachfolgenden Tabelle ist beispielhaft eine Verdünnungsreihe von Bortezomib, wie sie für den alamarBlue Assay verwendet wurde, dargestellt. Bortezomib in einer Ausgangskonzentration von 10 mM wurde in mehreren Schritten in Zellkulturmedium zu einer Konzentration von 400 nM verdünnt. In einem weiteren Schritt wurden die Verdünnungen im Verhältnis 1:10 weiterverdünnt, um die Zielkonzentrationen von je 40 nM, 20 nM oder 10 nM zu erhalten. Diese wurden erreicht, indem 10 µl der jeweiligen Verdünnung zu 100 µl Medium, in dem sich die Zellen befanden, gegeben wurden.

Ausgangs-konzentration Bortezomib	10 mM = 10000 µM			
↓	1:100	10 µl Bortezomib + 990 µl Medium		
V1: Verdünnung 1	100 µM			
↓	1:100	50 µl V1 + 4950 µl Medium		
V2: Verdünnung 2	1 µM = 1000 nM			
↓	1:2½	800 µl V2 + 1200 µl Medium		
V3: Verdünnung 3	400 nM	→	1:10 10 µl V3 + 100 µl Medium	40 nM
↓	1:2	1 ml V3 + 1 ml Medium		

V4: Verdünnung 4	200 nM	→	1:10	20 nM
			10 µl V4 + 100 µl Medium	
↓	1:2	1 ml V4 + 1 ml Medium		
V5: Verdünnung 5	100 nM	→	1:10	10 nM
			10 µl V5 + 100 µl Medium	

Tabelle 8: Beispiel einer Verdünnungsreihe für Bortezomib im alamarBlue Assay

3.2 Methoden

Die Durchführung aller Experimente erfolgte im Labor der Klinik und Poliklinik für Radioonkologie und Strahlentherapie am TUM Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München. Um das Risiko einer Kontamination zu minimieren, wurden Arbeiten mit den Zellkulturen unter einer Sicherheitswerkbank Klasse 2 durchgeführt.

3.2.1 Statistische Methoden

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) bzw. Standardabweichung (SD) dargestellt. Um signifikante Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten zu bestimmen, wurde der T-Test angewandt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3.2.2 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in allen Versuchen mit niedrig-LET Röntgenstrahlung. Verwendet wurde das RS225A Bestrahlungsgerät Gulmay mit folgenden Einstellungen: 200 kV, 15 mA, Tischhöhe 500 mm, Filter 5. Eine Dosis von einem Gray wurde durch eine Bestrahlungsdauer von einer Minute und sieben Sekunden erreicht. Bestrahlt wurde mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gy.

3.2.3 Zellkultur

Die Kultivierung der Zelllinien LN18, LN229 und U251 erfolgte bei 37 °C, 95%iger Luftfeuchtigkeit und 5%iger CO₂-Begasung. Als Nährmedien wurden RPMI-1640 für die Zelllinien LN18 und LN229 sowie DMEM high glucose für die Zelllinie U251 verwendet. Zugewetzt wurden jeweils 10 % fetales Kälberserum (FCS) und 1 %

Penicillin/ Streptomycin. Die Subkultivierung erfolgte zweimal wöchentlich, um eine Konfluenz von 70 – 80 % aufrechtzuhalten. Das Ablösen der adhärennten Zellen erfolgte dabei mit Hilfe der Protease Trypsin.

Folgendes Vorgehen wurde sowohl zur Subkultivierung als auch zum Aussäen von Zellen für die einzelnen Versuche angewandt. Altes Medium wurde zunächst entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin zugegeben. Die Zellen wurden für drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von Nährmedium wurde die Trypsinierung gestoppt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl der Zellsuspension in 20 µl Trypanblau resuspendiert und in eine Zählkammer gefüllt. Vier Großquadrate aus je 16 Kleinquadraten wurden nach den üblichen Regeln ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde durch folgende Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Summe der vier Großquadrate}}{4} * 2 * 10^4$$

Zur Berechnung des benötigten Volumens x zur Ausplattierung einer bestimmten Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

$$x = \frac{\text{auszuplattierende Zellzahl}}{\text{berechnete Zellzahl pro ml}}$$

Das berechnete Volumen der Zellsuspension wurde dann in eine neue Zellkulturflasche gegeben und mit frischem Medium aufgefüllt. Durch Schwenken wurden die Zellen gleichmäßig verteilt und anschließend bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.4 Zellzyklusanalyse

Der Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf die Zellzyklusphasen der Glioblastomzellen wurde anhand ihres DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.2.4.1 Zellzyklusanalyse LN229 und U251

In sechs Petrischalen (6 cm Durchmesser) wurden pro Zelllinie (LN229, U251) jeweils dreihunderttausend Zellen in 3 ml Zellkulturmedium ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 ml Bortezomib zugegeben, um Konzentration von 2,5, 5, 10, 20 bzw. 40 nM zu erhalten. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen fixiert. Dabei wurde die

Zellsuspension nach Trypsinierung in Falcon Tubes überführt und für fünf Minuten bei 4 °C mit 500 G zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 250 µl kaltem PBS resuspendiert. Unter Durchmischung mittels Vortex wurden diese Zellsuspensionen tropfenweise zu 2,2 ml –20 °C kaltem 70%igem Ethanol gegeben. Nach einer Inkubation bei –20 °C für mindestens 24 Stunden wurden die Zellen gefärbt. Dafür erfolgte eine erneute Zentrifugierung bei 500 G und 4 °C für fünf Minuten. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 500 µl PI-Färbelösung (siehe Tabelle 9) resuspendiert und für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der DNA-Gehalt der Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Software ModFit (siehe Abbildung 5). Es wurde der Anteil der Zellen in der G₀G₁-, G₂M- bzw. S-Phase ermittelt. In Abbildung 4 ist der zeitliche Versuchsablauf zur Übersicht vereinfacht dargestellt. Die Experimente wurden jeweils dreimal pro Zelllinie durchgeführt.

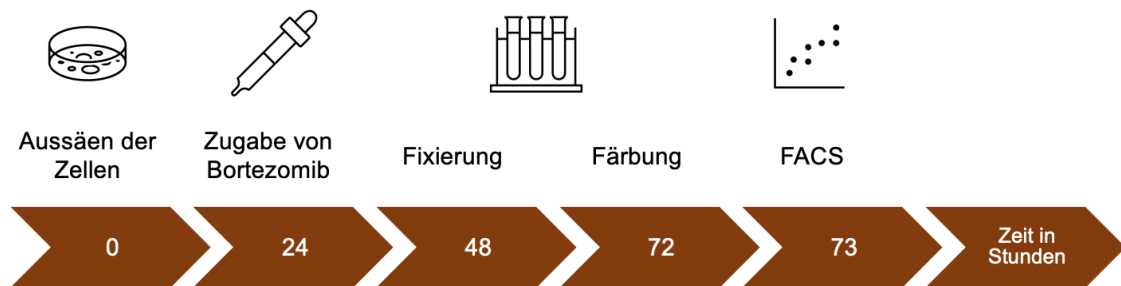


Abbildung 4: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Zellzyklusanalyse

PI-Färbelösung:	50 ml
0,1 % Triton X-100 in PBS	47,9 ml
0,2 mg/ml DNase-freie RNase-A	1,1 ml
0,02 mg/ml Propidium Iodid	1,0 ml

Tabelle 9: Zusammensetzung der PI-Färbelösung

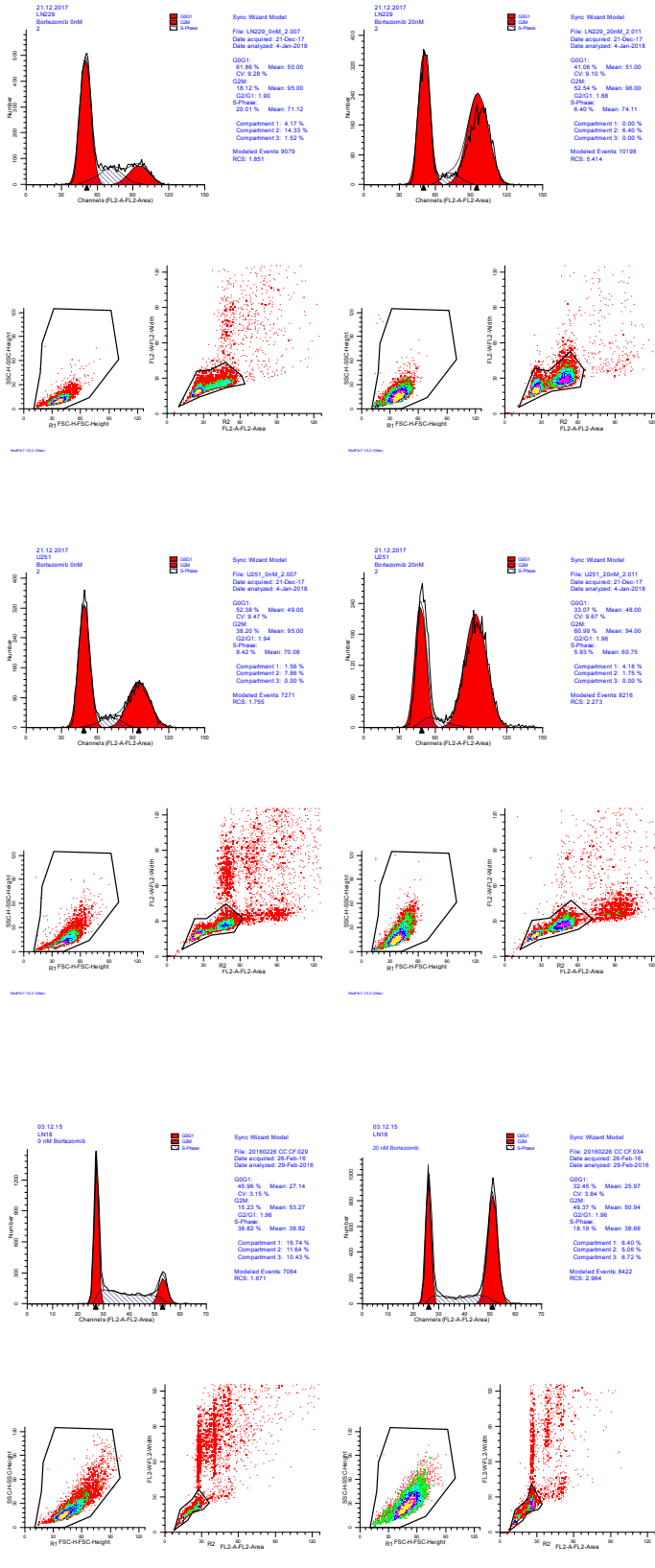


Abbildung 5: Auswertung der Zellzyklusanalyse von LN229, U251 und LN18 im Programm ModFit – Vergleich 0 nM versus 20 nM Bortezomib nach 24 Stunden

3.2.4.2 Zellzyklusanalyse LN18

Die Durchführung der Zellzyklusanalyse der Zelllinie LN18 erfolgte wie oben beschrieben. Bortezomib wurde in den Konzentrationen 2,5, 5, 10, 20 und 40 nM zugegeben. Die Messung erfolgte allerdings nicht ausschließlich 24 Stunden nach Zugabe von Bortezomib, sondern 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden danach.

3.2.5 AlamarBlue Assay

Die zytotoxische Wirkung von Bortezomib auf Glioblastomzellen wurde indirekt anhand ihrer Zellviabilität gemessen. Diese wird im alamarBlue Assay mit Hilfe von Resazurin bestimmt. Der ungiftige blaue Farbstoff wird in lebensfähigen Zellen zum rosafarbenen, stark fluoreszierenden Resorufin reduziert. Die Farb- oder Fluoreszenzveränderung kann mittels Messung der Absorption bei Wellenlängen von 570 und 630 nm detektiert werden.

Für jede Zelllinie (LN18, LN229, U251) wurden zweitausend Zellen in 100 µl Zellkulturmedium pro well in drei 96-well-Platten ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10 µl Bortezomib in Konzentrationen von 25 bis 400 nM zugegeben, um die Zieldosen von 2,5 bis 40 nM zu erhalten (siehe Tabelle 10). Zu den wells ohne Bortezomib (0 nM) wurden jeweils 10 µl Medium gegeben. Als Kontrolle wurde in einigen wells zudem DMSO entsprechend einer 40 nM Bortezomibverdünnung zugegeben. In Tabelle 10 ist eine mögliche Belegung einer 96-well-Platte dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Medium	DMSO	0 nM	2,5 nM *	5 nM *	10 nM *	20 nM *	40 nM *			
C		Medium	DMSO	0 nM	2,5 nM *	5 nM *	10 nM *	20 nM *	40 nM *			
D		Medium	DMSO	0 nM	2,5 nM *	5 nM *	10 nM *	20 nM *	40 nM *			
E												
F												
G												
H												

	100 µl PBS
	100 µl Medium
	2000 Zellen in 100 µl Medium
DMSO	Zugabe von 10 µl DMSO (400 nM)
0 nM	Zugabe von 10 µl Medium
*	Zugabe von 10 µl Bortezomib (25 – 400 nM)



Tabelle 10: Beispielhafte Belegung einer 96-well-Platte im alamarBlue Assay

Nach einer erneuten Inkubation von 24, 48 bzw. 72 Stunden bei 37 °C wurden jeweils 10 µl alamarBlue-Reagens für vier Stunden zugegeben. Die Absorption wurde mittels Photospektrometer bei Wellenlängen von 570 und 630 nm gemessen. Zur Korrektur der Wellenlänge wurden die Werte bei 630 nm von den Werten bei 570 nm abgezogen. Von diesen neuen Werten wurde wiederum der Mittelwert der Absorption des Mediums abgezogen. Aus parallelen Proben wurde der Mittelwert gebildet. Anschließend wurde die Zellviabilität für die verschiedenen Bortezomibkonzentrationen im Vergleich zu 0 nM Bortezomib berechnet. Abbildung 6 verdeutlicht den zeitlichen Versuchsablauf. Die Experimente wurden jeweils dreimal (LN18, LN229) bzw. fünfmal (U251) pro Zelllinie durchgeführt.

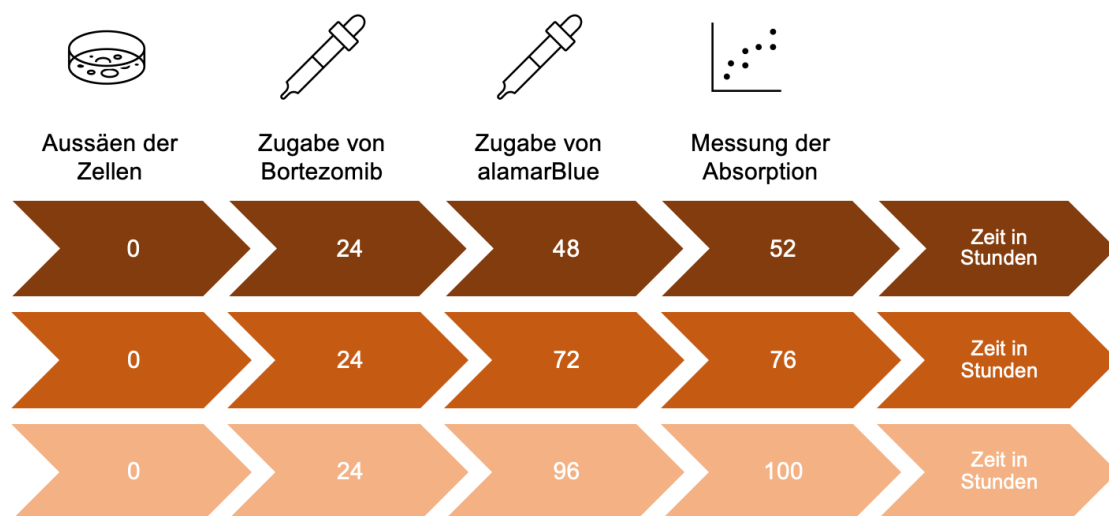


Abbildung 6: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des alamarBlue Assays

3.2.6 Colony Formation Assay

Das klonogene Überleben von Glioblastomzellen nach alleiniger Behandlung mit Bortezomib oder in Kombination mit ionisierender Strahlung wurde mittels Colony Formation Assays (CFA) bestimmt.

Die Zellen (LN18, LN229, U251) wurden in einem Milliliter Zellkulturmedium pro well in 12-well-Platten ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die jeweilige Zellzahl variierte je nach Zelllinie und Bortezomib- bzw.

Bestrahlungsdosis. Eine Übersicht der verwendeten Zellzahlen ist in den Tabellen 11 und 12 dargestellt. 500 µl Bortezomib wurden für 24 Stunden hinzugegeben. Anschließend erfolgten entweder die Bestrahlung mit nachfolgendem Mediumwechsel oder der alleinige Mediumwechsel. Dabei wurde das alte Nährmedium entfernt und 1,5 ml frisches Medium pro well zugegeben. Nach 12 Tagen Inkubation bei 37 °C wurden die Kolonien mit 1 ml eiskaltem Methanol fixiert und mit 1 ml 0,1%igem Kristallviolett gefärbt. Die Platten wurden mit Hilfe des Gelcounts eingelesen und manuell ausgezählt. Ansammlungen von mindestens 50 Zellen wurden dabei als Kolonien gezählt (vgl. Abbildung 7).



Abbildung 7: Beispiel für die Bestimmung der Anzahl an Kolonien bei der Zelllinie LN18 nach Behandlung mit 10 nM Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung mit 1 Gy

Die Survival Fraction (SF) wurde durch folgende Formel berechnet:

$$SF = \frac{\text{Anzahl gezählter Kolonien}}{\text{Anzahl ausgesäter Zellen} * \left(\frac{PE}{100}\right)}$$

Die Plating Efficiency (PE) gibt dabei den Anteil an ausgesäten Zellen an, die eine Kolonie bilden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel und GraphPad Prism.

Für die Darstellung der Überlebenskurven von LN18, LN229 und U251 nach alleiniger Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib wurde der

etablierte Fit Inhibitor vs. normalized response – variable slope von GraphPad Prism verwendet.

Die Überlebenskurven der Zelllinien LN18 und LN229 nach Bestrahlung mit niedrig-LET Röntgenstrahlung wurden an das linear-quadratische Modell angepasst (Hall & Giaccia, 2012a). Die Survival Fraction (SF) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis D wird durch folgende Formel berechnet:

$$SF(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Es werden zwei Komponenten beschrieben, die zum Zelltod durch Bestrahlung beitragen. Eine Komponente ist proportional zur Dosis (αD), die andere Komponente ist proportional zum Quadrat der Dosis (βD^2). Die Konstanten α und β variieren je nach Zelllinie und Strahlenart.

Für die Überlebenskurven der Zelllinie U251 wurde ein linearer Fit mit folgender Formel zur Berechnung der Survival Fraction (SF) gewählt:

$$SF(D) = e^{-\alpha D}$$

3.2.6.1 Colony Formation Assay Bortezomib

In Abbildung 8 ist der zeitliche Ablauf der Colony Formation Assays nach alleiniger Behandlung mit Bortezomib dargestellt. Pro Konzentration wurden jeweils 12 wells verwendet. Tabelle 11 zeigt für jede Zelllinie die Anzahl ausgesäter Zellen pro well. Der Versuche wurden dreimal pro Zelllinie wiederholt.

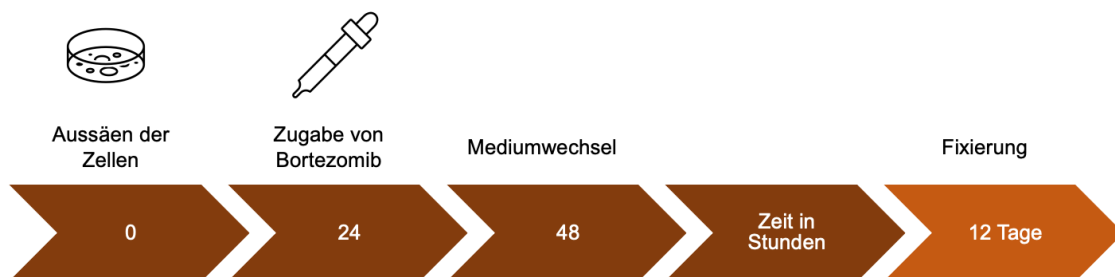


Abbildung 8: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Colony Formation Assays nach Behandlung mit Bortezomib

Bortezomib in nM	Zellzahl pro ml	Bortezomib in nM	Zellzahl pro ml
LN18, LN229		U251	
DMSO	100	DMSO	200
0	100	0	200
5	100	5	200
10	250	10	400
20	500	20	800
40	1000	40	1000

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Zellzahlen je Zelllinie und Bortezomibkonzentration im Colony Formation Assay nach alleiniger Behandlung mit Bortezomib

3.2.6.2 Colony Formation Assay Bortezomib und Bestrahlung

Der zeitliche Ablauf der Colony Formation Assays nach Bortezomibbehandlung und anschließender Bestrahlung ist in Abbildung 9 dargestellt. Pro Bestrahlungsdosis wurden vier wells für jede Bortezomibkonzentration verwendet wie beispielhaft in Abbildung 10 dargestellt. Tabelle 12 zeigt für jede Zelllinie die Anzahl ausgesäter Zellen pro well. Die Zellzahlen wurden im Verlauf teilweise angepasst. Die Versuche wurden viermal (LN18, LN229) bzw. fünfmal (U251) pro Zelllinie wiederholt.

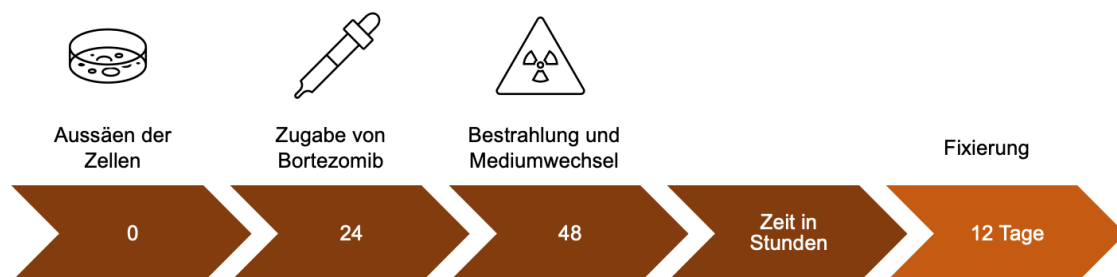


Abbildung 9: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Colony Formation Assays nach Behandlung mit Bortezomib und anschließender Bestrahlung

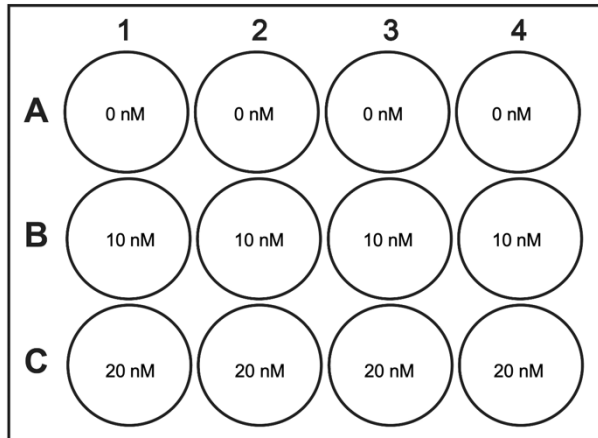


Abbildung 10: Beispielhafte Belegung einer 12-well-Platte für eine Bestrahlungsdosis im Colony Formation Assay nach Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden

Dosis in Gy	Bortezomib in nM			Dosis in Gy	Bortezomib in nM			Dosis in Gy	Bortezomib in nM		
	Zellzahl pro ml				Zellzahl pro ml				Zellzahl pro ml		
LN18				LN229				U251			
0	0	10	20	0	0	10	20	0	0	10	20
	100	200	400		100	200	400		100/ 200	200/ 400	400/ 800
1	0	10	20	1	0	10	20	1	0	10	20
	100	200	400		100	200	400		200	400	800
2	0	10	20	2	0	10	20	2	0	10	20
	250/ 200	500/ 400	1000/ 800		200	400	800		200	400	800
4	0	10	20	4	0	10	20	4	0	10	20
	500/ 400	1000/ 800	2000/ 1600		300/ 400	600/ 800	1200/ 1600		400	800	1600/ 1000
6	0	10	20	6	0	10	20	6	0	10	20
	1500/ 1000	3000/ 2000	6000/ 4000		600/ 1000	1200/ 2000	2400/ 4000		1000	2000	4000/ 3000
8	0	10	20	8	0	10	20	8	0	10	20
	3000/ 2000	6000/ 4000	12000/ 10000		1200/ 2000	2400/ 4000	4800/ 8000		2000	4000	8000

Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Zellzahlen je Zelllinie und Bestrahlungs- bzw. Bortezomibkonzentration im Colony Formation Assay nach Behandlung mit Bortezomib und anschließender Bestrahlung

4 Ergebnisse

4.1 Zellzyklusanalyse

4.1.1 Zellzyklusanalyse LN18

Die Analyse der Zellzyklusphasen erfolgte nach Behandlung mit unterschiedlichen Bortezomibkonzentrationen und anschließender Fixierung zu verschiedenen Zeitpunkten. Abbildung 11 zeigt den zeit- und konzentrationsabhängigen Einfluss von Bortezomib auf die Zellzyklusverteilung der LN18-Zelllinie. Die Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib führte zu einem Arrest der Zellen in der radiosensitiven G₂M-Phase des Zellzyklus. Der stärkste Effekt wurde nach einer 24-stündigen Behandlung mit 40 nM Bortezomib beobachtet: der Anteil der Zellen in der G₂M-Phase stieg dabei von 18 % (bei 0 nM) auf 58 %. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 nM) werden im folgenden Abschnitt detailliert dargestellt. Nach 48 Stunden Behandlung war der G₂M-Anteil bei allen Bortezomibkonzentrationen rückläufig, was auf eine zeitabhängige Dynamik des Zellzyklusarrests hinweist.

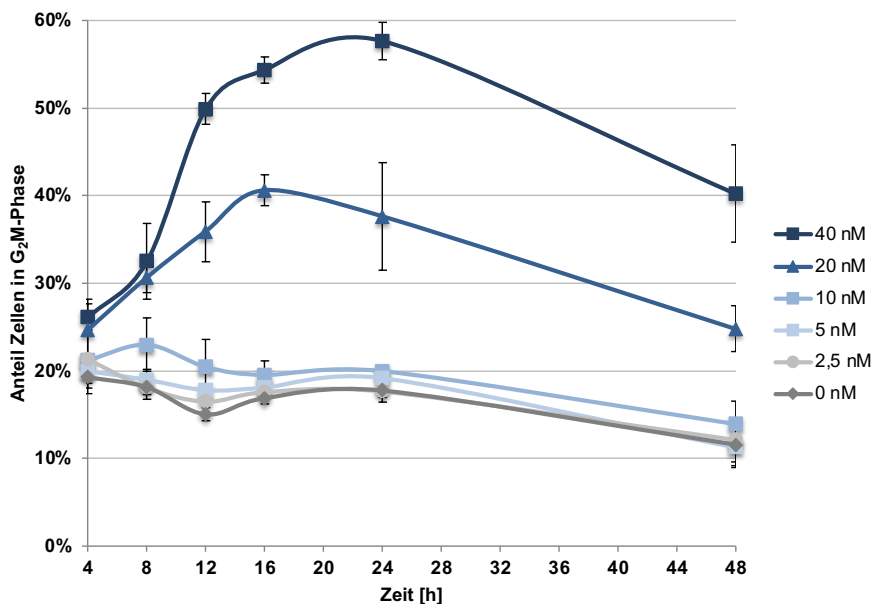


Abbildung 11: Anteil der LN18-Zellen in der G₂M-Phase im Zeitverlauf für verschiedene Bortezomibkonzentrationen; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n = 3

Die nachfolgende Abbildung zeigt den Anteil der Zellen pro Zellzyklusphase für verschiedene Bortezomibkonzentrationen nach unterschiedlichen Zeitpunkten.

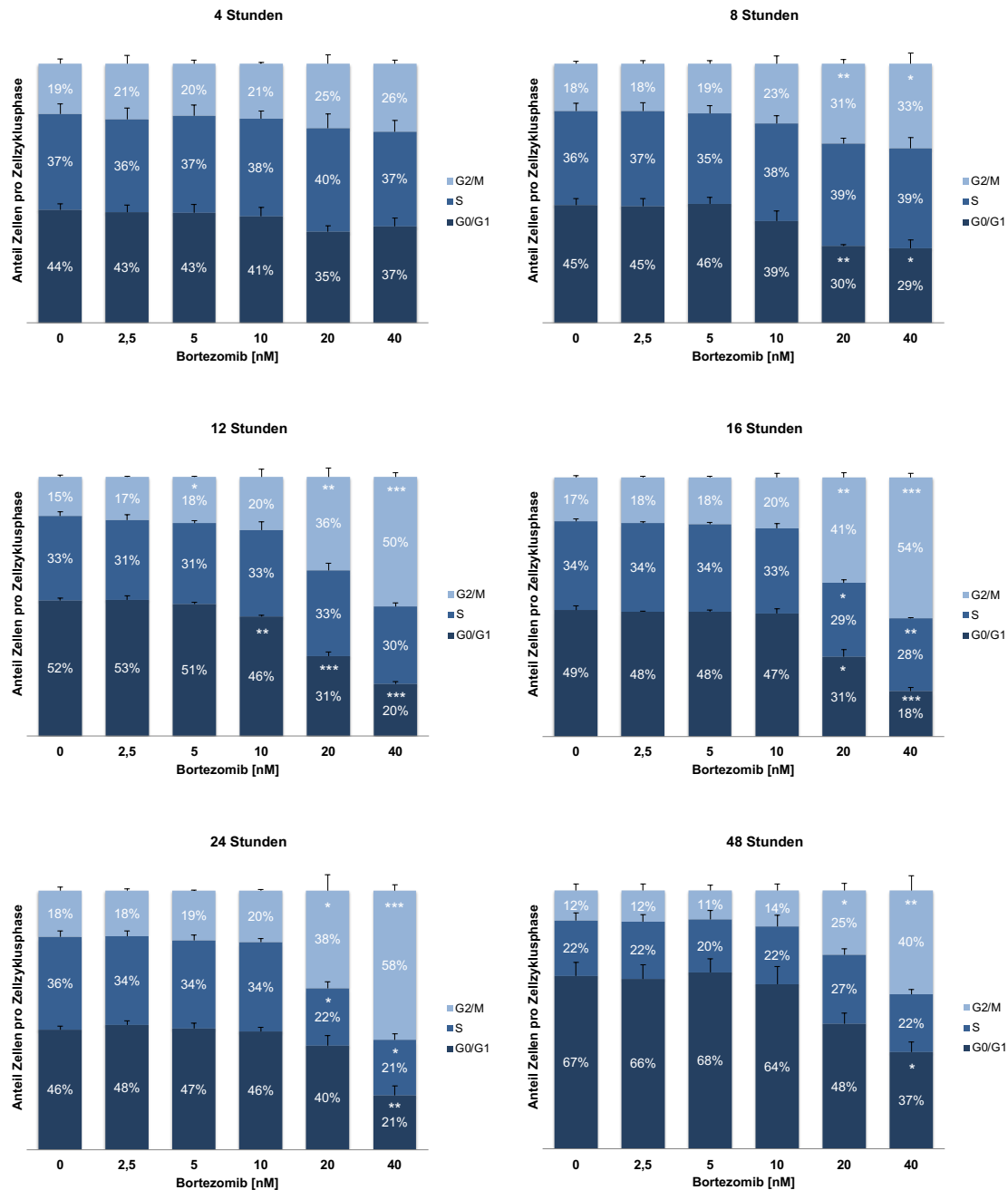


Abbildung 12: Zellzyklusanalyse von LN18 nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen und Fixierung nach verschiedenen Zeitpunkten; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; n = 3; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Nach einer Behandlungsdauer von vier Stunden zeigten sich bei keiner Bortezomibkonzentration signifikante Veränderungen der Verteilung der Zellen pro Zellzyklusphase. Ein signifikanter Anstieg der Zellen in der G₂M-Phase zeigte sich ab einer Konzentration von 20 nM Bortezomib und einer Behandlungsdauer von mindestens acht Stunden. Wie oben bereits dargestellt zeigte sich der größte Anstieg bei einer Bortezomibkonzentration von 40 nM und einer Fixierung nach

24 Stunden. Im Vergleich zu 0 nM stieg der Anteil der Zellen in der G₂M-Phase von 18 % auf 58 % ($p < 0,001$). Auch bei einer Konzentration von 20 nM Bortezomib zeigte sich ein signifikanter Anstieg von 18 % auf 38 % ($p < 0,05$).

Im Gegensatz zum Anstieg des Anteils der Zellen in der G₂M-Phase kam es zu einer Abnahme in der S- und G₀G₁-Phase. Der Anteil der Zellen in der S-Phase blieb zunächst weitgehend konstant. Eine signifikante Abnahme der Zellen in der S-Phase zeigte sich nur für Konzentrationen von 20 nM und 40 nM Bortezomib und eine Behandlungsdauer von 16 bzw. 24 Stunden. Eine signifikante Abnahme des Zellanteils in der G₀G₁-Phase zeigte sich ab einer Behandlungsdauer von acht Stunden, vor allem bei Bortezomibkonzentrationen von 20 nM und 40 nM.

Für die weiteren Experimente mit anderen Zelllinien wurde aufgrund der oben gezeigten Ergebnisse eine Behandlungsdauer von 24 Stunden gewählt.

4.1.2 Zellzyklusanalyse LN18, LN229, U251

Die Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden induzierte bei verschiedenen Glioblastomzelllinien einen Arrest in der G₂M-Phase. In Abbildung 13 wird der Anteil an Zellen in der G₂M-Phase für die verschiedenen Zelllinien direkt verglichen.

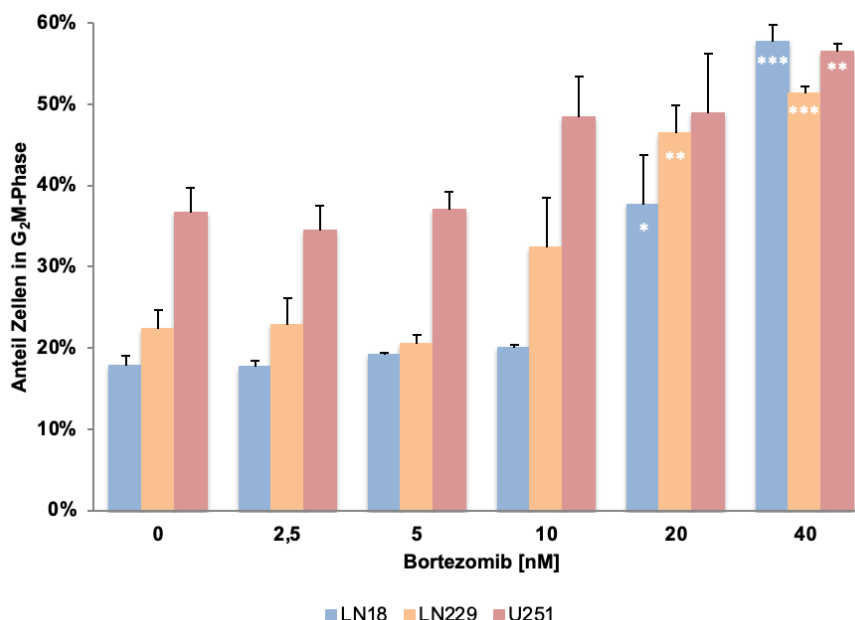


Abbildung 13: Direkter Vergleich des Anteils der Zellen drei verschiedener Glioblastomzelllinien in der G₂M-Phase nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen für 24 Stunden; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; $n = 3$; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Die Zelllinien LN18 und LN229 verhielten sich ähnlich. Der direkte Vergleich dieser beiden Zelllinien ergab, wie in Tabelle 13 dargestellt, keine signifikanten Unterschiede. Ein signifikanter G₂M-Arrest zeigte sich bei LN18 ab einer Bortezomibkonzentration von 20 nM ($p < 0,05$) und 40 nM ($p < 0,001$). Ebenso zeigte sich bei LN229 eine signifikante Zunahme der Zellen in der G₂M-Phase bei 20 nM ($p < 0,01$) und 40 nM ($p < 0,001$) Bortezomib. Bei der Zelllinie U251 befand sich bereits ohne Einfluss von Bortezomib ein großer Anteil an Zellen in der G₂M-Phase. Eine signifikante Steigerung wurde nur bei der höchsten Bortezomibkonzentration (40 nM) erreicht ($p < 0,01$). Mit steigenden Bortezomibkonzentrationen nahmen die signifikanten Unterschiede des Anteils an Zellen in der G₂M-Phase zwischen den Zelllinien ab.

Bortezomib [nM]	Vergleich	p-Wert	Signifikanz
0	LN18/ LN229	0,1641	ns
	LN18/ U251	0,0048	**
	LN229/ U251	0,0210	*
2,5	LN18/ LN229	0,2103	ns
	LN18/ U251	0,0060	**
	LN229/ U251	0,0623	ns
5	LN18/ LN229	0,2946	ns
	LN18/ U251	0,0012	**
	LN229/ U251	0,0025	**
10	LN18/ LN229	0,1130	ns
	LN18/ U251	0,0053	**
	LN229/ U251	0,1149	ns
20	LN18/ LN229	0,2839	ns
	LN18/ U251	0,3028	ns
	LN229/ U251	0,7676	ns
40	LN18/ LN229	0,0535	ns
	LN18/ U251	0,6349	ns
	LN229/ U251	0,0201	*

Tabelle 13: Unterschiede des Anteils an Zellen in der G₂M-Phase nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen für 24 Stunden zwischen den Zelllinien LN18, LN229 und U251; Bestimmung signifikanter Unterschiede mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Der Anteil an Zellen pro Zellzyklusphase nach einer Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen für 24 Stunden ist für die Zelllinien LN18, LN229 und U251 in Abbildung 14 dargestellt.

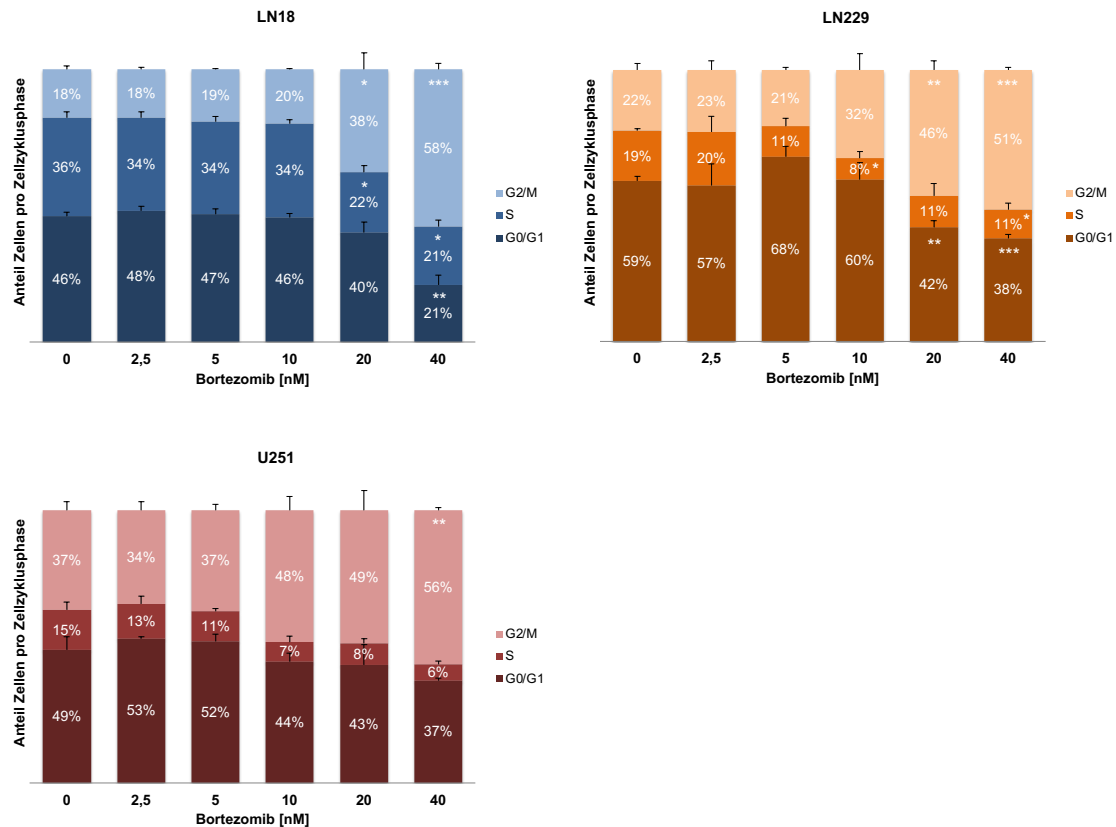


Abbildung 14: Zellzyklusanalyse von LN18, LN229 und U251 nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen für 24 Stunden; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; $n = 3$; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, konnte für die Zelllinie LN18 ein signifikanter Anstieg an Zellen in der G₂M-Phase bei einer Bortezomibkonzentration von 20 nM und 40 nM nachgewiesen werden. Ein signifikanter Rückgang des Zellanteils zeigte sich für die S-Phase bei einer Bortezomibkonzentration von 20 nM und 40 nM, sowie für die G₀G₁-Phase bei einer Bortezomibkonzentration von 40 nM.

Auch bei der Zelllinie LN229 kam es zu einem signifikanten Anstieg der Zellen in der G₂M-Phase. Im Vergleich zu 0 nM stieg der Zellanteil bei 20 nM Bortezomib von 22 % auf 46 % ($p < 0,01$) und bei 40 nM Bortezomib von 22 % auf 51 % ($p < 0,001$). Wie bei der Zelllinie LN18 kam es zu einer Abnahme der Zellen in der S- und G₀G₁-Phase. Signifikante Unterschiede zeigten sich für die S-Phase bei 10 nM und 40 nM Bortezomib und für die G₀G₁-Phase bei 20 nM und 40 nM Bortezomib.

Für die Zelllinie U251 konnte nur bei einer Bortezomibkonzentration von 40 nM eine signifikante Zunahme der Zellen in der G₂M-Phase beobachtet werden. Der Anteil der Zellen stieg von 37 % bei 0 nM auf 56 % bei 40 nM Bortezomib ($p < 0,01$). Für die S- und G₀G₁-Phase ergaben sich keine signifikanten Veränderungen.

4.2 AlamarBlue Assay

Die relative Zellviabilität der Glioblastomzelllinien LN18, LN229 und U251 nach Behandlung mit Bortezomib wurde mittels AlamarBlue Assay bestimmt. Abbildung 15 zeigt die Zellviabilität der drei Zelllinien nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen nach 24, 48 und 72 Stunden.

Bei der Zelllinie LN18 zeigte sich nach Behandlung mit mindestens 10 nM Bortezomib für 24 Stunden eine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden nahm die Zellviabilität ab einer Bortezomibkonzentration von 20 nM signifikant ab. Ab dieser Konzentration lag die Zellviabilität bereits unter 50 %. Nach 72 Stunden wurde die Zellviabilität bereits bei einer Bortezomibkonzentration von nur 5 nM signifikant reduziert ($p < 0,05$). Bei höheren Konzentrationen von 20 nM und 40 nM Bortezomib lag die Zellviabilität nur bei 34 % ($p < 0,01$) bzw. 11 % ($p < 0,001$).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Zelllinie LN229. Auch hier wurde die Zellviabilität nach 24-stündiger Behandlung mit Bortezomibkonzentrationen ab 10 nM signifikant gesenkt. Eine Behandlungsdauer von 72 Stunden reduzierte auch bei LN229 die Zellviabilität bereits ab einer Bortezomibkonzentration von 10 nM unter 50 %.

Für Zellen der Zelllinie U251 zeigte sich unabhängig von der Bortezomibkonzentration nach 24 Stunden keine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden wurde die Zellviabilität bei 40 nM Bortezomib signifikant auf 70 % gesenkt ($p < 0,01$). Nach 72-stündiger Bortezomibbehandlung zeigte sich bei U251 bereits ab 5 nM eine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Bei einer Bortezomibkonzentration von 20 nM und 40 nM lag die Zellviabilität noch bei knapp 50 %.

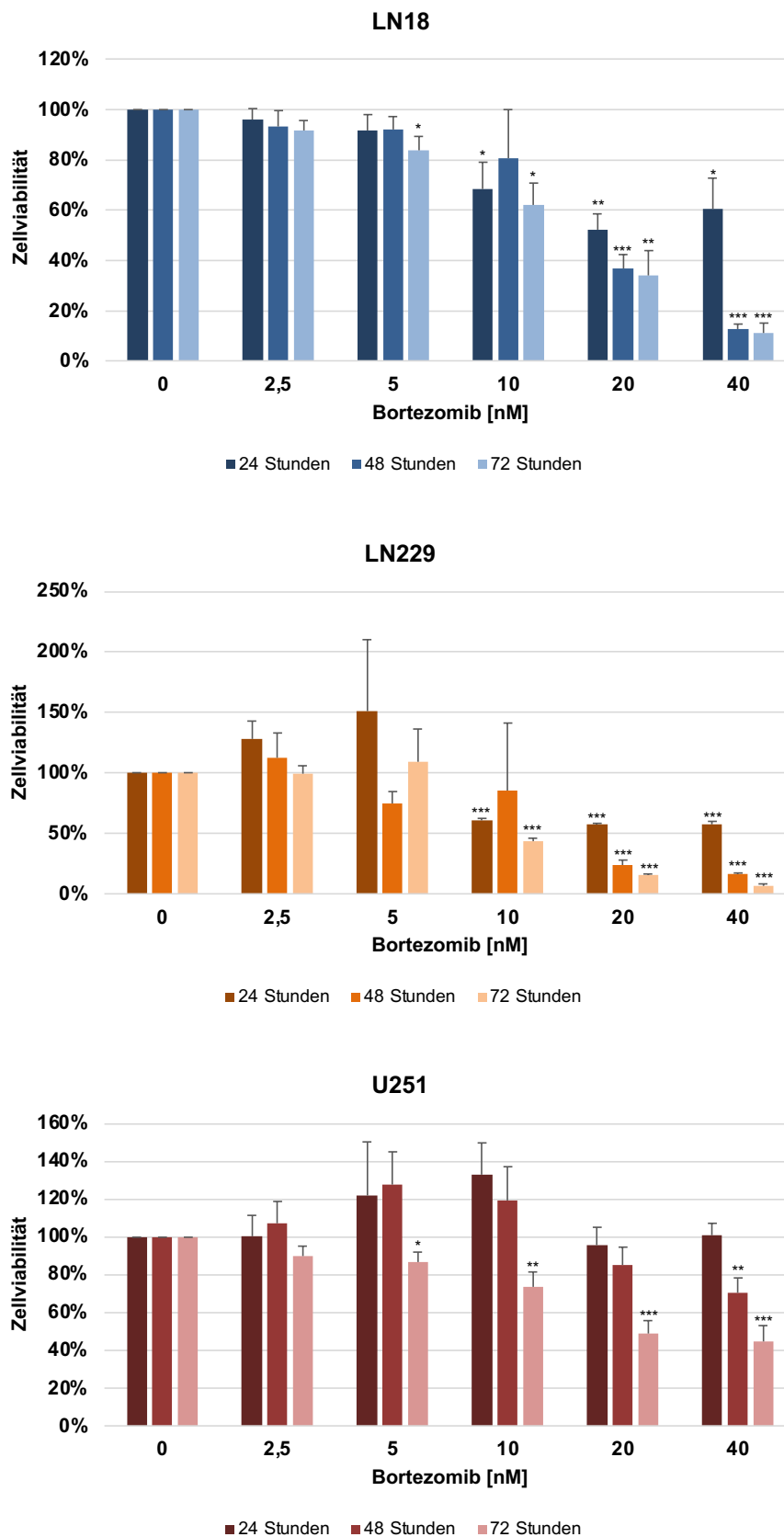
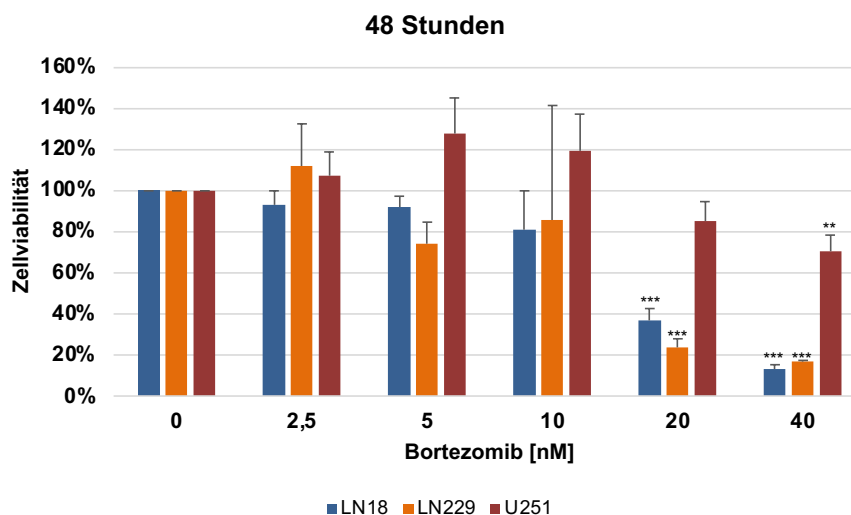
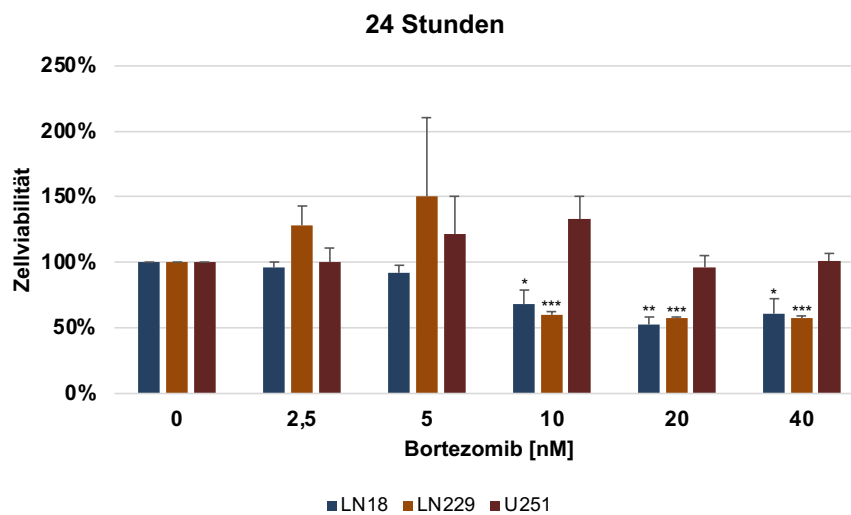


Abbildung 15: Vergleich der Zellviabilität der Zelllinien LN18, LN229 und U251 nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen für 24, 48 und 72 Stunden; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; $n = 3$ (LN18, LN229); $n = 5$ (U251); Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Vergleicht man, wie in Abbildung 16 dargestellt, die Toxizität von Bortezomib auf die drei Glioblastomzelllinien LN18, LN229 und U251, zeigten sich Unterschiede in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer, der Bortezomibkonzentration und der Zelllinie. Eine Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden führte bei der Zelllinie U251 zu keiner signifikanten Reduktion der Zellviabilität. Dagegen kam es bei den Zelllinien LN18 und LN229 ab einer Bortezomibkonzentration von 10 nM zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität. Nach einer 48-stündigen Behandlung mit 40 nM Bortezomib nahm die Zellviabilität bei U251 auch signifikant ab auf 70 %. Im Vergleich dazu lag die Zellviabilität bei LN18 und LN229 bei 13 % bzw. 16 %. Nach 72 Stunden nahm die Zellviabilität bei allen Zelllinien ab einer Bortezomibkonzentration von 10 nM signifikant ab. Auch hier zeigte sich bei U251 eine höhere Zellviabilität als bei den Zelllinien LN18 und LN229.



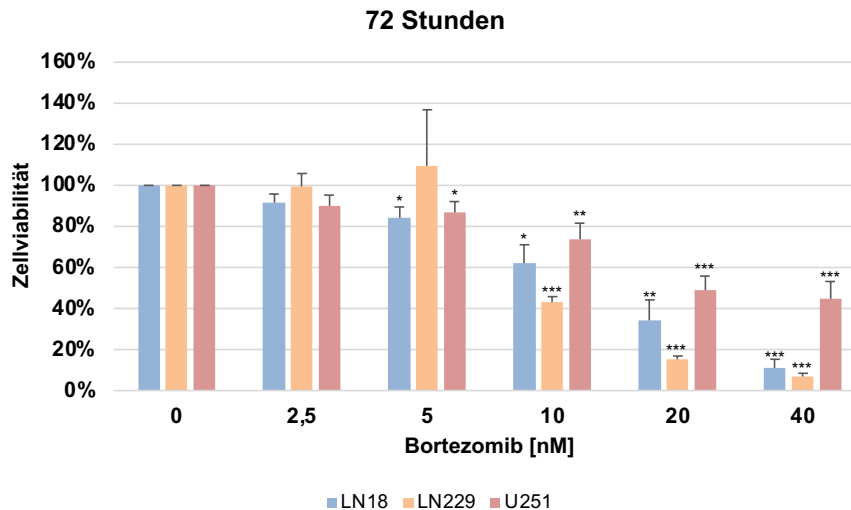


Abbildung 16: Direkter Vergleich der Zellviabilität nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen für 24, 48 und 72 Stunden bei den Zelllinien LN18, LN229 und U251; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; $n = 3$ (LN18, LN229); $n = 5$ (U251); Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Vergleicht man, wie in Tabelle 14 dargestellt, die Zellviabilität der drei Zelllinien für jede Bortezomibkonzentration, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien LN18 und LN229. Ab einer Bortezomibkonzentration von 10 nM zeigt sich insbesondere bei LN229 und teilweise bei LN18 eine signifikant niedrigere Zellviabilität als bei der Zelllinie U251.

24 Stunden				48 Stunden				72 Stunden			
Bortezomib [nM]	Vergleich	p-Wert	Signifikanz	Bortezomib [nM]	Vergleich	p-Wert	Signifikanz	Bortezomib [nM]	Vergleich	p-Wert	Signifikanz
2,5	LN18/ LN229	0,0977	ns	2,5	LN18/ LN229	0,4305	ns	2,5	LN18/ LN229	0,3470	ns
	LN18/ U251	0,7922	ns		LN18/ U251	0,4253	ns		LN18/ U251	0,8287	ns
	LN229/ U251	0,1715	ns		LN229/ U251	0,8223	ns		LN229/ U251	0,2855	ns
5	LN18/ LN229	0,3810	ns	5	LN18/ LN229	0,2046	ns	5	LN18/ LN229	0,4071	ns
	LN18/ U251	0,4579	ns		LN18/ U251	0,1785	ns		LN18/ U251	0,7369	ns
	LN229/ U251	0,6357	ns		LN229/ U251	0,0704	ns		LN229/ U251	0,3177	ns
10	LN18/ LN229	0,4950	ns	10	LN18/ LN229	0,9406	ns	10	LN18/ LN229	0,1120	ns
	LN18/ U251	0,0376	*		LN18/ U251	0,2215	ns		LN18/ U251	0,3674	ns
	LN229/ U251	0,0198	*		LN229/ U251	0,5050	ns		LN229/ U251	0,0254	*
20	LN18/ LN229	0,4514	ns	20	LN18/ LN229	0,1220	ns	20	LN18/ LN229	0,1359	ns
	LN18/ U251	0,0179	*		LN18/ U251	0,0133	*		LN18/ U251	0,2600	ns
	LN229/ U251	0,0234	*		LN229/ U251	0,0040	**		LN229/ U251	0,0118	*
40	LN18/ LN229	0,7968	ns	40	LN18/ LN229	0,1691	ns	40	LN18/ LN229	0,3505	ns
	LN18/ U251	0,0142	*		LN18/ U251	0,0021	**		LN18/ U251	0,0300	*
	LN229/ U251	0,0017	**		LN229/ U251	0,0027	**		LN229/ U251	0,0165	*

Tabelle 14: Unterschiede der Zellviabilität nach Behandlung mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen für 24, 48 und 72 Stunden zwischen den Zelllinien LN18, LN229 und U251; Bestimmung signifikanter Unterschiede mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3 Colony Formation Assay

4.3.1 Colony Formation Assay Bortezomib

Zunächst wurde das Überleben der drei Glioblastomzelllinien LN18, LN229 und U251 nach alleiniger Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden untersucht. Dabei wurde Bortezomib in Konzentrationen von 5 nM bis 40 nM verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. Bei allen Zelllinien zeigte sich für jede Bortezomibkonzentration eine signifikante Reduktion der Survival Fraction (SF). Bereits bei einer Dosis von 5 nM Bortezomib nahm die SF bei LN18 ($p < 0,001$), LN229 ($p < 0,05$) und U251 ($p < 0,05$) signifikant ab. Schon bei einer niedrigen Konzentration von 10 nM Bortezomib fiel die SF steil und signifikant ab. Bei einer Bortezomibkonzentration von 10 nM lag die SF bei LN18 unter 50 %, bei LN229 und U251 sogar bei nur circa 30 %. Bei einer Konzentration von 40 nM betrug die SF bei allen Zelllinien noch maximal 10 %. Die IC_{50} betrug 9,8 nM bei LN18, 8,0 nM bei LN229 und 8,6 nM bei U251.

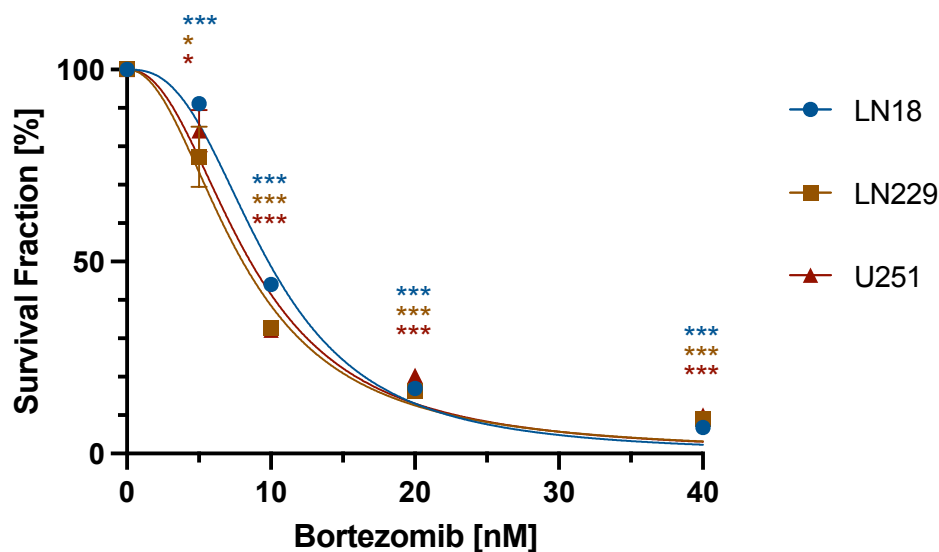


Abbildung 17: Survival Fraction drei verschiedener Glioblastomzelllinien nach Behandlung mit unterschiedlichen Bortezomibkonzentrationen für 24 Stunden; Fit: Inhibitor vs. normalized response – variable slope; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; $n = 3$; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Insgesamt zeigten die Zelllinien LN18, LN229 und U251 eine vergleichbare Reaktion auf die Behandlung mit Bortezomib. Beim Vergleich der SF der drei Zelllinien in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Bortezomibkonzentrationen ergaben sich nur vereinzelt signifikante Unterschiede. Die entsprechenden Daten

sind in Tabelle 15 dargestellt. Der deutlichste Unterschied zeigte sich bei einer Konzentration von 10 nM: hier war die SF bei LN229 ($p < 0,05$) und U251 ($p < 0,01$) signifikant niedriger als bei LN18.

Bortezomib [nM]	Vergleich	p-Wert	Signifikanz
5	LN18/ LN229	0,1526	ns
	LN18/ U251	0,2643	ns
	LN229/ U251	0,5164	ns
10	LN18/ LN229	0,0104	*
	LN18/ U251	0,0043	**
	LN229/ U251	0,7992	ns
20	LN18/ LN229	0,0737	ns
	LN18/ U251	0,0636	ns
	LN229/ U251	0,0406	*
40	LN18/ LN229	0,1631	ns
	LN18/ U251	0,1421	ns
	LN229/ U251	0,4891	ns

Tabelle 15: Unterschiede der Survival Fraction für verschiedene Bortezomibkonzentrationen zwischen den Zelllinien LN18, LN229 und U251; Bestimmung signifikanter Unterschiede mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Unter Einbeziehung der Ergebnisse der Zellzyklusanalyse und des alamarBlue Assays wurden für die kombinierte Behandlung der Zellen mit Bortezomib für 24 Stunden und nachfolgender Bestrahlung Bortezomibkonzentrationen von 10 nM und 20 nM gewählt. Für diese Konzentrationen zeigten sich bei akzeptabler Toxizität bereits Effekte auf den Zellzyklus. Die relative Zellviabilität lag bei allen Zelllinien bei mindestens 50 %. Die SF betrug bei einer Bortezomibkonzentration von 10 nM mindestens 30 % und bei einer Konzentration von 20 nM knapp 20 %.

4.3.2 Colony Formation Assay Bortezomib und Bestrahlung

Ein wesentlicher Endpunkt der Untersuchungen war das klonogene Überleben der Glioblastomzelllinien LN18, LN229 und U251 nach Behandlung mit 10 nM oder 20 nM Bortezomib für 24 Stunden und anschließender Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Abbildung 18 zeigt zunächst die SF von LN18, LN229 und U251 nach alleiniger Bestrahlung. Eine Bestrahlungsdosis von 2, 4, 6 und 8 Gy reduzierte die SF bei allen drei Zelllinien signifikant ($p < 0,001$). Lediglich bei U251 kam es bei einer Dosis von 1 Gy zu keiner signifikanten Reduktion der SF. Die Überlebenskurven wurden mit dem linear-quadratischen Modell gefittet. Bei der Zelllinie U251 erbrachte dieser Fit insbesondere bei hohen

Bortezomibkonzentrationen keine sinnvollen Ergebnisse. Daher wurde für diese Zelllinie ein linearer Fit gewählt.

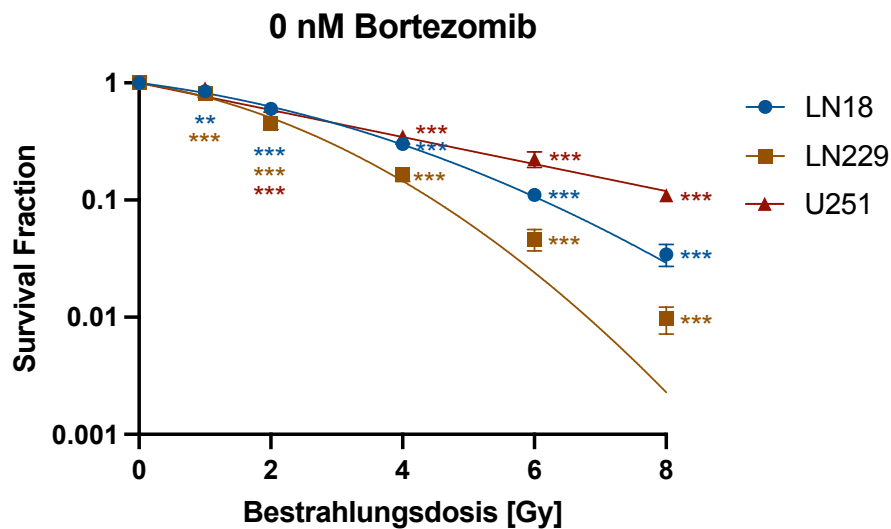


Abbildung 18: Vergleich der Survival Fraction von LN18, LN229 und U251 nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung; Fit mittels linear-quadratischem Modell (LN18, LN229) bzw. linearem Modell (U251); Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; $n=4$ (LN18, LN229), $n=5$ (U251); Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 Gy mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Vergleicht man die SF der drei Glioblastomzelllinien miteinander, zeigten sich vor allem bei hohen Bestrahlungsdosen signifikante Unterschiede. Diese sind in Tabelle 16 dargestellt. Nach einer Bestrahlung mit 6 Gy oder 8 Gy reagierte die Zelllinie LN229 signifikant sensibler als LN18 und U251. Die höchste Resistenz gegenüber der Bestrahlung zeigte sich bei U251.

Dosis [Gy]	Vergleich	p-Wert	Signifikanz
1	LN18/ LN229	0,3706	ns
	LN18/ U251	0,7698	ns
	LN229/ U251	0,5962	ns
2	LN18/ LN229	0,0201	*
	LN18/ U251	0,2741	ns
	LN229/ U251	0,7756	ns
4	LN18/ LN229	0,0124	*
	LN18/ U251	0,4600	ns
	LN229/ U251	0,0170	*
6	LN18/ LN229	0,0086	**
	LN18/ U251	0,0260	*
	LN229/ U251	0,0027	**
8	LN18/ LN229	0,0180	*
	LN18/ U251	0,0026	**
	LN229/ U251	0,0003	***

Tabelle 16: Unterschiede der Survival Fraction zwischen den Zelllinien LN18, LN229 und U251 nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung; Bestimmung signifikanter Unterschiede mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Eine Behandlung mit 20 nM Bortezomib für 24 Stunden führte bei LN18 zu einer signifikanten Reduktion der SF für Bestrahlungsdosen zwischen 1 Gy und 6 Gy im Vergleich zur Kontrollgruppe (0 nM). Bei einer Bortezomibkonzentration von 10 nM zeigte sich nur bei einer Dosis von 4 Gy eine signifikante Reduktion der SF ($p < 0,05$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

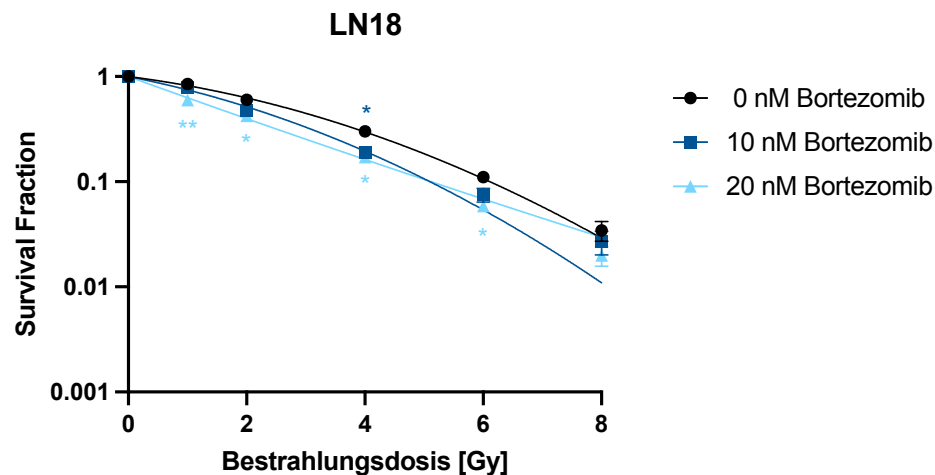


Abbildung 19: Survival Fraction von LN18 nach Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung; Fit mittels linear-quadratischem Modell; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; $n=4$; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Auch bei der Zelllinie LN229 führte eine 24-stündige Bortezomibbehandlung zu einer signifikanten Reduktion der SF für Bestrahlungsdosen von 1 Gy bis 6 Gy. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur ausschließlich bestrahlten Kontrollgruppe (0 nM) zeigten sich sowohl für eine Bortezomibkonzentration von 10 nM als auch von 20 nM. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

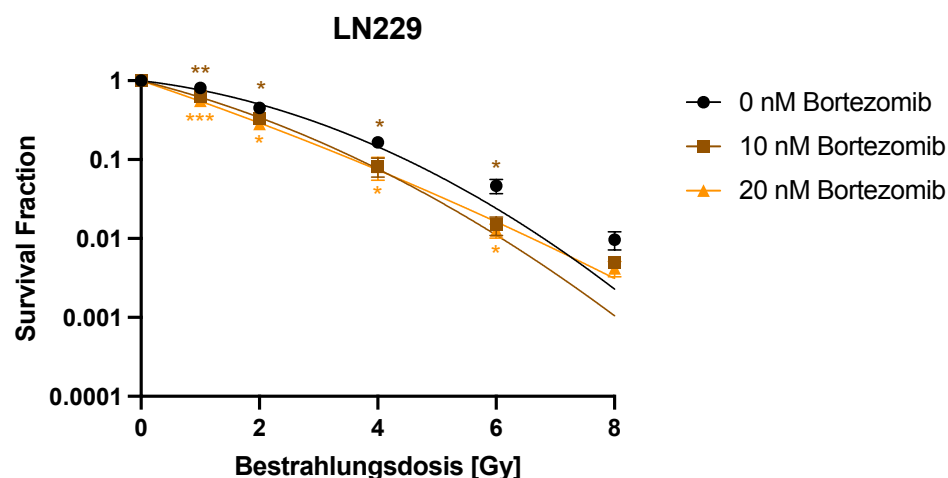


Abbildung 20: Survival Fraction von LN229 nach Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung; Fit mittels linear-quadratischem Modell; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; $n=4$;

Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Abbildung 21 zeigt die SF von U251 nach Behandlung mit 10 nM oder 20 nM Bortezomib für 24 Stunden und anschließender Bestrahlung. Bei dieser Zelllinie konnte die SF nur bei höheren Bestrahlungsdosen von mindestens 4 Gy bzw. 6 Gy durch 20 nM bzw. 10 nM Bortezomib signifikant reduziert werden.

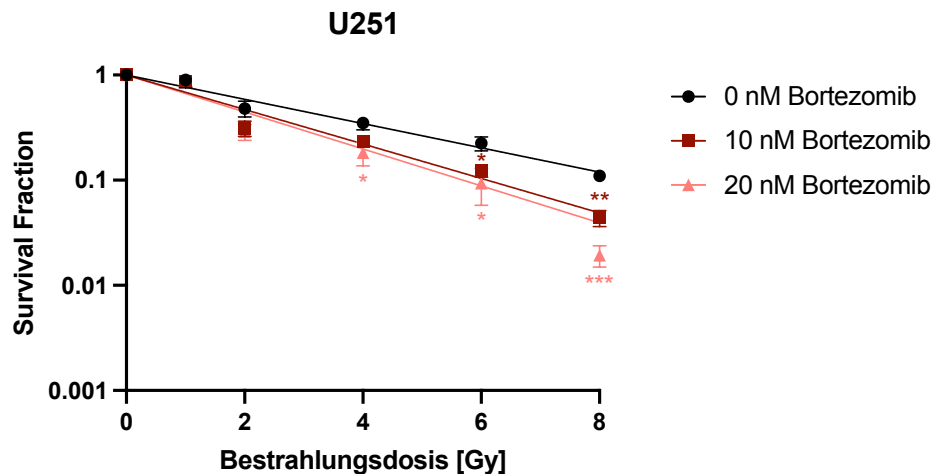


Abbildung 21: Survival Fraction von U251 nach Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung; Fit mittels linearem Modell; Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; $n=5$; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Signifikante Unterschiede der SF nach kombinierter Behandlung der Zellen mit 10 nM oder 20 nM Bortezomib und Bestrahlung im Vergleich zur ausschließlich bestrahlten Kontrollgruppe (0 nM) wurden bereits in den vorangehenden Abbildungen dargestellt. Tabelle 17 zeigt Unterschiede der SF zwischen 10 nM oder 20 nM Bortezomib bei LN18, LN229 und U251.

Zelllinie	Dosis [Gy]	Vergleich Bortezomibkonzentration	p-Wert	Signifikanz
LN18	1	10 nM vs. 20 nM	0,0226	*
	2		0,1822	ns
	4		0,4912	ns
	6		0,2586	ns
	8		0,4051	ns
LN229	1	10 nM vs. 20 nM	0,0349	*
	2		0,4625	ns
	4		0,9682	ns
	6		0,6586	ns
	8		0,5065	ns
U251	1	10 nM vs. 20 nM	0,8378	ns
	2		0,7471	ns
	4		0,3569	ns
	6		0,4676	ns
	8		0,0231	*

Tabelle 17: Unterschiede der Survival Fraction nach Behandlung mit Bortezomib und Bestrahlung bei den Zelllinien LN18, LN229 und U251; Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen 10 nM und 20 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

In Abbildung 22 wird die SF zwischen den drei Glioblastomzelllinien nach Behandlung mit 10 nM oder 20 nM Bortezomib für 24 Stunden und anschließender Bestrahlung verglichen. LN229 reagierte dabei signifikant sensibler als LN18 (10 nM und 20 nM Bortezomib) und U251 (10 nM Bortezomib). Zwischen LN18 und U251 zeigten sich keine wesentlichen signifikanten Unterschiede. Die vollständigen Daten sind in Tabelle 18 dargestellt.

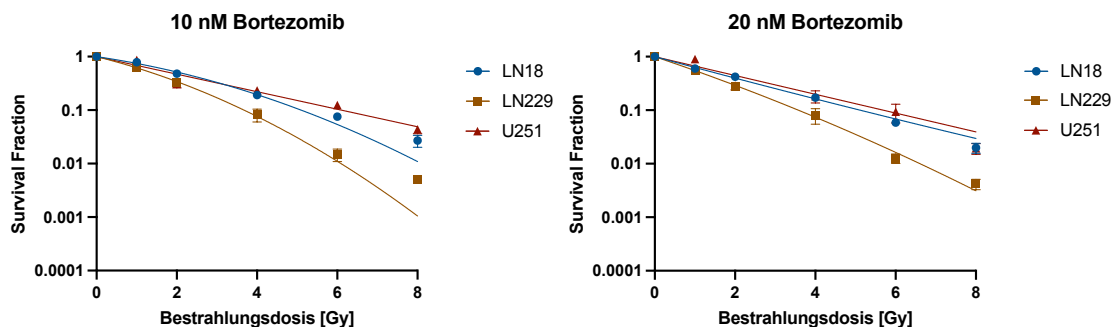


Abbildung 22: Vergleich der Survival Fraction von LN18, LN229 und U251 nach Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung mit Röntgenstrahlung; Fit mittels linear-quadratischem Modell (LN18, LN229) bzw. linearem Modell (U251); Daten: Mittelwert $\pm$ SEM; $n=4$ (LN18, LN229), $n=5$ (U251)

Bortezomib [nM]	Dosis [Gy]	Vergleich	p-Wert	Signifikanz
10	1	LN18/ LN229	0,0213	*
		LN18/ U251	0,4078	ns
		LN229/ U251	0,0244	*
	2	LN18/ LN229	0,0236	*
		LN18/ U251	0,0360	*
		LN229/ U251	0,7946	ns
	4	LN18/ LN229	0,0131	*
		LN18/ U251	0,2315	ns
		LN229/ U251	0,0022	**
	6	LN18/ LN229	0,0022	**
		LN18/ U251	0,0632	ns
		LN229/ U251	0,0010	***
20	1	LN18/ LN229	0,0180	*
		LN18/ U251	0,1500	ns
		LN229/ U251	0,0027	**
	2	LN18/ LN229	0,3371	ns
		LN18/ U251	0,0648	ns
		LN229/ U251	0,0368	*
	4	LN18/ LN229	0,0366	*
		LN18/ U251	0,0603	ns
		LN229/ U251	0,9448	ns
	6	LN18/ LN229	0,0253	*
		LN18/ U251	0,8383	ns
		LN229/ U251	0,1187	ns
	8	LN18/ LN229	0,0010	**
		LN18/ U251	0,4219	ns
		LN229/ U251	0,0868	ns
		LN18/ LN229	0,0104	*
		LN18/ U251	0,9394	ns
		LN229/ U251	0,0204	*

Tabelle 18: Unterschiede der Survival Fraction zwischen den Zelllinien LN18, LN229 und U251 nach Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung; Bestimmung signifikanter Unterschiede mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Die Bestrahlungsdosis, die benötigt wird, um die SF auf 50 % bzw. 10 % zu reduzieren, wird als D_{50} bzw. D_{10} bezeichnet.

Für LN18 lag die D_{50} bei 2,69 Gy und die D_{10} bei 6,02 Gy. Durch die kombinierte Behandlung der Zellen mit Bortezomib und Bestrahlung konnte die D_{50} signifikant gesenkt werden ($p < 0,05$ mit 10 nM bzw. $p < 0,001$ mit 20 nM Bortezomib). Die D_{10} nahm ebenfalls ab, allerdings zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 19).

Die Sensitization Enhancement Ratio (SER) beschreibt das Verhältnis der Bestrahlungsdosis mit oder ohne Sensitizer, die benötigt wird, um die SF auf 50 % (bzw. 10 %) zu reduzieren.

Die Werte für LN18 sind ebenfalls in Tabelle 19 dargestellt. Die SER (50 %) konnte signifikant mit 10 nM Bortezomib auf 1,32 ($p < 0,01$) und mit 20 nM Bortezomib auf 1,82 ($p < 0,01$) erhöht werden. Somit führte Bortezomib zu einer konzentrationsabhängigen Radiosensitivierung bei LN18.

LN18		Bortezomib [nM]		
		0	10	20
alpha		0,1502	0,2527	0,4663
beta		0,0414	0,0409	-0,0015
D ₅₀ [Gy]	Mittelwert ± SD	2,69 ± 0,26	2,06 ± 0,32	1,51 ± 0,22
	p-Wert		0,0220	0,0005
	Signifikanz		*	***
SER (50 %)	Mittelwert ± SD	1,00 ± 0,00	1,32 ± 0,13	1,82 ± 0,36
	p-Wert		0,0026	0,0040
	Signifikanz		**	**
D ₁₀ [Gy]	Mittelwert ± SD	6,02 ± 0,85	5,11 ± 0,48	5,05 ± 0,47
	p-Wert		0,1117	0,0939
	Signifikanz		ns	ns
SER (10 %)	Mittelwert ± SD	1,00 ± 0,00	1,18 ± 0,13	1,20 ± 0,22
	p-Wert		0,0317	0,1138
	Signifikanz		*	ns

Tabelle 19: Parameter zur Charakterisierung der Radiosensitivierung durch Bortezomib bei der Zelllinie LN18, berechnet aus Daten des Colony Formation Assays; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Für die Zelllinie LN229 lag die D₅₀ bei 2,02 Gy und konnte in Kombination mit Bortezomib auf 1,40 Gy (p < 0,01 mit 10 nM Bortezomib) bzw. 1,19 Gy (p < 0,001 mit 20 nM Bortezomib) signifikant gesenkt werden (vgl. Tabelle 20). Die D₁₀ wurde von 4,44 Gy auf 3,62 Gy (10 nM Bortezomib) bzw. 3,49 Gy (20 nM Bortezomib) gesenkt. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg der SER (50 %) auf 1,45 bei 10 nM Bortezomib (p < 0,001) und ein Anstieg auf 1,71 bei 20 nM Bortezomib (p < 0,01). Somit führte Bortezomib auch bei LN229 zu einer konzentrationsabhängigen Radiosensitivierung.

LN229		Bortezomib [nM]		
		0	10	20
alpha		0,1954	0,3984	0,5126
beta		0,0758	0,0785	0,0686
D ₅₀ [Gy]	Mittelwert ± SD	2,02 ± 0,20	1,40 ± 0,19	1,19 ± 0,15
	p-Wert		0,0042	0,0006
	Signifikanz		**	***
SER (50 %)	Mittelwert ± SD	1,00 ± 0,00	1,45 ± 0,13	1,71 ± 0,27
	p-Wert		0,0005	0,0019
	Signifikanz		***	**
D ₁₀ [Gy]	Mittelwert ± SD	4,44 ± 0,46	3,62 ± 0,71	3,49 ± 0,87
	p-Wert		0,1011	0,1018
	Signifikanz		ns	ns
SER (10 %)	Mittelwert ± SD	1,00 ± 0,00	1,25 ± 0,14	1,31 ± 0,23
	p-Wert		0,0131	0,0339
	Signifikanz		*	*

Tabelle 20: Parameter zur Charakterisierung der Radiosensitivierung durch Bortezomib bei der Zelllinie LN229, berechnet aus Daten des Colony Formation Assays; Bestimmung signifikanter

Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Tabelle 21 zeigt zuletzt die Werte der Zelllinie U251. Aufgrund der bei dieser Zelllinie verwendeten, vereinfachten linearen Formel zur Berechnung der SF, entfallen hier die beta-Werte. Die D_{50} betrug 2,55 Gy und die D_{10} lag bei 8,47 Gy. Auch bei U251 kam es nach Bortezomibbehandlung und Bestrahlung zu einer Abnahme der D_{50} bzw. D_{10} und einem Anstieg der SER. Die D_{50} konnte mit 10 nM Bortezomib auf 1,83 Gy bzw. mit 20 nM Bortezomib auf 1,73 Gy gesenkt werden. Die D_{10} fiel auf 6,07 Gy (10 nM Bortezomib) bzw. 5,76 Gy (20 nM Bortezomib). Signifikante Unterschiede zeigten sich für die SER. Die SER (50 %) stieg mit 10 nM Bortezomib auf 1,39 ($p < 0,05$) und mit 20 nM Bortezomib auf 1,48 ($p < 0,001$). Somit kam es auch bei der Zelllinie U251 zu einer signifikanten Radiosensitivierung.

U251		Bortezomib [nM]		
		0	10	20
alpha		0,2909	0,3868	0,4319
beta		entfällt	entfällt	entfällt
D_{50} [Gy]	Mittelwert $\pm$ SD	2,55 $\pm$ 0,77	1,83 $\pm$ 0,30	1,73 $\pm$ 0,56
	p-Wert		0,0873	0,0929
	Signifikanz		ns	ns
SER (50 %)	Mittelwert $\pm$ SD	1,00 $\pm$ 0,00	1,39 $\pm$ 0,30	1,48 $\pm$ 0,09
	p-Wert		0,0206	0,0000
	Signifikanz		*	***
D_{10} [Gy]	Mittelwert $\pm$ SD	8,47 $\pm$ 2,57	6,07 $\pm$ 1,00	5,76 $\pm$ 1,87
	p-Wert		0,0873	0,0929
	Signifikanz		ns	ns
SER (10 %)	Mittelwert $\pm$ SD	1,00 $\pm$ 0,00	1,39 $\pm$ 0,30	1,48 $\pm$ 0,09
	p-Wert		0,0206	0,0000
	Signifikanz		*	***

Tabelle 21: Parameter zur Charakterisierung der Radiosensitivierung durch Bortezomib bei der Zelllinie U251, berechnet aus Daten des Colony Formation Assays; Bestimmung signifikanter Unterschiede im Vergleich zu 0 nM Bortezomib mittels T-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Sowohl die alleinige Bestrahlung als auch die Behandlung mit Bortezomib führten zu einer signifikanten Reduktion der SF bei den Glioblastomzelllinien LN18, LN229 und U251. Anhand der SER konnte man auf eine Radiosensitivierung durch Bortezomib bei allen Zelllinien schließen.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Proteasominhibitor Bortezomib induzierte in der Glioblastomzelllinie LN18 einen zeit- und konzentrationsabhängigen Arrest in der radiosensitiven G₂M-Phase des Zellzyklus. Signifikante Effekte auf die Zellzyklusverteilung traten ab einer Behandlungsdauer von mindestens acht Stunden und einer Bortezomibkonzentration von 20 nM auf. Nach 48 Stunden war der Einfluss auf den Zellzyklus rückläufig. Mögliche Ursachen hierfür sind die begrenzte Halbwertszeit von Bortezomib sowie die reversible Hemmung des 26S-Proteasoms (Dou & Zonder, 2014). In-vitro-Daten zeigen, dass Bortezomib mit einer Halbwertszeit von etwa zwanzig Minuten vom Proteasom dissoziiert (STADAPHARM, 2021). Die maximale Hemmung der Proteasomaktivität tritt bereits innerhalb einer Stunde nach Applikation auf (Schwartz & Davidson, 2004). Die volle Proteasomfunktion stellt sich innerhalb von 72 bis 96 Stunden wieder her. Die mittlere Eliminationshalbwertszeit von Bortezomib variiert bei Mehrfachdosierung zwischen 40 bis 193 Stunden (STADAPHARM, 2021). Eine 24-stündige Behandlung verschiedener Glioblastomzelllinien mit Bortezomib führte zu einem deutlichen Anstieg des Anteils der Zellen in der G₂M-Phase. Ein signifikanter Anstieg wurde für die Zelllinien LN18 und LN229 ab einer Konzentration von 20 nM beobachtet, bei der Zelllinie U251 ab 40 nM.

Die Toxizität von Bortezomib war abhängig von der Behandlungsdauer, der Konzentration und der Zelllinie. Bei den Zelllinien LN18 und LN229 führte eine Behandlung mit 10 nM Bortezomib für 24 Stunden zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität. Bei der Zelllinie U251 kam es erst ab einer Bortezomibkonzentration von 40 nM und einer Behandlungsdauer von 48 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität.

Bei allen drei Glioblastomzelllinien führte eine 24-stündige Behandlung mit Bortezomib ab einer Konzentration von 5 nM zu einer signifikanten Reduktion der Survival Fraction im Colony Formation Assay. Auch die alleinige Bestrahlung mit Röntgenstrahlung bewirkte ab einer Dosis von 2 Gy eine signifikante Abnahme der Survival Fraction bei LN18, LN229 und U251. Die Kombination aus Bortezomibbehandlung für 24 Stunden und nachfolgender Bestrahlung führte

ebenfalls zu einer niedrigeren Survival Fraction im Vergleich zur SF der ausschließlich bestrahlten Zellen. Anhand verschiedener Parameter wie der D_{50} , der D_{10} und der SER zeigte sich eine Radiosensitivierung von Glioblastomzellen durch Bortezomib.

5.2 Diskussion der Methoden

5.2.1 Etablierung von Konzentration und Dauer der Bortezomib-behandlung

Die Bestimmung der Zellzyklusphasen anhand des DNA-Gehalts von Zellen mittels Durchflusszytometrie gilt als Standardverfahren. Der Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf die Zellzyklusphasen der Glioblastomzelllinie LN18 wurde nach verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Ein signifikanter Anstieg des Anteils an Zellen in der G_2M -Phase konnte nach mindestens acht Stunden beobachtet werden. Der größte Effekt zeigte sich nach 24 Stunden. Aufgrund der Praktikabilität einer Fixierung der Zellen 24 Stunden nach Behandlung mit Bortezomib wurde diese Behandlungsdauer für alle weiteren Versuche und Zelllinien übernommen. Bei den Glioblastomzelllinien LN229 und U251 konnte der Anteil an Zellen in der G_2M -Phase durch eine 24-stündige Bortezomibbehandlung ebenfalls signifikant gesteigert werden. Eine Analyse der Zellzyklusphasen nach unterschiedlicher Behandlungsdauer erfolgte bei diesen beiden Zelllinien allerdings nicht.

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse wurden zudem herangezogen, um eine geeignete Bortezomibkonzentration für die kombinierte Behandlung aus Proteasominhibitor und Bestrahlung zu definieren. Signifikante Effekte auf den Zellzyklus der Zelllinien LN18, LN229 und U251 traten ab Konzentrationen von 20 nM bzw. 40 nM Bortezomib auf. Neben dem angestrebten Arrest in der radiosensitiven G_2M -Phase musste jedoch auch die Toxizität des Proteasominhibitors berücksichtigt werden. Das klonogene Überleben der Glioblastomzelllinien LN18, LN229 und U251 war bereits nach einer 24-stündigen Behandlung mit Bortezomib ab einer Konzentration von 5 nM signifikant reduziert. Bei einer Konzentration von 10 nM fiel die SF in allen Zelllinien auf unter 50 %. Die Zellviabilität wurde mittels alamarBlue Assay durch die Messung der optischen Dichte (OD) erfasst. In den Zelllinien LN18 und LN229

zeigte sich bereits ab 10 nM Bortezomib nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion der OD. Im Gegensatz dazu konnte in der Zelllinie U251 nach 24-stündiger Behandlung kein signifikanter Rückgang der Zellviabilität beobachtet werden.

Zu Beginn der Arbeit wurden in Tabelle 2 Beispiele verschiedener Tumorentitäten aufgeführt, bei denen in der Literatur eine Radiosensitivierung durch Bortezomib beschrieben wird. Dass in den Studien vergleichbare Bortezomibkonzentrationen verwendet wurden, wird in der nachfolgenden Tabelle verdeutlicht.

Autor	Tumorentität	Bortezomib-konzentration	Behandlungsdauer	Bestrahlungsdosis
(Cui et al., 2015)	Cervixkarzinom	5 nM; 10 nM	24 Stunden	0 – 8 Gy
(Kamer et al., 2009)	Cervixkarzinom	10 nM	24 Stunden	0 – 8 Gy
(Wu et al., 2018)	Orales Plattenepithelkarzinom	25 nM; 30 nM	24 Stunden	0 – 8 Gy
(Weber et al., 2007)	Kopf-Hals-Tumore	10 nM	1 Stunde	2 Gy
(Lioni et al., 2008)	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	10 nM	4 Stunden	2 Gy
(Rae et al., 2013)	Neuroblastom	3 nM; 5 nM	24 Stunden	0 – 8 Gy

Tabelle 22: Verwendete Bortezomibkonzentrationen bei Beispielen für eine Radiosensitivierung durch Bortezomib bei verschiedenen Tumorentitäten aus der Literatur

Wie die Ergebnisse des alamarBlue Assays und des Colony Formation Assays nach Behandlung mit Bortezomib zeigen, wurde das Überleben der Glioblastomzellen bereits durch relativ niedrige Bortezomibkonzentrationen deutlich reduziert. Effekte auf den Zellzyklus zeigten sich aber vor allem bei höheren Bortezomibkonzentrationen. Als Kompromiss wurde folglich für die kombinierte Behandlung der Glioblastomzellen mit Bortezomib und Bestrahlung

eine Behandlungsdauer von 24 Stunden mit 10 nM bzw. 20 nM Bortezomib verwendet.

5.2.2 Diskussion der Colony Formation Assays nach Kombinationsbehandlung mit Bortezomib und Bestrahlung

Sowohl die alleinige Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden als auch die alleinige Bestrahlung führte bei den Glioblastomzelllinien LN18, LN229 und U251 zu einer signifikanten Reduktion der Survival Fraction. Für die kombinierte Behandlung der Glioblastomzellen mit Bortezomib und Bestrahlung wurde aufgrund der zuvor aufgeführten Faktoren folgendes Vorgehen gewählt: die Zelllinien LN18, LN229 und U251 wurden für 24 Stunden mit 10 nM oder 20 nM Bortezomib behandelt und anschließend mit Dosen von 1 Gy bis 8 Gy bestrahlt und das klonogene Zellüberleben bestimmt. Um den Effekt des G₂M-Arrests zu nutzen, erfolgte die Bestrahlung 24 Stunden nach der Bortezomibbehandlung. In weiteren Versuchen könnten diese Ergebnisse zudem mit den Effekten einer simultanen Bortezomibgabe zur Bestrahlung oder einer Verabreichung von Bortezomib nach der Bestrahlung verglichen werden.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 G₂M-Arrest durch Bortezomib

Der Proteasominhibitor Bortezomib induzierte bei verschiedenen Glioblastomzelllinien einen Arrest in der G₂M-Phase des Zellzyklus. Der Effekt war größer, je höher die Bortezomibkonzentration und je länger die Behandlungsdauer waren. Nach 48 Stunden war der Effekt wieder rückläufig.

Yin et al. beschreiben ebenfalls eine Zunahme des Anteils an Zellen in der G₂M-Phase bei sechs Glioblastomzelllinien (Yin et al., 2005). Auch bei anderen Tumorentitäten konnte eine Beeinflussung des Zellzyklus durch Bortezomib nachgewiesen werden. Bei der Zelllinie TE12 eines humanen Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus führte die Behandlung mit 10 nM Bortezomib zu einer zeitabhängigen Zunahme der Zellen in der G₂M-Phase (Lioni et al., 2008). Der maximale Effekt wurde hier allerdings nach 48 Stunden beobachtet. Auch bei Prostatakarzinomzellen der Zelllinie PC-3-*Bcl-2* konnte eine Zunahme des Zellanteils in der G₂M-Phase nach Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden

nachgewiesen werden (Cao et al., 2008). Für die Zelllinie PC-3-Neo konnte dieser Effekt allerdings nicht bestätigt werden. Labussière et al. konnten anhand zweier Glioblastom-Xenograft-Modelle zeigen, dass Bortezomib keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellzyklusphasen hat (Labussiere, Pinel, Delfortrie, Plenat, & Chastagner, 2008). Sie führen zwei mögliche Gründe für die widersprüchlichen Ergebnisse im Vergleich zu den in-vitro-Daten von Yin et al. an. Etablierte Zellkulturzelllinien würden nicht die Heterogenität von Zellen in Tumoren widerspiegeln, Xenograft-Modelle kämen dieser Tatsache näher. Zudem würden Zellen in Xenograft-Modellen nicht so hohe Wirkstoffkonzentrationen erhalten, wie Zellen in einer einschichtigen Zellkultur.

Aus in-vitro-Experimenten ist bekannt, dass Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen eine unterschiedliche Radiosensitivität aufweisen (Syljuåsen, 2019). Die höchste Resistenz gegenüber einer Bestrahlung weisen Zellen in der späten S-Phase auf. Die höchste Strahlensensibilität wird in der M-Phase beobachtet. Die genauen Mechanismen sind nicht vollständig geklärt. Ein Grund für die Strahlenresistenz in der späten S-Phase ist die Reparatur von Strahlenschäden mittels homologer Rekombination, nachdem die DNA-Replikation stattgefunden hat. Die Verabreichung einer Chemotherapie, welche die Zellzyklusverteilung beeinflusst, soll die Effektivität der Bestrahlung erhöhen. Der Zeitpunkt der Chemotherapie spielt somit eine wichtige Rolle.

Ziel der Behandlung der Glioblastomzellen mit dem Proteasominhibitor Bortezomib war die Zunahme an Zellen in der radiosensitiven G₂M-Phase des Zellzyklus und in der Folge eine Steigerung der Radiosensitivität der Tumorzellen.

5.3.2 Radiosensitivierung durch Bortezomib

Strahlentherapie bildet einen Teil der Standardtherapie des Glioblastoms (Stupp et al., 2005). Ein Grund für die schlechte Prognose dieser Tumorerkrankung ist die Resistenz der Glioblastomzellen gegenüber der Bestrahlung (Ali et al., 2020). Daher ist es erforderlich Methoden zu finden, die die Radiosensitivität von Glioblastomzellen erhöhen.

In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele für eine Radiosensitivierung durch den Proteasominhibitor Bortezomib bei verschiedenen Tumorentitäten (vgl. Tabelle 2). Bei den Zervixkarzinomzelllinien HeLa und SiHa führten eine

Behandlung mit 5 nM oder 10 nM Bortezomib für 24 Stunden und eine Bestrahlung unter Hypoxie oder Normoxie zu einem Anstieg der SER (Cui et al., 2015). Dieser Effekt war unter hypoxischen Bedingungen ausgeprägter. Kamer et al. konnten bei denselben Cervixkarzinomzelllinien nach Behandlung mit 10 nM Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung nur bei der Zelllinie SiHa eine Radiosensitivierung nachweisen, nicht aber bei der Zelllinie HeLa (Kamer et al., 2009). Als Ursache wird die unterschiedliche Abhängigkeit der Zellen von NF- κ B genannt. Auch beim oralen Plattenepithelkarzinom konnten Wu et al. eine Radiosensitivierung nach Kombination aus 25 nM oder 30 nM Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung nachweisen (Wu et al., 2018). Bortezomib erhöhte die Radiosensitivität durch Hemmung des strahleninduzierten TRAF6-NF κ B-Signalwegs. Die Kombinationsbehandlung erhöhte den Effekt zusätzlich durch eine Downregulation des TRAF6-Akt-Signalwegs. Bei Neuroblastomzellen führte die Kombination aus 3 nM oder 5 nM Bortezomib für 24 Stunden und Bestrahlung zu einem synergistischen Effekt auf den klonogenen Zelltod (Rae et al., 2013). Die Dose Enhancement Ratio (DER) 50 % konnte durch Bortezomib erhöht werden. Der Effekt war bei einer höheren Bortezomibkonzentration ausgeprägter. Labussière et al. zeigen darüber hinaus, dass die Radiosensitivierung von Glioblastomzellen durch Bortezomib durch eine Fraktionierung der Bestrahlung, wie sie im klinischen Setting üblich ist, verloren geht (Labussiere, Pinel, Vandamme, Plenat, & Chastagner, 2011).

In dieser Arbeit wurden zwei wesentliche Wirkungen von Bortezomib auf Glioblastomzellen untersucht. Neben dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Arrest der Zellen in der radiosensitiven G₂M-Phase, führte Bortezomib zu einer Abnahme des klonogenen Zellüberlebens. Sowohl die Bestrahlung mit mindestens 2 Gy als auch die Behandlung mit Bortezomibkonzentrationen von mindestens 5 nM führten bei den Glioblastomzelllinien LN18, LN229 und U251 zu einer signifikanten Reduktion der Survival Fraction. Im Verhalten gegenüber Bortezomib unterschieden sich die Zelllinien kaum voneinander. In Bezug auf die Bestrahlung zeigten sich vor allem bei höheren Dosen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien. Die höchste Sensitivität gegenüber der Bestrahlung konnte in abnehmender Reihenfolge bei LN229, LN18 und schließlich U251 nachgewiesen werden. Auch die Kombination aus Bortezomibbehandlung mit 10 nM oder 20 nM für 24 Stunden und nachfolgender

Bestrahlung führte teilweise zu einer signifikanten Reduktion der Survival Fraction der drei Glioblastomzelllinien im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (0 nM Bortezomib). Die genauen Ergebnisse sind in den Abbildungen 19 – 21 dargestellt. Es stellt sich die Frage, ob die Kombinationsbehandlung mit Bortezomib und Bestrahlung effektiver ist als die Behandlung mit Bortezomib oder Bestrahlung allein. Wie in Tabelle 23 dargestellt, konnte die D_{50} mit steigender Bortezomibkonzentration bei allen Glioblastomzelllinien reduziert werden. Auch die SER (50 %) stieg mit zunehmender Bortezomibkonzentration bei LN18, LN229 und U251 an. In der Literatur findet man kein einheitliches Maß zur Bestimmung der Radiosensitivierung verschiedener Substanzen in Kombination mit Bestrahlung. In einem weiteren Schritt könnte mit Hilfe von Interaktionsindices und Isobologrammen analysiert werden, ob die kombinierte Behandlung von Glioblastomzellen mit Bortezomib und Bestrahlung zu einer additiven oder synergistischen bzw. supraadditiven Wirkung führt.

Bortezomib-konzentration	LN18 D_{50} SER (50 %)	LN229 D_{50} SER (50 %)	U251 D_{50} SER (50 %)
0 nM	2,69 Gy 1,00	2,02 Gy 1,00	2,55 Gy 1,00
10 nM	2,06 Gy 1,32	1,40 Gy 1,45	1,83 Gy 1,39
20 nM	1,51 Gy 1,82	1,19 Gy 1,71	1,73 Gy 1,48

Tabelle 23: Vergleich der D_{50} und SER (50 %) von LN18, LN229 und U251 nach Behandlung mit 10 nM oder 20 nM Bortezomib für 24 Stunden und nachfolgender Bestrahlung

Insgesamt könnte die Behandlung von Glioblastompatienten mit dem Proteasominhibitor Bortezomib in Kombination mit Bestrahlung eine innovative Behandlungsoption darstellen. Es bedarf allerdings noch weiterer Forschung, um aus den teilweise widersprüchlichen in-vitro- und in-vivo-Daten ein effektives Therapiekonzept zu entwickeln.

5.4 Ausblick

Patienten mit der Erstdiagnose eines Glioblastoms erhalten noch heute eine Therapie nach dem Stupp-Protokoll (Gozdz, 2023). Bei nahezu allen Patienten treten im Verlauf Rezidive auf, für die es keine standardisierten Therapiekonzepte gibt. Klinische Studien zur Evaluation neuer Therapieoptionen werden daher größtenteils mit diesen Patienten durchgeführt.

Auch eine Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib wird in mehreren klinischen Studien untersucht. Kubicek et al. haben in einer Phase-I-Studie zunächst gezeigt, dass Bortezomib in der üblichen Dosierung von 1,3 mg/ m² zusammen mit Bestrahlung und Temozolomid sicher und effektiv ist (Kubicek et al., 2009). In einer Phase-II-Studie haben Kong et al. 24 Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom mit simultaner Radiochemotherapie mit Bortezomib und Temozolomid behandelt, gefolgt von einer Erhaltungstherapie mit Bortezomib und Temozolomid (Kong et al., 2018). Im Vergleich zu historischen Daten zeigten vor allem Patienten mit MGMT-Promotormethylierung ein besseres progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben. Die Ergebnisse der Studie erschienen erfolgsversprechend, die niedrige Patientenzahl limitierte allerdings die Aussagekraft der Studie. In einer Phase-III-Studie mit über 700 Patienten wurde die Kombination des Proteasominhibitors Marizomib mit Temozolomid und Strahlentherapie untersucht (Gozdz, 2023). Bisher konnte keine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens oder des Gesamtüberlebens nachgewiesen werden.

Bei der Etablierung einer Glioblastomtherapie mit dem Proteasominhibitor Bortezomib müssen auch einige Probleme in Betracht gezogen werden. Bei allen medikamentösen Therapien besteht die Möglichkeit einer Resistenzentwicklung (Gozdz, 2023). Ob diese auch bei Glioblastompatienten gegen Bortezomib auftritt, muss in zukünftigen Studien untersucht werden. Zudem gibt es Hinweise, dass genetische Faktoren wie der p53-Status eine Rolle für den Erfolg einer Therapie mit Proteasominhibitoren spielen. Daher müsste zunächst das molekulare und genetische Profil der einzelnen Glioblastompatienten analysiert werden. Bota et al. haben gezeigt, dass eine Behandlung von GSC (Glioma stem-like cells) mit Bortezomib zu einer Zunahme von HIF-1 α und VEGF führt (Bota et al., 2013). Der Effekt konnte durch eine Kombination mit Bevacizumab

antagonisiert werden. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Bortezomib die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann und somit keine ausreichende therapeutische Dosis des Proteasominhibitors im zentralen Nervensystem erreicht wird. Huehnchen et al. haben gezeigt, dass Bortezomib sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen ohne maligne Erkrankung des ZNS die Blut-Hirn-Schranke nur in geringem Maße überwinden kann (Huehnchen et al., 2020). Auch Wang et al. haben gezeigt, dass Bortezomib zwar in einem subkutanen in-vivo-Modell wirksam ist, nicht aber in einem intrakraniellen Tumormodell (W. Wang et al., 2018). Bei direkter Applikation von Bortezomib in den Tumor zeigte sich dagegen eine Wirksamkeit. Andere Autoren publizieren, dass die im Tumor veränderte Permeabilität der Blut-Hirn- bzw. Blut-Tumor-Schranke eine Wirksamkeit von Bortezomib im ZNS doch möglich machen kann (Arvanitis, Ferraro, & Jain, 2020; Rahman et al., 2019).

Proteasominhibitoren wie Bortezomib, die durch ihre vielfältigen Wirkmechanismen zahlreiche Zellfunktionen beeinflussen, scheinen trotz allem für die heterogene Erkrankung Glioblastom eine vielversprechende Therapieoption zu sein. Es bedarf weiterer Studien, um die zuvor genannten Probleme zu antizipieren und um ein effektives Therapieregime zu etablieren.

6 Zusammenfassung

Das Glioblastom ist der häufigste und aggressivste maligne Hirntumor bei Erwachsenen (Thakkar et al., 2014). Die Überlebensraten nach Diagnosestellung liegen bei 15 Monaten. Trotz intensiver Forschung an neuen Therapieoptionen zeigt sich seit Jahren keine wesentliche Verbesserung der infausten Prognose dieser Erkrankung. Nach wie vor bilden Chirurgie, Radio- und Chemotherapie die Hauptsäulen der Behandlung des Glioblastoms (Stupp et al., 2005).

In der Literatur wird eine Radiosensitivierung durch den Proteasominhibitor Bortezomib bei verschiedenen Tumorentitäten beschrieben (vgl. Tabelle 2). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Bortezomib zu einem Arrest von Zellen in der radiosensitiven G₂M-Phase des Zellzyklus führt (Vlachostergios et al., 2012).

Ziel der Arbeit war daher die Untersuchung additiver Effekte einer kombinierten Behandlung mit Bortezomib und Röntgenstrahlung auf verschiedene Glioblastomzelllinien. Das Überleben der Glioblastomzellen wurde dabei mittels Colony Formation Assays bestimmt. Zudem wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen der Glioblastomzellen nach Behandlung mit Bortezomib analysiert.

Eine Behandlung von Zellen der Glioblastomzelllinie LN18 mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen und Fixierung nach unterschiedlichen Zeitpunkten führte zu einem zeit- und konzentrationsabhängigen Arrest in der radiosensitiven G₂M-Phase. Signifikante Unterschiede zeigten sich ab einer Behandlungsdauer von mindestens acht Stunden und einer Bortezomibkonzentration von 20 nM. Eine Behandlung verschiedener Glioblastomzelllinien (LN18, LN229, U251) für 24 Stunden zeigte ebenfalls einen Arrest der Zellen in der G₂M-Phase. Hierbei zeigten sich bei LN18 und LN229 signifikante Unterschiede ab einer Bortezomibkonzentration von 20 bzw. 40 nM und bei U251 ab 40 nM.

Im alamarBlue Assay wurde die Toxizität von Bortezomib auf die verschiedenen Glioblastomzelllinien untersucht. Es zeigten sich Unterschiede abhängig von der Dauer und Konzentration der Bortezomibbehandlung sowie von der Zelllinie.

Das Überleben der Glioblastomzellen wurde im Colony Formation Assay zunächst nach alleiniger 24-stündiger Behandlung mit Bortezomib untersucht.

Bei allen Zelllinien (LN18, LN229, U251) zeigte sich bereits ab Bortezomibkonzentrationen von 5 nM eine signifikante Reduktion der Survival Fraction. Auch eine Bestrahlung mit Röntgenstrahlung führte ab einer Dosis von 2 Gy bei LN18, LN229 und U251 zu einer signifikanten Reduktion der Survival Fraction. Die höchste Resistenz gegenüber der Bestrahlung wies dabei die Zelllinie U251 auf. LN229 reagierte am sensibelsten auf die Bestrahlung. Bortezomib führte zu einer konzentrationsabhängigen Radiosensitivierung bei LN18, LN229 und U251.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Proteasominhibitor Bortezomib in Kombination mit Bestrahlung einen vielversprechenden Ansatz zur Überwindung der Therapieresistenz bei Glioblastomen darstellen könnte. Die vorliegenden experimentellen Daten liefern erste Hinweise auf das therapeutische Potenzial dieser Kombination. Für eine Übertragung in die klinische Anwendung sind jedoch weiterführende präklinische Untersuchungen und klinische Studien erforderlich, um Wirksamkeit und Sicherheit umfassend zu evaluieren.

7 Abstract

Glioblastoma is the most common and aggressive malignant brain tumor in adults, with an average survival rate of 15 months after diagnosis. Despite extensive research, prognosis has not improved significantly in recent years, with standard treatment still consisting of surgery, radio- and chemotherapy.

Current literature highlights the radiosensitizing potential of the proteasome inhibitor Bortezomib in various tumors, with reports suggesting it induces arrest in the radiosensitive G₂M phase of the cell cycle.

This study aimed to analyze the additive effects of Bortezomib and radiation on glioblastoma cell lines. Cell survival was assessed using colony formation assays. Cell cycle distribution was analyzed following Bortezomib treatment.

Treatment of LN18 with varying Bortezomib concentrations led to a time and concentration dependent arrest in the G₂M phase, with significant effects seen after at least eight hours and 20 nM Bortezomib. A 24-hour treatment with Bortezomib also induced G₂M phase arrest in LN18, LN229 and U251 cells, with significant effects at 20 nM and 40 nM for LN18 and LN229 and at 40 nM for U251.

Bortezomib toxicity was measured using alamarBlue assays. Cell viability decreased depending on treatment duration, concentration and cell line.

Colony formation assays after 24 hours showed a significant reduction in survival fraction for all cell lines starting from 5 nM Bortezomib. Radiation with doses ≥ 2 Gy also significantly reduced survival, with U251 being most resistant and LN229 most sensitive to radiation. Bortezomib enhanced radiosensitivity in all three cell lines in a concentration dependent manner.

These results suggest that combining Bortezomib with radiation may offer a promising strategy to overcome glioblastoma therapy resistance. Further preclinical and clinical studies are needed to validate these findings.

8 Literaturverzeichnis

- Accardi, F., Toscani, D., Bolzoni, M., Dalla Palma, B., Aversa, F., & Giuliani, N. (2015). Mechanism of Action of Bortezomib and the New Proteasome Inhibitors on Myeloma Cells and the Bone Microenvironment: Impact on Myeloma-Induced Alterations of Bone Remodeling. *Biomed Res Int*, 2015, 172458. doi:10.1155/2015/172458
- Adams, J. (2004). The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*, 4(5), 349–360. doi:10.1038/nrc1361
- Ali, M. Y., Oliva, C. R., Noman, A. S. M., Allen, B. G., Goswami, P. C., Zakharia, Y., . . . Griguer, C. E. (2020). Radioresistance in Glioblastoma and the Development of Radiosensitizers. *Cancers (Basel)*, 12(9), 2511. doi:10.3390/cancers12092511
- Arvanitis, C. D., Ferraro, G. B., & Jain, R. K. (2020). The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*, 20(1), 26–41. doi:10.1038/s41568-019-0205-x
- Bota, D. A., Alexandru, D., Keir, S. T., Bigner, D., Vredenburg, J., & Friedman, H. S. (2013). Proteasome inhibition with bortezomib induces cell death in GBM stem-like cells and temozolomide-resistant glioma cell lines, but stimulates GBM stem-like cells' VEGF production and angiogenesis. *Journal of neurosurgery*, 119(6), 1415–1423. doi:10.3171/2013.7.JNS1323
- Cao, W., Shiverick, K. T., Namiki, K., Sakai, Y., Porvasnik, S., Urbanek, C., & Rosser, C. J. (2008). Docetaxel and bortezomib downregulate Bcl-2 and sensitize PC-3-Bcl-2 expressing prostate cancer cells to irradiation. *World J Urol*, 26(5), 509–516. doi:10.1007/s00345-008-0289-5
- Cui, H., Qin, Q., Yang, M., Zhang, H., Liu, Z., Yang, Y., . . . Wang, Z. (2015). Bortezomib enhances the radiosensitivity of hypoxic cervical cancer cells by inhibiting HIF-1 α expression. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(8), 9032–9041. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26464645>
- Davis, M. E. (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs*, 20(5 Suppl), S2–8. doi:10.1188/16.CJON.S1.2-8
- Dou, Q. P., & Zonder, J. A. (2014). Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system. *Curr Cancer Drug Targets*, 14(6), 517–536. doi:10.2174/1568009614666140804154511
- Goktas, S., Baran, Y., Ural, A. U., Yazici, S., Aydur, E., Basal, S., . . . Beyzadeoglu, M. (2010). Proteasome inhibitor bortezomib increases radiation sensitivity in androgen independent human prostate cancer cells. *Urology*, 75(4), 793–798. doi:10.1016/j.urology.2009.07.1215
- Gozdz, A. (2023). Proteasome Inhibitors against Glioblastoma-Overview of Molecular Mechanisms of Cytotoxicity, Progress in Clinical Trials, and Perspective for Use in Personalized Medicine. *Curr Oncol*, 30(11), 9676–9688. doi:10.3390/curroncol30110702

- Gritsch, S., Batchelor, T. T., & Gonzalez Castro, L. N. (2022). Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer*, 128(1), 47–58. doi:10.1002/cncr.33918
- Hall, E. J., & Giaccia, A. J. (2012a). Cell Survival Curves. In C. W. Mitchell (Ed.), *Radiobiology for the radiologist* (7 ed., pp. 35–53). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hall, E. J., & Giaccia, A. J. (2012b). Molecular Mechanisms of DNA and Chromosome Damage and Repair. In C. W. Mitchell (Ed.), *Radiobiology for the radiologist* (7 ed., pp. 12–34). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hall, E. J., & Giaccia, A. J. (2012c). Physics and Chemistry of Radiation Absorption. In C. W. Mitchell (Ed.), *Radiobiology for the radiologist* (7 ed., pp. 3–11). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hall, E. J., & Giaccia, A. J. (2012d). Radiosensitivity and Cell Age in the Mitotic Cycle. In C. W. Mitchell (Ed.), *Radiobiology for the radiologist* (7 ed., pp. 54–66). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Han, S., Liu, Y., Cai, S. J., Qian, M., Ding, J., Larion, M., . . . Yang, C. (2020). IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br J Cancer*, 122(11), 1580–1589. doi:10.1038/s41416-020-0814-x
- Huehnchen, P., Springer, A., Kern, J., Kopp, U., Kohler, S., Alexander, T., . . . Endres, M. (2020). Bortezomib at therapeutic doses poorly passes the blood-brain barrier and does not impair cognition. *Brain Commun*, 2(1), fcaa021. doi:10.1093/braincomms/fcaa021
- Iwade, Y. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett*, 11(3), 1615–1620. doi:10.3892/ol.2016.4113
- Kamer, S., Ren, Q., & Dicker, A. P. (2009). Differential radiation sensitization of human cervical cancer cell lines by the proteasome inhibitor velcade (bortezomib, PS-341). *Arch Gynecol Obstet*, 279(1), 41–46. doi:10.1007/s00404-008-0667-7
- Kong, X.-T., Nguyen, N. T., Choi, Y. J., Zhang, G., Nguyen, H. N., Filka, E., . . . Lai, A. (2018). Phase 2 Study of Bortezomib Combined With Temozolomide and Regional Radiation Therapy for Upfront Treatment of Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: Safety and Efficacy Assessment. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 100(5), 1195–1203. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.01.001>
- Kubicek, G. J., Werner-Wasik, M., Machtay, M., Mallon, G., Myers, T., Ramirez, M., . . . Dicker, A. P. (2009). Phase I trial using proteasome inhibitor bortezomib and concurrent temozolomide and radiotherapy for central nervous system malignancies. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 74(2), 433–439. doi:10.1016/j.ijrobp.2008.08.050
- Labussiere, M., Pinel, S., Delfortrie, S., Plenat, F., & Chastagner, P. (2008). Proteasome inhibition by bortezomib does not translate into efficacy on

- two malignant glioma xenografts. *Oncol Rep*, 20(5), 1283–1287. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949434>
- Labussiere, M., Pinel, S., Vandamme, M., Plenat, F., & Chastagner, P. (2011). Radiosensitizing properties of bortezomib depend on therapeutic schedule. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 79(3), 892–900. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.09.051
- Lioni, M., Noma, K., Snyder, A., Klein-Szanto, A., Diehl, J. A., Rustgi, A. K., . . . Smalley, K. S. (2008). Bortezomib induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cancer Ther*, 7(9), 2866–2875. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0391
- Liu, J., Shen, L., Tang, G., Tang, S., Kuang, W., Li, H., . . . Zhou, Q. (2020). Multiple extracranial metastases from glioblastoma multiforme: a case report and literature review. *J Int Med Res*, 48(6), 1–10. doi:10.1177/0300060520930459
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., . . . Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131(6), 803–820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., . . . Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*, 23(8), 1231–1251. doi:10.1093/neuonc/noab106
- Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., & Herskind, C. (2016). Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int J Mol Sci*, 17(1), 102. doi:10.3390/ijms17010102
- Manasanch, E. E., & Orlowski, R. Z. (2017). Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(7), 417–433. doi:10.1038/nrclinonc.2016.206
- Nguyen, H. S., Shabani, S., Awad, A. J., Kaushal, M., & Doan, N. (2018). Molecular Markers of Therapy-Resistant Glioblastoma and Potential Strategy to Combat Resistance. *Int J Mol Sci*, 19(6), 1765. doi:10.3390/ijms19061765
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 19(4), 764–772. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
- Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., . . . Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol*, 16(7), 896–913. doi:10.1093/neuonc/nou087
- Paramore, A., & Frantz, S. (2003). Bortezomib. *Nat Rev Drug Discov*, 2(8), 611–612. doi:10.1038/nrd1159
- Rae, C., Tesson, M., Babich, J. W., Boyd, M., & Mairs, R. J. (2013). Radiosensitization of noradrenaline transporter-expressing tumour cells

- by proteasome inhibitors and the role of reactive oxygen species. *EJNMMI Res*, 3(1), 73. doi:10.1186/2191-219X-3-73
- Rahman, M. A., Gras Navarro, A., Brekke, J., Engelsen, A., Bindesboll, C., Sarowar, S., . . . Chekenya, M. (2019). Bortezomib administered prior to temozolomide depletes MGMT, chemosensitizes glioblastoma with unmethylated MGMT promoter and prolongs animal survival. *Br J Cancer*, 121(7), 545–555. doi:10.1038/s41416-019-0551-1
- Reardon, D. A., Turner, S., Peters, K. B., Desjardins, A., Gururangan, S., Sampson, J. H., . . . Friedman, H. S. (2011). A review of VEGF/VEGFR-targeted therapeutics for recurrent glioblastoma. *J Natl Compr Canc Netw*, 9(4), 414–427. doi:10.6004/jnccn.2011.0038
- Robak, P., & Robak, T. (2019). Bortezomib for the Treatment of Hematologic Malignancies: 15 Years Later. *Drugs in R&D*, 19(2), 73–92. doi:10.1007/s40268-019-0269-9
- Russo, S. M., Tepper, J. E., Baldwin, A. S., Jr., Liu, R., Adams, J., Elliott, P., & Cusack, J. C., Jr. (2001). Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappaB. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 50(1), 183–193. doi:10.1016/s0360-3016(01)01446-8
- Rycaj, K., & Tang, D. G. (2014). Cancer stem cells and radioresistance. *Int J Radiat Biol*, 90(8), 615–621. doi:10.3109/09553002.2014.892227
- Saadeh, F. S., Mahfouz, R., & Assi, H. I. (2018). EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. *Int J Biol Markers*, 33(1), 22–32. doi:10.5301/ijbm.5000301
- Schulz, A., Meyer, F., Dubrovskaya, A., & Borgmann, K. (2019). Cancer Stem Cells and Radioresistance: DNA Repair and Beyond. *Cancers (Basel)*, 11(6), 862. doi:10.3390/cancers11060862
- Schwartz, R., & Davidson, T. (2004). Pharmacology, pharmacokinetics, and practical applications of bortezomib. *Oncology (Williston Park)*, 18(14 Suppl 11), 14–21. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688598>
- Selleckchem. (o. J.). Datasheet Bortezomib. Retrieved from <https://www.selleckchem.com/datasheet/Bortezomib-S101314-DataSheet.html>
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63(18), 5821–5828. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522905>
- STADAPHARM. (2021). Fachinformation Bortezomib STADA 2,5mg/ml Injektionslösung. Retrieved from https://www.stada.de/media/1mrii1my/bortezomib-stada-2-5-mg-ml-injektionsloesung_202106_vera-ff20211021.pdf
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., . . . National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for

- glioblastoma. *N Engl J Med*, 352(10), 987–996. doi:10.1056/NEJMoa043330
- Stupp, R., Wong, E. T., Kanner, A. A., Steinberg, D., Engelhard, H., Heidecke, V., . . . Gutin, P. H. (2012). NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer*, 48(14), 2192–2202. doi:10.1016/j.ejca.2012.04.011
- Syljuåsen, R. G. (2019). Cell Cycle Effects in Radiation Oncology. In F. Wenz (Ed.), *Radiation Oncology* (pp. 1–8). Cham: Springer International Publishing.
- Tamatani, T., Takamaru, N., Hara, K., Kinouchi, M., Kuribayashi, N., Ohe, G., . . . Miyamoto, Y. (2013). Bortezomib-enhanced radiosensitization through the suppression of radiation-induced nuclear factor-kappaB activity in human oral cancer cells. *Int J Oncol*, 42(3), 935–944. doi:10.3892/ijo.2013.1786
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23(10), 1985–1996. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0275
- Urbanska, K., Sokolowska, J., Szmidt, M., & Sysa, P. (2014). Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn)*, 18(5), 307–312. doi:10.5114/wo.2014.40559
- Vlachostergios, P. J., Voutsadakis, I. A., & Papandreou, C. N. (2012). The ubiquitin-proteasome system in glioma cell cycle control. *Cell Div*, 7(1), 18. doi:10.1186/1747-1028-7-18
- Wang, D., Qin, Q., Jiang, Q. J., & Wang, D. F. (2016). Bortezomib sensitizes esophageal squamous cancer cells to radiotherapy by suppressing the expression of HIF-1alpha and apoptosis proteins. *J Xray Sci Technol*, 24(4), 639–646. doi:10.3233/XST-160571
- Wang, W., Cho, H. Y., Rosenstein-Sisson, R., Marin Ramos, N. I., Price, R., Hurth, K., . . . Chen, T. C. (2018). Intratumoral delivery of bortezomib: impact on survival in an intracranial glioma tumor model. *Journal of neurosurgery*, 128(3), 695–700. doi:10.3171/2016.11.JNS161212
- Weber, C. N., Cerniglia, G. J., Maity, A., & Gupta, A. K. (2007). Bortezomib sensitizes human head and neck carcinoma cells SQ20B to radiation. *Cancer Biol Ther*, 6(2), 156–159. doi:10.4161/cbt.6.2.3556
- Weller, M., Knobbe-Thomsen, C. B., Le Rhun, E., & Reifenberger, G. (2022). Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems 2021. *Der Onkologe*, 28(2), 155–163. doi:10.1007/s00761-021-01083-7
- Wick, W. (2021). S2k-Leitlinie Gliome. In *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Berlin: Deutsche Gesellschaft für Neurologie.
- Wilson, T. A., Karajannis, M. A., & Harter, D. H. (2014). Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int*, 5, 64. doi:10.4103/2152-7806.132138

- Wu, Y. H., Wu, W. S., Lin, L. C., Liu, C. S., Ho, S. Y., Wang, B. J., . . . Wang, Y. J. (2018). Bortezomib enhances radiosensitivity in oral cancer through inducing autophagy-mediated TRAF6 oncoprotein degradation. *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1), 91. doi:10.1186/s13046-018-0760-0
- Yin, D., Zhou, H., Kumagai, T., Liu, G., Ong, J. M., Black, K. L., & Koeffler, H. P. (2005). Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). *Oncogene*, 24(3), 344–354. doi:10.1038/sj.onc.1208225

9 Danksagung

Erst die Unterstützung durch zahlreiche Personen hat diese Arbeit möglich gemacht. Für die vielfältig erfahrene Hilfe möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Combs, die mein Interesse an experimenteller wissenschaftlicher Arbeit geweckt hat und mir die Möglichkeit gegeben hat, diese an Ihrer Klinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie zu verwirklichen.

Ebenso möchte ich meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Schmid für seine Hilfe, Ratschläge und Ideen danken. Auch sein großes Fachwissen hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Schilling danke ich für ihre enorme Hilfsbereitschaft und ihr Engagement. Danke für die unermüdliche Hilfe bei den Auswertungen meiner Daten und die aufwändigen Anmerkungen sowie konstruktive Kritik zu meiner Arbeit.

Meine Dankbarkeit gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors, die mir mit ihrer Erfahrung, Rat und Tat stets zur Seite standen und mich liebevoll in ihr Team aufgenommen haben.

Meinen Eltern, meiner Schwester Lisa und meinem Mann Patrick möchte ich für ihr offenes Ohr und ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums und darüber hinaus danken.