



**FRIEDRICH-SCHILLER-  
UNIVERSITÄT  
JENA**



**Der Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Induktion  
NANOG-exprimierender pathologischer und nicht-pathologischer  
meningealer Zellen und deren Bedeutung für die Tumorgenese**

Dissertation  
zur Erlangung des  
akademischen Grades

doctor medicinae  
(Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von  
Lukas Maximilian Christof Hain  
geboren am 20. Januar 1995 in Erlangen

Für

Dr. jur.  
Alfons Felber

*Plus Ultra*

*Devise des deutschen Kaisers Karl V. (HRR)  
(1500 – 1558)*

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Jan Walter
2. Prof. Dr. med. Matthias Schwab
3. PD Dr. med. Patrick Naumann

Ort und Tag der öffentlichen Verteidigung: Jena, 06.02.2024

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	
<b>2</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>3</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>4.1</b>	<b>Meningeome</b> .....	<b>3</b>
4.1.1	Epidemiologie und klinische Situation der Meningeome .....	3
4.1.2	Ätiologie, Risikofaktoren und Tumorbilogie .....	4
4.1.3	Ionisierende Strahlung als gesicherter Risikofaktor für Meningeome .....	6
4.1.4	Diagnostische Marker für meningeale Neoplasien .....	6
<b>4.2</b>	<b>Die Stammzellhypothese – das Scharnier zwischen Ursache und Wirkung</b> .....	<b>8</b>
4.2.1	Marker und Targets auf Gen- und Proteinebene .....	9
4.2.2	Die Interleukine – Vermittler der CSC .....	13
4.2.3	Epithelial-mesenchymale Transition .....	15
<b>5</b>	<b>ZIELE DER ARBEIT</b> .....	<b>17</b>
<b>6</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>18</b>
<b>6.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>18</b>
6.1.1	Zellkulturen und Patientenproben .....	18
6.1.2	Chemikalien/Reagenzien .....	18
6.1.3	Reaktionslösungen zur mRNA-Isolation .....	20
6.1.4	Verbrauchsmittel .....	20
6.1.5	Geräte .....	21
6.1.6	Kits und Lösungen.....	22
6.1.7	Primer.....	23
6.1.8	Antikörper.....	24
6.1.9	Software .....	25
<b>6.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>26</b>
6.2.1	Bestrahlung, Zellkultivierung, Probenentnahme und Zellmorphologie .....	26
6.2.2	Isolation der mRNA .....	29
6.2.3	Herstellung von komplementärer DNA .....	29

6.2.4	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion .....	30
6.2.5	Immunfluoreszenzfärbung .....	32
6.2.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	33
6.2.7	Analyse und statistische Tests .....	34
<b>7</b>	<b>RESULTATE .....</b>	<b>36</b>
<b>7.1</b>	<b>Einfluss der ionisierenden Strahlung auf Morphologie und Wachstumsverhalten .....</b>	<b>36</b>
7.1.1	Deskriptive Veränderungen der Zell- und Kulturmorphologie in Abhängigkeit von der Strahlendosis .....	36
7.1.2	Der Einfluss der Bestrahlung auf die Proliferation von Dura mater- und Meningeomzellen .....	39
<b>7.2</b>	<b>Expressionsanalysen .....</b>	<b>44</b>
7.2.1	Strahleninduzierte Proteinexpressionen .....	44
7.2.2	Strahleninduzierte mRNA-Expressionen .....	49
<b>7.3</b>	<b>Interleukin-Sekretion unter Bestrahlung.....</b>	<b>59</b>
7.3.1	Veränderungen der absoluten Interleukin-Konzentrationen unter ionisierender Strahlung .....	59
<b>8</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>69</b>
<b>8.1</b>	<b>Dura mater-Zellen entwickeln nach Bestrahlung eine Meningeom-ähnliches Expressionsprofil .....</b>	<b>70</b>
<b>8.2</b>	<b>Strahleninduzierte Malignisierung der Meningeome .....</b>	<b>76</b>
<b>8.3</b>	<b>Bedeutung der Interleukine für Tumorinduktion und Tumorinduktion .....</b>	<b>82</b>
<b>8.4</b>	<b><i>NANOG1</i> und <i>NANOGP8</i> als CSC-Induktoren .....</b>	<b>83</b>
<b>8.5</b>	<b>Therapeutischer Strahleneffekt ab 8 Gy und im Hochdosisbereich .....</b>	<b>85</b>
<b>8.6</b>	<b>Limitierungen der Arbeit.....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG .....</b>	<b>88</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>97</b>
11.1	Tabellenverzeichnis.....	97
11.2	Abbildungsverzeichnis .....	97
11.3	Danksagung.....	99

11.4	Ehrenwörtliche Erklärung .....	100
11.5	Curriculum vitae .....	101

## 2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	.....	Mikroliter
a.e.	.....	am ehesten
APS	.....	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	.....	destilliertes Wasser
BSA	.....	Bovines Serumalbumin
CD44	.....	<i>cluster of differentiation 44</i> ; Protein
<i>CD44</i>	.....	<i>cluster of differentiation 44</i> ; Gen
cm <sup>2</sup>	.....	Quadratcentimeter
CNV	.....	<i>copy number variation</i> ; Kopienzahlvariation
CpG	.....	5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'
CSC	.....	pluripotente Tumorstammzellen
DEPC	.....	Diethylpyrocarbonat
DMEM	.....	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	.....	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	.....	Effizienz
EDTA	.....	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	.....	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	.....	epithealial membrane antigen; Protein
EMT	.....	<i>epithelial-to-mesenchymal transition</i> ; Epithelial-mesenchymale Transition
ESC	.....	embryonale Stammzellen
FBS	.....	<i>fetal bovine serum</i> ; fetales Kälberserum
Gy	.....	Gray
h	.....	Stunde
HCl	.....	Salzsäure
HEPES	.....	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
HRP	.....	Meerrettichperoxidase; <i>horseradish peroxidase</i>
i.S.	.....	im Sinne
IL-6	.....	Interleukin-6
IL-6R	.....	membranständiger Interleukin-6-Rezeptor
IL-8	.....	Interleukin-8
kDa	.....	Kilodalton
Ki-67	.....	<i>marker of proliferation Ki-67</i> ; Protein
<i>Ki-67</i>	.....	<i>marker of proliferation Ki-67</i> ; Gen
KLF4	.....	<i>Kruppel-like factor 4</i> ; Protein
<i>KLF4</i>	.....	<i>Kruppel-like factor 4</i> ; Gen
M	.....	Molar
MgCl <sub>2</sub>	.....	Magnesiumchlorid
min	.....	Minute
<i>MKI67</i>	.....	<i>marker of proliferation Ki-67</i> ; Gen
ml	.....	Milliliter
MLM	.....	<i>mixed linear model</i> ; Gemischt Lineares Modell
mM	.....	Millimolar

mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure; <i>messenger deoxyribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MUC1	Mucin-1; Protein
<i>MUC1</i>	Mucin-1; Gen
MYC	bHLH-Transkriptionsfaktor; MYC-Protoonkogen; Protein
<i>MYC</i>	bHLH-Transkriptionsfaktor; MYC-Protoonkogen; Gen
N	Stickstoff
Na	Natrium
Nanog	<i>Homeobox Transcription Factor Nanog</i> ; Nagerprotein
NANOG	<i>Homeobox Transcription Factor Nanog</i> ; Protein
<i>NANOG</i>	<i>Homeobox Transcription Factor Nanog</i> ; Gen
NANOG1	embryonaler <i>Homeobox Transcription Factor Nanog</i> ; Protein
<i>NANOG1</i>	embryonaler <i>Homeobox Transcription Factor Nanog</i> ; Gen
<i>NANOGP1</i>	<i>Nanog Homeobox Pseudogene 1</i> ; Gen
<i>NANOGP11</i>	<i>Nanog Homeobox Pseudogene 11</i> ; Gen
<i>NANOGP2</i>	<i>Nanog Homeobox Pseudogene 2</i> ; Gen
<i>NANOGP8</i>	<i>Nanog Homeobox Pseudogene 8</i> ; Protein
<i>NANOGP8</i>	<i>Nanog Homeobox Pseudogene 8</i> ; Gen
NaOH	Natriumhydroxid
<i>NES</i>	Nestin; Gen
<i>NF2</i>	Neurofibromatose 2, Gen
nm	Nanometer
Oct4	<i>octamer-binding transcription factor 4</i> ; Nagerprotein
OCT4	<i>octamer-binding transcription factor 4</i> ; Protein
<i>OCT4</i>	<i>octamer-binding transcription factor 4</i> ; Gen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, <i>real-time polymerase chain reaction</i>
R	Ratio
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SCLC	<i>small cellular lung cancer</i> ; kleinzelliges Bronchialkarzinom
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
sIL-6R	löslicher Interleukin-6-Rezeptor
SLUG	<i>zinc finger protein SNAI2</i> ; Protein
SNAIL1	<i>zinc finger protein SNAI1</i> ; Protein
SNAIL2	<i>zinc finger protein SNAI2</i> ; Protein
Sox2	<i>sex-determining region Y-Box 2</i> ; Nagerprotein
SOX2	<i>sex-determining region Y-box 2</i> ; Protein
<i>SOX2</i>	<i>sex-determining region Y-box 2</i> ; Gen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TWST1	<i>twist family bHLH transcription factor 1</i> ; Protein
u.a.	unter anderem
VIM	Vimentin
WHO	Weltgesundheitsorganisation; <i>world health organisation</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

### 3 ZUSAMMENFASSUNG

Bereits im Jahr 1938 veröffentlichte der Begründer der modernen Neurochirurgie Harvey Cushing eine Fallserie von 313 Patienten, die an einem Meningeom erkrankt waren. Detailliert schilderte Cushing dabei anatomische Lokalisation, Tumorverhalten, Histopathologie, therapeutisches *Outcome* und die Epidemiologie der betroffenen Subpopulationen. Er legte damit einen der Grundsteine der evidenzbasierten Neuroonkologie.

In den fast 100 Jahren, die seit Veröffentlichung dieser Publikation vergangen sind, war die Neuroonkologie in Bezug auf Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, *Outcome* und Patientenversorgung einem stetigen Wandel und so manchem Paradigmenwechsel unterworfen – oft auf Grundlage klinischer Forschung und deren Ergebnisse. Doch obwohl auch zunächst brisante Thesen, wie z.B. die Tumorstammzellhypothese, auch vermehrt bei neuroonkologischen Krankheitsbildern Einzug hielt, hinkte die experimentelle Grundlagenforschung der Meningeome immer einen Schritt hinterher. Es konnten zwar Risikofaktoren, wie z.B. ionisierende Strahlung, identifiziert werden. Im Regelfall geschah dies jedoch durch retrospektive klinische Studien und nicht durch experimentelle Modelle. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auch darauf zurückzuführen, dass Meningeome zwar eine der häufigsten Tumorentitäten des zentralen Nervensystems bilden. Gleichzeitig sind sie in ihrer Mehrheit benign und durch eine chirurgische Resektion gut therapierbar. Das Interesse an der Erforschung der zellulären und molekularbiologischen Entstehung der Meningeome war im Vergleich zu vielen anderen malignen Tumorerkrankungen geringer, so dass das Verständnis der meningealen Tumorgenese auf molekularbiologischer Ebene bis heute lückenhaft ist.

Diese Promotionsarbeit möchte diese Forschungslücke teilweise schließen und die Meningeome einer Überprüfung anhand des aktuellsten und aussichtsreichsten Paradigmas unterziehen: die Tumorstammzellhypothese. Diese geht davon aus, dass der Schlüssel zur Entstehung von Neoplasien, deren Malignisierung und Metastasierung in einem Subtyp von Tumorzellen liegt, der stammzellähnliche Eigenschaften, unter anderem (u.a.) Pluripotenz und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, besitzen. Als signifikanter Parameter soll die ionisierende Strahlung als klinisch gesicherter Risikofaktor für die Entstehung von Meningeomen dienen.

Für den Modellaufbau wurden mehrere primäre Zellkulturen von Meningeomen und Dura mater mit einer spezifischen Strahlendosis nicht-fraktioniert bestrahlt. In der anschließenden postinterventionellen Kultivierung erfolgte zum einen eine morphologische Beobachtung und Registrierung der Zellkulturen. Gleichzeitig wurden regelmäßig Proben des Nährmediums sowie Zellmaterial entnommen. Die Untersuchung des Nährmedium erfolgte durch ein Immunadsorptionsverfahren zur Konzentrationsbestimmung der Interleukine IL-6 und IL-8, die an Induktion und Erhalt von Stammzellen beteiligt sind. Das Zellmaterial wurde verwendet, um mittels qPCR und Im-

munfluoreszenzfärbung die Expression spezifischer Gene, u.a. *NANOG1* und weiterer Regulatoren, u.a. *SOX2* und *OCT4*, zu messen, die eine tragende Rolle bei Induktion und Erhalt von Stammzellen und deren Differenzierung spielen.

Die Ergebnisse zeigten für die Dura mater zum einen die vermehrte Expression der Meningeommarker Vimentin (VIM), Nestin und des *epithelial membrane antigen* (EMA) nach einer Bestrahlung mit 1 Gy bis 4 Gy. Gleichzeitig konnte auch eine Überexpression von Stammzellmarkern beobachtet werden. Bei den Meningeomen führte dasselbige Dosisintervall zunächst eher zu einem beschleunigten Tumorwachstum. Aber auch bei den Meningeomen zeigten sich strahlenabhängige Veränderungen im Expressionsprofil hinsichtlich Meningeom- und Stammzellmarker. Für beide Entitäten wurden in demselben Dosisbereich vitale, sphäroide Zellen beobachtet, deren Auftreten vereinbar ist mit potentiell pluripotenten Zellen. Auch die beiden oben genannten Interleukine zeigten Veränderungen in Konzentration und Sekretion abhängig von Dosis und Gewebetyp.

Die Resultate dieser Arbeit bestätigen ionisierende Strahlung nun auch im in-vitro-Modell als potenten Faktor bei der Entwicklung von meningealen Neoplasien und bei der Malignisierung von Meningeomen. Gleichzeitig konnte demonstriert werden, dass ionisierende Strahlung ein wichtiges Element bei der Entstehung von pluripotenten Tumorstammzellen ist und somit die Tumorstammzellhypothese auch bei den mehrheitlich benignen Meningeomen Anwendung finden kann. Dies findet auch durch eine Beeinflussung des Mikromilieus über die Interleukine statt.

## 4 EINLEITUNG

### 4.1 MENINGEOME

#### 4.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND KLINISCHE SITUATION DER MENINGEOME

Die Meningeome stellen eines der wichtigsten Krankheitsbilder der onkologischen Neurochirurgie dar. Mit einer Inzidenz von ca. 5:100000 pro Jahr sind sie die häufigsten Primärtumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) (Apra et al. 2018) und prägen so maßgeblich den Alltag des Neurochirurgen. Als Ausgangspunkt werden die arachnoidalen Deckzellen der *Dura mater* vermutet (Wiemels et al. 2010, Marosi et al. 2008), so dass die Meningeome sich sowohl intrakraniell als auch -spinal an Lokalisationen entwickeln können. Dementsprechend ist auch das klinische Bild der Meningeome mannigfaltig, da die Symptomatik auch abhängig von der anatomischen Lage des Tumors zu den neuronalen Strukturen des ZNS ist (Marosi et al. 2008). Die Symptome reichen somit von neurologischen Defiziten, über Epilepsie bis hin zu Ausfällen bei einem pathologisch erhöhten Hirndruck (Apra et al. 2018).

Meningeome sind die häufigsten Tumore des zentralen Nervensystems und werden – den Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) entsprechend – nach der Klassifikation von 2021 in die Grade: WHO°1, WHO°2 und WHO°3 eingeteilt. Die Malignität korreliert direkt mit dem Grad. Die pathologische Diagnostik der Meningeome berücksichtigt v.a. histo- und zytomorphologische Kriterien, wie z.B. Mitosezahl und Parenchyminvasivität, und ist zusammen mit dem chirurgischen Resektionsgrad prognosebestimmend. Die überwiegende Anzahl der Meningeome ist benigne. Die neue WHO-Klassifikation unterscheidet weiterhin zwischen 15 histopathologischen Subtypen, die aber nicht mehr allein maßgeblich bei der Einteilung sind. In der Novelisierung von 2021 werden nun auch verstärkt molekulare Marker zur Diagnostik herangezogen, wie z.B. *NF2*-Alterationen oder ein Verlust von Chromosom 22. (Harter et al. 2017, Gritsch et al. 2022).

Die Behandlung der Meningeome umfasst u.a. mit der operativen Resektion, der Strahlentherapie und der *watch and wait*-Strategie mehrere therapeutische Säulen, wobei die medikamentöse Therapie, zum Beispiel (z.B.) im Sinne (i.S.) einer systemischen Chemotherapie, nicht denselben Stellenwert genießt wie bei anderen Tumorentitäten (Apra et al. 2018).

Abhängig von Lokalisation, Volumen, Größendynamik und Symptomatik kann bei Erstdiagnose eine *watch and wait*-Strategie mit regelmäßigen *radiologischen* Verlaufskontrollen mittels Magnetresonanztomographie (MRT) mit Kontrastmitteln erwogen werden. (Apra et al. 2018, Lee et al. 2017a).

Das klassische Mittel der ersten Wahl zur Therapie von intrakraniellen Meningeomen ist auch heute noch die operative Entfernung des Tumorgewebes. Dabei wurden in den letzten Jahrzehnten gerade die minimalinvasiven Techniken weiterentwickelt, wie z.B. ein transsphenoidaler Zugang zur Tumorexstirpation an der Schädelbasis. Die Operation ist auch deshalb immer noch

von großer Bedeutung, da sie zum einen eine rasche Reduktion der Tumormasse, zum anderen die histopathologische Diagnosestellung ermöglicht (Apra et al. 2018). Die zweite Säule der Meningeombehandlung ist die Strahlentherapie (Radiatio), die u.a. als adjuvantes Verfahren eingesetzt wird. Die Radiatio kann aber auch als primäres, kuratives Verfahren bei spezifischen Meningeomen eingesetzt werden: Betroffen sind hier auch wieder Tumore an der Schädelbasis, bei denen eine Operation das Risiko der Verletzung von bedeutenden anatomischen Strukturen, wie z.B. der *Nervi optici* oder des *Sinus cavernosus*, birgt (Prabhu et al. 2018). Die therapeutische Dosis wird als stereotaktische und radiochirurgische Bestrahlung, fraktioniert oder als einzelne Dosis appliziert (Apra et al. 2018). Hier besteht v.a. bei einer stereotaktischen Bestrahlung im Bereich der Schädelbasis immer auch das Risiko einer konsekutiven Hypophyseninsuffizienz (Minniti et al. 2011). Der Einsatz und Umfang einer postoperativen bzw. adjuvanten Therapie richtet sich maßgeblich nach Ausmaß der Tumorsektion und WHO-Grad des Meningeoms (Dziuk et al. 1998, Rogers et al. 2015, Durand et al. 2009).

#### 4.1.2 ÄTIOLOGIE, RISIKOFAKTOREN UND TUMORBIOLOGIE

Die Palette an Ursachen für die Entwicklung einer meningealen Neoplasie scheint auf den ersten breit gefächert zu sein. Tatsächlich werden einige tiefgreifende Faktoren als ursächlich oder Neoplasie-fördernd diskutiert, von denen manche inzwischen als gesichert gelten.

Zum einen scheinen auch endogene Faktoren, wie z.B. Genmutationen, bei der Entwicklung von Meningeomen eine Rolle zu spielen. Ein herausragendes Beispiel hierfür ist die Erkrankung der Neurofibromatose Typ 2: Dabei kommt es zu einer Mutation und einer konsekutiven Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *Neurofibromatose 2 (NF2)*, das auf dem Chromosomenabschnitt 22q12 lokalisiert ist und für den Tumorsuppressor Merlin codiert (Goutagny und Kalamarides 2010, Buerki et al. 2018). Im Falle einer kongenitalen Krankheitsveranlagung erfolgt der Erbgang dabei autosomal-dominant (Buerki et al. 2018). Zwar ist die Neurofibromatose Typ 2 mit einer Inzidenz bei Geburt von 1 : 33000 und einer Prävalenz von 1 : 56161 eine seltene genetische Erkrankung (Goutagny und Kalamarides 2010). In Bezug auf die Meningeome ist die Neurofibromatose Typ 2 allerdings insofern von Relevanz, da ungefähr die Hälfte der Patienten im Verlauf neben den benignen Schwannomen und Ependyomen eben auch multiple Meningeome entwickeln. Gleichzeitig zeigen diese Meningeome im Falle einer *NF2*-Mutation eine höhere Mortalität als in sporadischen Tumoren. Umgekehrt sollte bei der Diagnose von multiplen Meningeomen auch die humangenetische bzw. pathologische Untersuchung zur Aufdeckung einer kongenitalen oder de-novo Mutation des *NF2*-Gens erfolgen (Goutagny und Kalamarides 2010).

Anhand der Epidemiologie der Meningeome zeigt sich, dass scheinbar auch noch weitere endogene Faktoren in der Entwicklung der Meningeome eine Rolle spielen: Wie bereits beschrie-

ben liegt die Gesamtinzidenz der Meningeome bei ungefähr 5 : 100000 (Apra et al. 2018). Allerdings zeigen sich hier deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Altersgruppen: So liegt die Neuerkrankungsrate für Kinder im Alter zwischen 0 und 19 Jahren bei 0,14 : 100000, steigt dann aber im Verlauf an auf 37,75 : 100000 in der Altersgruppe von 75 bis 84 Jahre (Buerki et al. 2018). Andere Quellen sprechen davon, dass Meningeome gewöhnlich zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr diagnostiziert werden (Gurcay et al. 2018). Insgesamt kann jedoch insofern von einer Altersabhängigkeit gesprochen werden, da mit zunehmenden Alter auch ein Ansteigen der Inzidenz beobachtet wird (Wiemels et al. 2010).

Die Epidemiologie äußert aber auch noch einen anderen bedeutenden Risikofaktor: Unabhängig vom Alter ist die Inzidenz für Meningeome bei Frauen durchgehend mindestens doppelt so hoch als bei Männern (Wiemels et al. 2010, Gurcay et al. 2018). Für spinale Lokalisationen liegt das Verhältnis von Frau zu Mann sogar bei ca. 9 : 1. (Marosi et al. 2008). Postmenopausale Frauen sind dabei das Kollektiv mit der höchsten Inzidenz und somit mit dem höchsten Risiko an einem Meningeom zu erkranken (Johnson et al. 2011, Gurcay et al. 2018). Aber auch andere Fakten sprechen für eine Assoziation zwischen meningealem Tumorwachstum und Sexualhormonen: So ist schon seit längerem bekannt, dass die Mehrheit der Meningeome Progesteron-Rezeptoren auf der Oberfläche der Tumorzellen exprimieren (Marosi et al. 2008, Gurcay et al. 2018, Wiemels et al. 2010). In einer weiteren Studie waren von 500 untersuchten Meningeomen 88 % der Proben positiv für Progesteron-Rezeptor, 40 % für Estrogen-Rezeptor und 39 % für Androgen-Rezeptor (Marosi et al. 2008). Gleichzeitig kann häufig während der Lutealphase des Menstruationszyklus, aber auch während einer Schwangerschaft eine Beschleunigung des Tumorwachstums beobachtet werden (Wiemels et al. 2010, Gurcay et al. 2018), so dass es in diesen Phasen häufig zu einer Verschlechterung von klinischen Symptomen kommt (Marosi et al. 2008). Andererseits kann bei Meningeomen WHO<sup>°</sup>2 und <sup>°</sup>3 eine leichte Bevorzugung des männlichen Geschlechts registriert werden (Wiemels et al. 2010). Insgesamt muss also von einer starken Assoziation zwischen der Entstehung und Entwicklung der Meningeome und dem weiblichen Hormonhaushalt ausgegangen werden.

Die exogene Zufuhr von Hormonen, z.B. im Rahmen der Kontrazeption, wird bis heute als begünstigender Faktor diskutiert. Tatsächlich erhöht zumindest die Substitution von *Cyproteron* – ein synthetisches Progesteron-Derivat, das im Falle von Transsexualität eingesetzt wird – das Risiko ein Meningeom zu entwickeln bzw. des Tumorwachstums um das 11-fache und kann als Risikofaktor angesehen werden (Apra et al. 2018).

Ein weiterer exogener Faktor in der Entstehung von Meningeomen ist die ionisierende Strahlung, v.a. in Form von Röntgenstrahlung. Diese Erkenntnis beruht zunächst auf klinischen Beobachtungen: Patienten, die im Kindesalter eine therapeutische Bestrahlung erhalten haben, zeigten im weiteren Leben ein signifikant erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Meningeomen. Aber auch

die Population der Überlebenden der Atombombenabwürfe von Hiroshima und Nagasaki im Jahr 1945 zeigten eine erhöhte Inzidenz an Meningeomerkrankungen (Umansky et al. 2008).

#### **4.1.3 IONISIERENDE STRAHLUNG ALS GESICHERTER RISIKOFAKTOR FÜR MENINGEOME**

Als einziger Faktor hat sich in den vergangenen Jahrzehnten die ionisierende Strahlung als extrinsischer Risikofaktor für die Entwicklung von Meningeomen etabliert (Umansky et al. 2008). Dieses Erkenntnis ist v.a. auf zahlreiche klinische Beobachtungen zurückzuführen: So bergen die verschiedensten Situationen die Gefahr einer Neoplasie: Schon in früheren Jahren wurde bereits bei den Überlebenden der Atombombenangriffen von Hiroshima und Nagasaki ein tendenziell erhöhtes Risiko für ZNS-Tumore, u.a. Gliome und Meningeome, beobachtet (Preston et al. 2002). Tatsächlich ist aber nicht einmal eine solche massive Strahlenexposition notwendig: So konnte eine klinische Studie bereits 2002 zeigen, dass Betroffene, die z.B. im Kindesalter i.R. einer *Tinea capitis* – ein Pilzbefall der Kopfhaut mit Dermatophyten – eine kraniale Bestrahlung erhalten haben, nicht nur ein signifikant erhöhtes Risiko haben, überhaupt an einem Meningeom zu erkranken, sondern sie entwickeln auch signifikant früher die Neoplasie mit einer erhöhten Rate an Rezidiven und multiplen Lokalisationen (Sadetzki et al. 2002). Aber auch weitere strahlentherapeutische Maßnahmen spielen in diesem Kontext eine gewichtige Rolle: Patienten, die im Kindesalter aufgrund einer *Akuten Lymphatischen Leukämie*, im Bereich des Schädels bestrahlt wurden, zeigten ebenfalls ein erhöhtes Risiko im späteren Verlauf ein Meningeom zu entwickeln (Co et al. 2019).

Aber selbst bei diesem gesicherten Risikofaktor ist die Datenlage hinsichtlich einiger zentraler Aspekte widersprüchlich: Während einige Quellen von keiner eindeutigen Dosis-Wirkungs-Beziehung hinsichtlich der ionisierenden Strahlung ausgehen (Buerki et al. 2018, Wiemels et al. 2010), gehen andere Autoren sehr wohl von einer eindeutigen Dosis-Wirkungs-Beziehung aus (Apra et al. 2018). Auch der Einfluss von ionisierender Strahlung im Alltag, insbesondere der Einsatz im dentalmedizinischen Bereich, wird bis heute konträr diskutiert: Selbst aktuelle Metaanalysen liefern teilweise widersprüchliche Aussagen, ob der Einsatz von Röntgenstrahlung bei zahnmedizinischer Indikation langfristig eine meningeale Neoplasie provoziert (Memon et al. 2019, Mupparapu et al. 2019). In Zusammenschau ist die ionisierende Strahlung aber ein eklatanter und nicht zu unterschätzender Faktor in der Entwicklung von Meningeomen.

#### **4.1.4 DIAGNOSTISCHE MARKER FÜR MENINGEALE NEOPLASIE**

Wie allgemein in der Onkologie kann die sichere Diagnose eines Meningeoms nur durch eine histopathologische Untersuchung von Tumorgewebe gestellt werden. Bei diesen Untersuchungen, v.a. immunhistochemische Färbungen, spielten bisher auch verschiedene Proteine als Marker eine gewichtige Rolle, die auch in dieser Arbeit Eingang gefunden haben.

#### 4.1.4.1.1 EPITHELIALES-MEMBRAN-ANTIGEN

Das *epitheliale Membranantigen* – nach aktuellerer Nomenklatur auch Mucin-1 (MUC1) genannt – ist ein transmembranöses Glykoprotein, das überwiegend am basalen Zellpol in epitheliale Gewebe aber auch im *Plexus choroideus*, Ependym und in arachnoidalen Zellen exprimiert wird. Es wird vom *Mucin-1*-Gen codiert (*MUC1*). Es vermittelt in der Zell-Zell-Adhäsion sowie im Kontakt von Zelle zur extrazellulären Matrix und spielt somit auch eine gewichtige Rolle in der Abwehr von Mikroorganismen. Gemeinsam mit Vimentin ist EMA ein typischer immunhistochemischer Marker für Meningeome (Mandara et al. 2021, Marosi et al. 2008, Chan et al. 2021): Es beschreibt den epithelialen Charakter des Tumorgewebes. Bei der Transformation eines initial benignen Meningeoms zu einem anaplastischen Typ konnte der Verlust des epithelialen Charakters auch anhand des Rückgangs der EMA-Expression festgestellt werden (Ikeda und Yoshimoto 2003). Gleichzeitig ist EMA dazu befähigt über verschiedene Signalwege, z.B. STAT3 und NFκB, die epithelial-mesenchymale Transition zu induzieren und so auch den Tumorprogress zu fördern (Nath und Mukherjee 2014, Rajabi und Kufe 2017).

#### 4.1.4.1.2 VIMENTIN

Vimentin ist ein Protein mit einer Kettenlänge von 466 Aminosäuren und einer Molekularmasse von ca. 53,7 kDa. Sein Gen ist auf dem Chromosom 10q13 lokalisiert. Vimentin wird von nicht-epithelialen und mesenchymalen Zellen und im Bereich des Zentralen Nervensystems u.a. von Schwann- und Ependymzellen exprimiert (Bouamrani et al. 2010). Gemeinsam mit EMA stellt Vimentin einen bedeutenden Marker für mesenchymale Tumore und auch für Meningeome dar (Barresi et al. 2012, Migita et al. 2017, Riemenschneider et al. 2007). Diese Koexpression von Vimentin und EMA ist Ausdruck des gleichzeitigen epithelialen und mesenchymalen Charakters der meningotheelialen Zellen der Meningeome (Solomon und Pekmezci 2020).

Die Rolle von Vimentin als Prognosefaktor in verschiedenen Tumorentitäten wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Bouamrani et al. 2010). Bei einigen Tumorentitäten, wie z.B. dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom oder dem Magenkarzinom, scheint die Vimentin-Überexpression aber tatsächlich prognostisch wertvoll für das Patienten-Outcome zu sein: Eine Vimentin-Überexpression in malignen Neoplasien geht mit einer schlechteren Prognose einher (Danielsson et al. 2018, Satelli und Li 2011).

#### 4.1.4.1.3 NESTIN

Das humane Protein Nestin besteht aus 1621 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 177,4 kDa und wird der Klasse VI der Intermediärfilamente zugerechnet. Das dazugehörige Gen *Nestin* (*NES*) sitzt dabei auf Chromosom 1q23.1 und setzt sich dabei aus vier Exons und drei Introns. Nestin ist ein anerkannter Marker für neuronale Stamm- und Progenitorzellen und gilt in seiner Ko-Expression als Marker für Tumorstammzellen (Neradil und Veselska 2015). Es wird

auch in epithelialen, mesenchymalen und neuroektodermal-neuroepithelialen Tumoren exprimiert (Shivapathasundram et al. 2018). So wurde bereits anhand von atypischen Meningeomen *in vitro* SOX2, CD133 und eben Nestin ein Expressionsprofil nachgewiesen, dass ähnlich zu dem der neuronalen Stamm- und Progenitorzellen war (Rath et al. 2011). Gleichzeitig konnte in einer immunhistochemischen Untersuchung von Paraffinschnitten verschiedener Meningeome eine direkte Korrelation zwischen der Expressionsstärke von Nestin und SOX2 und des WHO-Grades der Meningeome nachgewiesen werden (Xiao et al. 2018).

#### 4.1.4.1.4 MARKER OF PROLIFERATION – Ki-67

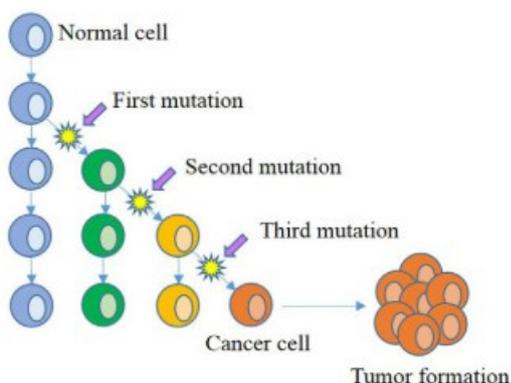
Der *marker of proliferation Ki-67* (Ki-67) ist ein nukleäres Antigen und dient als anerkannter, neoplastischer Proliferationsindex. Es kann dabei in allen aktiven Phasen des Zellzyklus nachgewiesen werden (Matias et al. 2019). Nach neuer Studienlage ist Ki-67 auch ein geeigneter prognostischer Marker für das Auftreten eines Rezidivs eines Meningeom WHO° 1 (de Carvalho et al. 2020). Das Protein wird vom entsprechenden *marker of proliferation Ki-67-Gen* (MKI67 bzw. Ki-67) codiert.

## 4.2 DIE STAMMZELLHYPOTHESE – DAS SCHARNIER ZWISCHEN URSACHE UND WIRKUNG

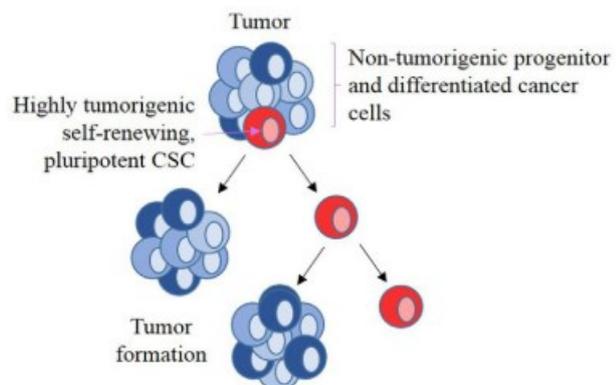
Auch wenn für verschiedene Tumorentitäten zahlreiche Risikofaktoren bekannt sind oder diskutiert werden, so erklären diese oft nicht den zytologischen oder gar molekularbiologischen Mechanismus der Tumorentstehung. Hierzu werden wiederum die verschiedensten Hypothesen herangezogen.

Eine beschreibt das Modell der klonalen bzw. stochastischen Evolution (**Abb. 1**): Hier entwickeln sich Tumorzellen aus „normalen“ bzw. somatischen Zellen heraus, in denen im Verlauf mehrere

### A Clonal Evolution Model



### B Hierarchical Cancer Stem Cell Model



## Abb. 1 Vergleichende Darstellung zwischen dem Modell der klonalen Evolution und Tumorstammzellhypothese

**A** Entsprechend der klonalen Evolution unterläuft eine somatische Zelle mehrere Mutationen, um sich zu einer Tumorzelle zu entwickeln, die so die Tumormasse bildet. **B** Die Tumorstammzellhypothese beschreibt einen Tumor als eine heterogene Masse. Ein Bestandteil dieser Masse sind spezifische Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften – die Tumorstammzellen. Quelle: Bradshaw et al. 2016.

Genmutationen kumulieren. Konsekutiv kommt es zu einer klonalen Expansion der resultierenden Tumorzellen mit der Ausbildung von exakten Zellkopien (Bradshaw et al. 2016). Auch vom Standpunkt eines potentiellen therapeutischen Ansatzes aus steht das klonale Modell im Widerspruch zur hierarchischen Tumorstammzell-Hypothese.

Das Modell der hierarchischen Tumorstammzellhypothese findet seine Wurzeln prinzipiell bereits im 19. Jahrhundert, u.a. in Rudolf Virchows *Cellularpathologie*. Die ersten Formulierungen dieser Hypothese gehen von der Existenz von Zellen aus, die Teil der Tumormasse und befähigt sind Metastasen zu bilden. Im Laufe der Jahrhunderte entwickelte sich diese Hypothese immer weiter. An Aktualität und Relevanz gewann diese Hypothese jedoch erst im Übergang zum 21. Jahrhundert mit der Isolation von Leukämie-Stammzellen im Jahr 1994. Heute geht die Tumorstammzellhypothese von einer heterogenen Tumormasse mit verschiedenen Zelltypen aus. Ein kleiner Pool dieser Tumorzellen stellen die Tumorstammzellen dar mit den Eigenschaften der Selbsterneuerung und Pluripotenz. Diese Stammzellen teilen sich asymmetrisch, so dass einerseits wieder Tumorstammzellen, andererseits aber auch differenzierte Zellen entstehen. Diese somatischen Tumorzellen besitzen ein geringes Potential zur Tumorgenese und stellen das Gros der Tumormasse (Vlashi und Pajonk 2015, Bradshaw et al. 2016). Schlüsselemente der Tumorstammzellhypothese sind die die Genfamilie des *Homeobox Transcription Factor Nanog* (NANOG) und die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT).

#### 4.2.1 MARKER UND TARGETS AUF GEN- UND PROTEINEBENE

Zahlreiche Gene und Genprodukte spielen in einem spezifischen Verhältnis zueinander eine tragende Rolle bei der Entwicklung und Erhaltung von Tumorstammzellen (CSC).

##### 4.2.1.1 STAMMZELLMARKER

Die folgenden Marker lassen sich typischerweise in der Entwicklung von embryonalen und tumorösen Stammzellen nachweisen und stellen daher in der Stammzellhypothese eine tragende Säule dar.

##### 4.2.1.1.1 DIE NANOG-FAMILIE UND IHRE SCHLÜSSELPOSITION IN STAMMZELLEN

Der Name „NANOG“ ist dabei an den Begriff „*Tir nan Òg*“ aus einer keltischen Sage angelehnt und bedeutet frei übersetzt „Das Land der ewigen Jugend“ (Alemohammad et al. 2020). Dies deutet bereits die gewichtige Rolle der NANOG-Genfamilie an: Der *Homeobox Transcription Factor Nanog* (NANOG) ist ein Transkriptionsfaktor und Schlüsselement beim Erhalt (und weniger bei der Induktion) der *self-renewing* und der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen (ESC) und CSC (Freitag et al. 2017). Das NANOG-Protein ist dabei ein Homöobox-Protein und Transkriptionsfaktor, der über seine Bindung an die Promotorregionen von hunderten Genen zahlreiche Signalwege aktivieren und hemmen kann (Freitag et al. 2017, Najafzadeh et al. 2021).

Die NANOG-Genfamilie ist dabei hoch komplex und setzt sich aus dem codierenden *NANOG* und den Pseudogenen *Nanog Homeobox Pseudogene 1 (NANOGP1)* bis 11 (*NANOGP11*) zusammen (Freitag et al. 2017, Booth und Holland 2004).

Das embryonale *NANOG (NANOG1)* ist auf Chromosom 12p13.31 lokalisiert und kodiert für ein Protein mit einer Kettenlänge von 305 Aminosäuren und vier Phosphorylierungspositionen (Najafzadeh et al. 2021, Freitag et al. 2017). Das Gen selbst setzt sich aus vier Exons, drei Introns und 915 Basenpaaren zusammen (Alemohammad et al. 2020).

Zur besseren Differenzierung wird in Folge dieser Arbeit das embryonale *NANOG*-Gen als *NANOG1* bezeichnet. (Najafzadeh et al. 2021)

Von den elf Pseudogenen können zwar immerhin die drei Mitglieder der Genfamilie *Nanog Homeobox Pseudogene 1, 2 (NANOGP2)* und *8 (NANOGP8)* ein Protein produzieren. Tatsächlich ist aber *NANOGP8* das Pseudogen mit der mit Abstand größten Ähnlichkeit zum embryonalen *NANOG1* (Alemohammad et al. 2020): Das *NANOGP8*-Genprodukt unterscheidet sich von dem des *NANOG1*-Gens in der Aminosäuren-Sequenz nur an der Position 253 (Najafzadeh et al. 2021).

*NANOG* ist als ein Regulator der pluripotenten Stammzeleigenschaft ein Schlüsselement in der Embryonalphase und ist dementsprechend stark in dieser frühesten Lebensphase exprimiert. Nach der Geburt wird die *NANOG*-Expression stark zurückgefahren, so dass beim Adulten nur an wenigen Lokalisationen *NANOG* nachgewiesen werden kann, wie z.B. im testikulären Gewebe (Grubelnik et al. 2020b). Sonst wird *NANOG* prinzipiell nur in undifferenzierten Zellen nachgewiesen (Swain et al. 2020). An Relevanz gewinnt die *NANOG*-Expression im Erwachsenen daher erst wieder im Zusammenhang mit der Kanzerogenese: Der Transkriptionsfaktor *NANOG* wird verstärkt in den CSC exprimiert und verleiht diesen die typischen Stammzeleigenschaften wie Pluripotenz, Selbsterneuerung, Differenzierung und Sphärenbildung und so konsekutiv die entsprechende Tumorigenität (Grubelnik et al. 2020b, Shivapathasundram et al. 2018). Dabei geht man inzwischen davon aus, dass diese CSC genauso wie „normale“ Stammzellen eine sog. Tumorstammzellnische benötigen – einer spezialisierten Mikroumgebung, die durch Zell-Zell-Kontakte verschiedener Zelltypen, z.B. Fibroblasten und Immunzellen, und Sekretion verschiedener Faktoren, wie z.B. Zyto- und Chemokine, zum Erhalt der Stammzeleigenschaften beiträgt (Plaks et al. 2015). Eine Hochregulierung von *NANOG* konnte bereits bei einigen anderen Tumorentitäten, wie z.B. Ovarial-, Mamma-, Lungen- oder Prostatakarzinomen, beobachtet werden (Alemohammad et al. 2020). Auch bei Meningeomen zeigt sich eine verstärkte *NANOG*-Expression, wobei zusätzlich eine positive bzw. direkte Korrelation zwischen der Expressionsrate und dem WHO-Grad nachgewiesen wurde (Freitag et al. 2017). Selbst bei Gliomen besteht diese positive Korrelation zwischen *NANOG*-Expression und Malignität. (Grubelnik et al. 2020b)

Die Rollenverteilung zwischen *NANOG1* und *NANOGP8* bleibt jedoch weiterhin ein Stück weit unklar: Da eine Unterscheidung zwischen den beiden jeweiligen Genprodukten aufgrund der Ähnlichkeit der Proteine mittels Immunhistochemie enorm diffizil ist, kann eine Differenzierung eigentlich nur durch Analyse der Expression der Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) stattfinden: Inzwischen gilt als gesichert, dass *NANOG1* zumindest verantwortlich ist für die Stammzeleigenschaften der Selbsterneuerung und Pluripotenz in embryonalen Stammzellen. Gleichzeitig legt die Literatur aus den letzten Jahren nahe, dass wohl eher *NANOGP8* für die verstärkte Ausbildung von Tumorstammzellen, die Induktion der damit eng verknüpften epithelial-mesenchymalen Transition und die für beide Prozesse nötigen Marker und Transkriptionsfaktoren verantwortlich ist (Ma et al. 2018, Wang et al. 2017). Zusätzlich zeigt *NANOGP8* in gleichem Ausmaß die Fähigkeit somatische Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen zu überführen. Ebenso konnte bei verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden, dass eine Herunterregulierung von *NANOGP8* zu einer Verkleinerung des Tumorstammzell-Pools führt (Zhang et al. 2016).

#### 4.2.1.1.2 DIE NANOG-REGULATION – SOX2 UND OCT4 ALS GATEKEEPER ZUR PLURIPOTENZ

Die Regulation der Pluripotenz und der CSC ist eng verknüpft, wenn nicht sogar gleichbedeutend mit der Expression von NANOG. Die verschiedenen Regulationsmechanismen finden dabei auf zahlreichen Wegen und Ebenen statt (**Abb. 2**):

Eine Möglichkeit der Genregulierung läuft klassischerweise über die Anzahl der Genkopien im Genom (CNV). Aber auch durch die Methylierung von 5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'-Sequenzen (CpG) in der Promotorregion wird die NANOG-Expression heruntergefahren, was in der Ausdifferenzierung und dem Verlust der Stammzeleigenschaften der betroffenen Zellen mündet (Najafzadeh et al. 2021).

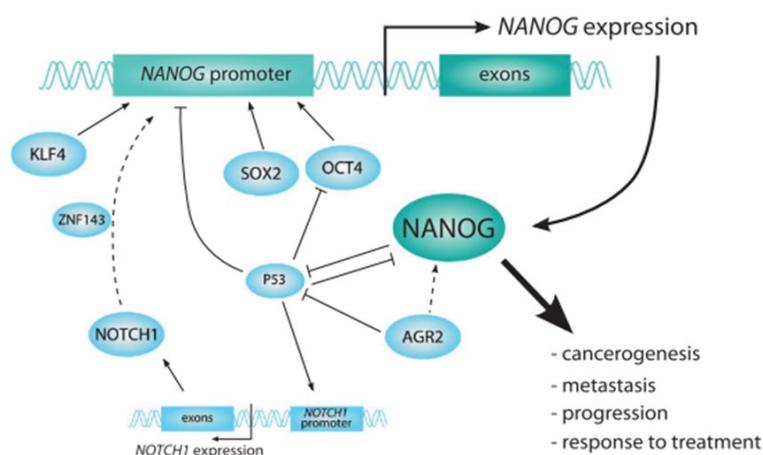
Die NANOG-Aktivität wird zusätzlich auf Proteinebene variiert. Die beiden wichtigsten Werkzeuge dieser posttranslationalen Modifikation sind die Ubiquitinierung und die Phosphorylierung. Bei der Ubiquitinierung werden die Zielproteine mit Ubiquitin-Molekülen verknüpft und konsekutiv verstärkt degradiert bzw. abgebaut. NANOG selbst besitzt hierbei ein sog. PEST-Motiv: Dies ist eine Prolin-, Glutamin-, Threonin- und Serin-reiche Aminosäuresequenz, die einen Signalmarker für die Ubiquitinierung darstellt und somit die Instabilität eines Proteins begünstigt. Im Rahmen der Phosphorylierung werden an die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin Phosphatgruppen reversibel angehängt. Das NANOG-Protein ist besonders reich an diesen Aminosäuren und daher besonders empfänglich für die Phosphorylierung. Dabei konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung eher förderlich für die NANOG-Stabilität und seine Aktivität ist (Alemohammad et al. 2020).

Der wichtigste Mechanismus in der Regulation der NANOG-Expression beruht jedoch auf der Aktivität anderer Proteine. Eine Schlüsselposition nehmen hierbei die Transkriptionsfaktoren

*octamer-binding transcription factor 4* (OCT4), *sex-determining region Y-box 2* (SOX2), *Kruppel-like factor 4* (KLF4) und der bHLH-Transkriptionsfaktor (MYC) mit den dazugehörigen Genen *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *MYC* ein. Insbesondere das Trio aus NANOG, SOX2 und OCT4 nimmt im Erhalt der Stammzeleigenschaften eine herausragende Position ein: SOX2 und OCT4 formieren einen Komplex, der wiederum am NANOG-Promotor bindet (Mato Prado et al. 2015). Indem die beiden Transkriptionsfaktoren ein gemeinsame Bindungsstelle der Desoxyribonukleinsäure (DNA)) teilen, bilden sie ein Heterodimer mit verstärkendem Effekt auf die Genregulation (Swain et al. 2020, van Schaijik et al. 2018). Zusätzlich bildet dieses Heterodimer einen Komplex mit KLF4, der wiederum am SOX2/OCT4-Sequenzmotiv ca. 180 Basenpaare (bp) vor dem NANOG-Promotor bindet und diesen synergistisch aktiviert (Grubelnik et al. 2020a, Grubelnik et al. 2020b, Gong et al. 2015).

Andererseits ist schon seit der erstmaligen Induktion von Pluripotenz in somatischen Zellen bekannt, dass KLF4 selber ein Suppressorgen des Tumorsuppressors p53 ist und so zu einer Aktivierung des embryonalen NANOG führen kann. Gleichzeitig ist KLF4 auch ein Inhibitor der MYC-induzierten Apoptose (Takahashi und Yamanaka 2006). Allerdings ist die tumorsuppremiere oder onkogene Wirkung von KLF4 abhängig von der untersuchten Tumorentität (Yang et al. 2020).

Grundsätzlich beschreibt *MYC* dagegen eine Genfamilie aus Protoonkogenen mit den drei Mitgliedern *C-Myc*, *N-Myc* und *L-Myc*. Die Expression dieser einzelnen Familienmitglieder unterscheidet sich je nach Tumorentität. MYC steht dabei in enger Kooperation mit den anderen sog. Yamanaka-Faktoren OCT4, SOX2 und KLF4 (Yang et al. 2020). So konnte anhand von Neuroblastomen *OCT4* als *upstream* Regulator von *C-MYC* nachgewiesen werden, welches über Bindungsstellen in der Promotorregion zu einer Aktivierung von *MYC* führt (Wei et al. 2020).



## Abb. 2 Vereinfachte Darstellung der NANOG-Regulation

Die beschriebene Grafik präsentiert eine vereinfachte Darstellung der NANOG-Regulation. Die NANOG-Expression unterliegt u.a. dem Einfluss der Transkriptionsfaktoren KLF4, SOX2 und OCT4. Über eine gegenseitige Beeinflussung zwischen NANOG und P53, dem Produkt eines dazugehörigen Tumorsuppressorgens, unterliegt NANOG ein Stück weit auch einer Autoregulation. Quelle: Grubelnik et al. 2020b

Insgesamt ist MYC ein bedeutender Transkriptionsfaktor, der in Kooperation mit *hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$*  (HIF-2 $\alpha$ ) mitverantwortlich für die Expression eines Genmuster in CSC ist, welches ähnlich zu dem der embryonalen Stammzellen ist (Das et al. 2019).

#### 4.2.1.1.3 CLUSTER OF DIFFERENTIATION –4 - CD44

Das *cluster of differentiation 44*-Protein (CD44) ist ein Oberflächen- und Glykoprotein und fungiert als Rezeptor für das extrazelluläre Matrixprotein Hyaluron. Es wird codiert durch das dazugehörige *cluster of differentiation 44*-Gen (*CD44*). CD44 ist also selbst ein wichtiger Baustein in der zellulären Adhäsion (Allegra et al. 2014). CD44 scheint aber auch eine wichtige Rolle in der Tumorinvasivität und Metastasierung zu spielen. Zusätzlich ist CD44 bei verschiedenen Tumorentitäten einer der ersten beschriebenen Marker für die Tumorstammzellen. In einer immunhistochemischen Untersuchung von Paraffinschnitten zeigte sich auch eine signifikante positive Korrelation zwischen der CD44-Expression und dem WHO-Grad von Meningeomen (Mostafa und Khairy 2017). Aufgrund von Alternativem Spleißen gibt es verschiedene Isoformen von CD44, die in verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert werden (Hassn Mesrati et al. 2021)

### 4.2.2 DIE INTERLEUKINE – VERMITTLER DER CSC

Verschiedene Transmitter, insbesondere Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8), sind ein bedeutender Faktor in der Induktion von Stammzellen und der epithelial-mesenchymalen Transition – einem Schlüsselprozess in der Tumorgenese zahlreicher Neoplasien.

#### 4.2.2.1 INTERLEUKIN-6

Interleukin-6 ist ein glykolisiertes Polypeptid und Zytokin mit einem Molekulargewicht von ca. 25 Kilodalton (kDa). IL-6 übernimmt zahlreiche Funktionen u.a. im Stoffwechsel, bei Immunantwort und auch in der Hämatopoese. Die Effekte von IL-6 sind abhängig vom aktivierten Signalweg. Hier unterscheidet man zwischen dem *classical signalling* und dem *trans signalling* (Kumari et al. 2016).

Das *classical signalling* ist der vorherrschende Typ der IL-6-Signalkaskade und beschränkt sich dennoch auf Hepatozyten, einige Epithelzellen und spezifische Leukozyten. Hier bindet IL-6 an einen membranständigen IL-6-Rezeptor (IL-6R). Dieser IL-6/IL-6R-Komplex bindet an den ubiquitär exprimierten und ebenfalls membranständigen Ko-Rezeptor gp130 und führt zu dessen Homodimerisierung mit konsekutiver JAK-STAT-Aktivierung. Der klassische Signalweg führt letztendlich zu einer verminderten Ausschüttung von proinflammatorischen Faktoren, wie dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), zu einer verstärkten Ausschüttung von antiinflammatorischen Molekülen und zu einer erhöhten Proliferations- und Regenerationsfähigkeit (Kumari et al. 2016). Beim *trans signalling* bindet IL-6 an einen löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R), der entweder durch das Bearbeiten von IL-6R mittels der Metalloprotease ADAM17 oder durch alternatives Spleißen

von IL-6R entsteht. Das *trans signalling* führt zu einer verstärkten Ausschüttung der proinflammatorischen Faktoren und begünstigt konsekutiv die Entwicklung von chronischen Entzündungsreaktionen und Kanzerogenese (Kumari et al. 2016).

Bei vielen verschiedenen malignen Karzinomen, wie z.B. Nierenzellkarzinom, Mammakarzinom oder Osteosarkomen, wurde bereits eine gesteigerte Expression und Sekretion von IL-6 im Serum und Tumorgewebe nachgewiesen (Zhang et al. 2019). Gleichzeitig ist eine erhöhte IL-6-Konzentration auch assoziiert mit einem aggressiveren Tumorwachstum und einer erhöhten Stammzellfähigkeit u.a. bei Lungen- und Kolonkarzinomen (Zhang et al. 2019). Als klinische Konsequenz konnte bei mehreren Tumorentitäten sogar eine starke direkte Korrelation zwischen hohen IL-6-Konzentrationen im Serum und einer schlechteren Überlebensrate nachgewiesen werden (Krishnamurthy et al. 2014). Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit ist auch die Erkenntnis, dass ionisierende Strahlung zu einem Anstieg der Konzentrationen von Interleukin-6 und -8 führt und dass IL-6 vermutlich eine zentrale Rolle bei erneutem Tumorwachstum nach therapeutischer Bestrahlung spielt (Wu et al. 2013). Auch beim Glioblastom – ein weiterer, bedeutenden glialer ZNS-Tumor, bei dem die Stammzellhypothese als etabliert gilt – spielt IL-6 bei der Ausbildung von Tumorstammzellen eine wichtige Rolle: Einerseits führt die Aktivierung der JAK/STAT3-Kaskade durch IL-6 ebenso zu einer Aktivierung der Tumorstammzellen und der Selbsterneuerung. Umgekehrt wird bei einer Hemmung von JAK/STAT3 ein Verlust des stammzellähnlichen Phänotyp beobachtet (West et al. 2018).

#### 4.2.2.2 INTERLEUKIN-8

Interleukin-8 ist ein proinflammatorisches Chemokin mit mannigfaltiger Funktion in der Entstehung einer Entzündungsantwort zur Rekrutierung von Leukozyten und auch in der Tumorentwicklung. Seine dazugehörigen Chemokinrezeptoren sind CXCR1 und CXCR2. (David et al. 2016)

In zahlreichen soliden Tumoren, wie z.B. Mamma-, Magen- und Kolonkarzinomen, aber auch in Hirntumoren und beim Malignen Melanom, konnten eine erhöhte IL-8-Expression und eine starke Korrelation zwischen dem Serumwert und der Tumorgroße, Stadium und Prognose registriert werden (Shimizu und Tanaka 2019). Auch ionisierende Strahlung ist in der Lage eine vermehrte IL-8-Sekretion zu induzieren (Wu et al. 2013).

Dabei scheint IL-8 auch eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Stammzeleigenschaften der Tumorstammzellen zu spielen: So konnte anhand eines In-vivo-Modells an Mäusen mit der H446-Zelllinie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC) eine signifikante Expressionssteigerung der Stammzellmarker *SOX2* und *CD44* und des murinen *NANOG*-Proteins (Nanog) beobachtet werden (Jin et al. 2018). Gleichzeitig ist schon seit längerem eine positive Korrelation zwischen dem IL-8-Rezeptor CXCR1 und den Stammzellmarkern *CD44* und *CD133* bekannt (Chen et al. 2014). Aber auch in weiteren In-vitro-Modellen mit Plattenepithelkarzinomen des

Kopfes und Halses scheint IL-8, ähnlich wie IL-6, über eine STAT3-Regulation Einfluss auf die EMT zu nehmen (Hsu et al. 2021).

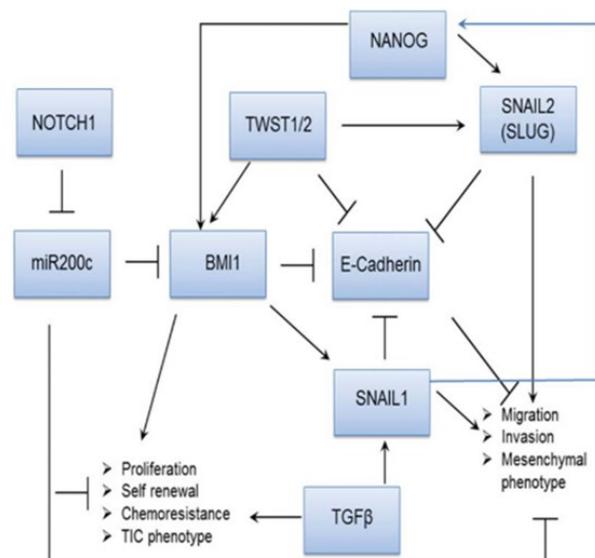
#### 4.2.3 EPIHELIAL-MESENCHYMALE TRANSITION

Während der epithelialen-mesenchymalen Transition durchlaufen epitheliale Zellen eine funktionelle und phänotypische Entwicklung und differenzieren zu mesenchymalen Zellen. Diese Entwicklung ist von zentraler Bedeutung bei der embryonalen Entwicklung, Geweberegeneration, Wundheilung, aber auch bei der Karzinommetastasierung. Die EMT geht mit charakteristischen Veränderungen einher, u.a. dem Verlust von Zell-Zell-Kontakten, Änderungen der Zellpolarität und einer Reorganisation des Zytoskeletts. Ein kanonischer Marker für die EMT ist die Hochregulierung der Vimentin-Expression, was auch die Zellmotilität fördert (Danielsson et al. 2018).

Im Detail verlieren die „starrten“, epithelialen Zellen ihre Zell-Zellkontakte bzw. die Zelladhäsionen und nehmen einen mesenchymalen Phänotyp an, der durch elongierte, motile und spindelförmige Zellen charakterisiert ist (Leggett et al. 2016). Dies geht einher mit einem erhöhten Migrationspotential in Form einer stärkeren, individuellen Bewegungsmöglichkeit, einer erhöhten Invasivität und einer vermehrten Apoptoseresistenz. Ein weiteres, typisches Kennzeichen der EMT ist der sog. *cadherin switch*: Die betroffenen Zellen verlieren die epithelialen Marker, u.a. E-Cadherin und  $\alpha$ -Catenin,  $\beta$ -Catenin und Claudin, welche durch mesenchymale Markerproteine, u.a. N-Cadherin, Vimentin und Fibronectin, ersetzt werden (Pecina-Slaus et al. 2012).

Andere bedeutenden Marker für die EMT sind die Transkriptionsfaktoren *zinc finger protein SNAI1* (SNAIL1), *zinc finger protein SNAI2* (SNAIL2 bzw. SLUG) und der *twist family bHLH transcription factor 1* (TWST1). Diese Faktoren scheinen gleichzeitig, u.a. in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Kolonkarzinomen, in Korrelation zur NANOG-Expression zu stehen: SNAIL1 führt zu einer Aktivierung von NANOG, welches wiederum in einer Aktivierung von SNAIL2 mündet (**Abb. 3**). Dieses vermittelt wiederum im Rahmen der EMT den mesenchymalen Phänotyp und fördert so die Metastasierung. Umgekehrt führte

ein doppelter Gen-Knock-out von *NANOG* und *OCT4* zu einer geringeren Expression von SNAIL2 und einer erhöhten Expression des E-Cadherins (Gawlik-Rzemieniewska und Bednarek



**Abb. 3 Einbindung von NANOG in EMT-Regulation**

Mit mehreren zwischengeschalteten Genen und Signalkaskaden reguliert NANOG über SNAIL1 und SNAIL2 die Expression von E-Cadherin und die EMT. Quelle: Gawlik-Rzemieniewska und Bednarek 2016

2016). Für Urothelkarzinome der Harnblase konnte ebenfalls eine reziproke Regulation zwischen NANOG und seinem Regulator SOX2 einerseits und dem epithelialen Marker E-Cadherin andererseits nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde auch gezeigt, dass das Ausschalten des für E-Cadherin codierenden Gens zu einer Zunahme der Tumorstammzellen und der Tumorigressivität führte (Migita et al. 2017). NANOG ist also einer der wesentlichen Bausteine der EMT. In engem Zusammenhang mit der EMT steht aber auch das Protein STAT3, das auch verantwortlich ist für Zellwachstum, -differenzierung und überleben. Es wird schon verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen, u.a. Interleukin-6, aktiviert. Die faktische Aktivierung von STAT3 erfolgt über eine Phosphorylierung des Proteins, was in einer Dimerisierung und Translokation des Proteins in den Zellkern mündet. Hier weisen 55 % der Zielgene für STAT3 auch eine Bindungsstelle für NANOG auf. Umgekehrt haben 41 % der Target-Gene zu NANOG auch eine Bindungsstelle für STAT3. NANOG und STAT3 stehen also in enger Kooperation zueinander. Dies spiegelt sich auch darin wider, dass in Versuchen mit Mäusen ein *knockdown* von NANOG zu einer signifikant erniedrigten Expression einer Vielzahl von STAT3-Genen führte. Unter der Berücksichtigung, dass die Regulation von STAT3 auch unter dem Einfluss von zahlreichen anderen Faktoren, wie z.B. Interleukin-6 und CD44, steht, ist die EMT ein zentraler, aber komplexer Regulationsprozess bei der Entstehung von Tumorstammzellen (Gawlik-Rzemieniewska und Bednarek 2016).

## 5 ZIELE DER ARBEIT

Meningeome nehmen trotz ihrer mehrheitlichen Benignität allein aufgrund ihrer Inzidenz einen hohen Stellenwert im klinischen Alltag der Neurochirurgie ein. Zwar sind einige wenige Risikofaktoren für die Entstehung einer meningealen Neoplasie bekannt. Dennoch sind die fundamentalen Prozesse in der Entstehung eines Meningeoms immer noch nicht vollständig ergründet. Unabhängig von der Tumorentität gilt die ionisierende Strahlung als wichtiger kanzerogener Faktor, der z.B. im Rahmen einer therapeutischen Bestrahlung zu sekundären Meningeomen führen kann. Obwohl der tumorinduzierende Effekt von Strahlung nicht unbekannt ist, sind die Auswirkungen auf molekularbiologischer Ebene bei Entstehung von Neoplasien teilweise noch immer unerforscht.

Diese Arbeit möchte nun auf Grundlage der klinischen Beobachtungen – Entstehung von Meningeomen nach Strahlenexposition – die Stammzellhypothese anhand der Meningeome überprüfen. Grundsätzlich soll also die Frage beantwortet werden, ob und ab welcher Dosis ionisierende Strahlung in der Lage ist sowohl in gesunder Dura mater als auch in Meningeomen eine Änderung der Genexpression herbeizuführen und so potentiell pluripotente Tumorstammzellen zu induzieren. Diese Behauptung soll zur Umsetzung in mehrere Arbeitshypothesen umgesetzt werden:

- Ionisierende Strahlung induziert in den Zellkulturen der Dura mater einen pathologischen Entwicklungsprozess bzw. die Tumorgenese. Die bestrahlten Kulturen ähneln in ihrem Profil hinsichtlich Morphologie und Genexpression Meningeomen.
- Eine nicht-fraktionierte Bestrahlung von Meningeomzellkulturen führt zu einem Malignisierungsprozess bis hin zur zellulären Reprogrammierung.
- Ionisierende Strahlung ist in der Lage sowohl im pathologischen als auch nicht-pathologischen Gewebe stammzellähnliche Zellen zu induzieren.

All diese Arbeitshypothesen zielen schließlich auf den Nachweis von strahleninduzierten, pluripotenten Tumorstammzellen ab. Da sich Stammzellen von somatischen Zellen in Morphologie, Genexpression und Proteinsynthese unterscheiden, müssen diese molekularbiologischen Ebenen auch methodisch abgedeckt werden. Dazu werden zum einen proliferative und phänotypische Alterationen mikroskopisch detektiert. Zum anderen sollen mittels immunzytochemischer Färbungen und DNA-Amplifikation Veränderungen auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden. Da auch die Interleukine eine gewichtige Rolle in der Entstehung von Tumorstammzellen einnehmen, soll auch deren Sekretion mittels einem Immunadsorptionsverfahren bestimmt werden. All diese Fragen und Methoden samt Ergebnissen müssen dabei immer in Abhängigkeit von der applizierten Strahlendosis betrachtet werden.

## 6 MATERIAL UND METHODEN

### 6.1 MATERIAL

#### 6.1.1 ZELLKULTUREN UND PATIENTENPROBEN

Bei Beginn der Versuchsreihen waren bereits laborintern primär originäre Dura mater- und Meningeom-Zellkulturen aus intraoperativ gewonnenem Patientenmaterial vorhanden. Die Meningeome können entsprechend der aktuellen und der vorhergehenden WHO-Klassifikation einem Grad 1 zugeordnet werden. Jede primäre Zellkultur wurde mit jeder Strahlendosis – inklusive die nicht bestrahlte Kontrollgruppe – ausgetestet, so dass insgesamt 48 Kulturen angelegt wurden. Zur Aufnahme des Patientenmaterials primäre Zellkulturen und zur weiteren Bearbeitung dieser Zellkulturen lag bereits ein entsprechendes Votum der Ethikkommission des Medizinischen Fakultät der FSU Jena vor (Aktenzeichen 3253-10/11).

**Tabelle 1** Auflistung der eingesetzten primären Zellkulturen und Einordnung nach Entität

Dura mater-Kulturen	Meningeom-Kulturen (WHO°I)
DM001	M°I001
DM002	M°I002
DM003	M°I003

#### 6.1.2 CHEMIKALIEN/REAGENZIEN

**Tabelle 2** Auflistung der eingesetzten Chemikalien samt Hersteller

Chemikalie	Hersteller, Ort
10x HBSS	Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold, DE
1x EBSS	Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold, DE
Accutase	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
1x PBS	Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold, DE
APS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
BSA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Chloroform	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
D-Glukose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE

DMEM	Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold, DE
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
FBS	Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold, DE
Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Formaldehyd	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Gibco™ DMEM/F-12; GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold, DE
HCl, 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
HEPES (1M)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Hoechst H33258	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Hyaluronidase	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Leibovitz L15	Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold, DE
Natriumacetat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Natriumazid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Normalserum	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
nukleasefreies Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Pronase-E	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
QIAZOL	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Triton™ X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE

Trypanblau (0,4 %)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Trypsin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Trypsin/ EDTA	Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold, DE
$\lambda$ -Carrageenan	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE

### 6.1.3 REAKTIONSLÖSUNGEN ZUR mRNA-ISOLATION

**Tabelle 3** Auflistung der für die mRNA-Isolation eingesetzten Reaktionslösungen samt Inhaltsstoffe

Lösung	Inhaltsstoffe
Reaktionslösung I	Guanidinisothiocyanat (4 mol/l) Na-N-Laurylsarcosine (0,017 mol/l) Na-Citrat 2xH <sub>2</sub> O HCl-Lösung NaOH-Lösung (1 mol/l)
Reaktionslösung II	Phenol Na-Acetat Trichlormethan
Reaktionslösung III	Isopropanol
Reaktionslösung IV	Ethanol-Lösung (70 %)
DEPC-Lösung	Diethylpyrocarbonat Destilliertes Wasser

### 6.1.4 VERBRAUCHSMITTEL

**Tabelle 4** Auflistung der eingesetzten Verbrauchsmaterialien samt Hersteller

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort
96-Well-Mikrotiterplatte	Orange Scientific n.v./s.a., Braine-l'Alleud, BEL
Auslaufpipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmün- ster, AUT
Corning® BioCoat™ Poly-D-Lysine Coverslips	Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold, DE
Gaskartuschen	Campingaz, Hungen, DE
Gewebekulturplatten	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmün- ster, AUT
Homogenisatoren	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
Objektträger	MENZEL-GLÄSER, Braunschweig, DE
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE

Pinzette	Servoprax GmbH, Wesel, DE
Pipettenspitzen mit Filter, steril (0,2-1000 µl)	STARLAB GmbH, Hamburg, DE
Pipettenspitzen ohne Filter (0,2-1000 µl)	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, DE
PP-Röhren (15, 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AUT
Reaktionsgefäße (0,6 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Skalpell	P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, DE
Sterilfilter	Satorius AG, Göttingen, DE
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AUT
Zellsieb (100 µm)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE

### 6.1.5 GERÄTE

**Tabelle 5** Auflistung der eingesetzten Geräte samt Typ und Hersteller

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
Absauganlage	Integra Vacusafe	INTEGRA Bioscience AG, Biebertal, DE
Durchlichtmikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Einhandzähler		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Elektrophoresekammer	Mupid™-One	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, DE
Färbekammer		Simport, Bernard-Pilon, CAN
Fluoreszenzmikroskop	AxioVision	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Gasbrenner	Fireboy Plus	INTEGRA Bioscience AG, Biebertal, DE
Geldokumentation	Syngene G:Box	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Inkubator	HERA Cell	Heraeus, Hanau, DE
Kühlzentrifuge	Heraeus	Thermo Scientific
Laserscanningmikroskop	LSM Meta 710	Carl Zeiss Microscopy AG, Jena, DE
Light-Cycler	Rotor-Gene®Q	Qiagen N.V., Hilden, DE
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph, Schwabach, DE
Mikrowelle		C. Bomann GmbH, Kempen, DE

Neubauer-Zählkammer	Neubauer C6	Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, DE
pH Meter	inoLab pH720	inoLab, Weilheim, DE
Pipetten		VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Pipettierhilfe	Pipetboy accu	INTEGRA Bioscience AG, Bieberthal, DE
Plattenreader	TECAN Infinite®200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, DE
Spektrophotometer	Nanodrop	NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA
Sterilbank	HERA Safe	Heraeus, Hanau, DE
Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf
Tischzentrifuge		Biozym
Vortexer	Vortex-Genie® 2	Scientific Industrie, Bohemia, NY, USA
Waage	Kern EW	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommen, DE
Wasserbad		GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, DE
Zentrifuge	Biofuge Primo R	Heraeus, Hanau, DE

### 6.1.6 KITS UND LÖSUNGEN

**Tabelle 6** Auflistung der eingesetzten Kits samt Inhalt und Hersteller

Kit	Hersteller	Inhalt
DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold, DE	DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Mix (2X)
GoScript™ Reverse Transcription System	Promega Corporation, Madison, WI, USA	Go Script™ Reverse Transcriptase Go Script™ 5X Reaction Buffer MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor PCR Nucleotide Mix, 10 mM Oligo(dT)15 Primer, 500 µg/ml Random Primers Nuclease-Free Water

RNAesyMini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden	Kieselgelsäulen RW1 RPE nukleasefreies Wasser
ELISA MAX Deluxe Set Human IL-6	BioLegend Inc., San Diego, CA, USA	Human IL-6 ELISA MAX Capture Antibody (200X) Human IL-6 ELISA Detection Antibody (200X) Human IL-6 Standard Avidin-HRP (1000X) Substrate A Substrate B Coating Buffer A (5X) Assay Diluent A (5X)
ELISA MAX Deluxe Set Human IL-8	BioLegend Inc., San Diego, CA, USA	Human IL-8 ELISA MAX Capture Antibody (200X) Human IL-8 ELISA Detection Antibody (200X) Human IL-8 Standard Avidin-HRP (1000X) Substrate A Substrate B Coating Buffer A (5X) Assay Diluent A (5X)

### 6.1.7 PRIMER

Tabelle 7 Auflistung der für die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion eingesetzten Primer für

Gen	5'-3'-Primer ( <i>forward</i> ) 3'-5'-Primer ( <i>reverse</i> )	Länge [bp]	Gencodierung
<i>NANOG1</i>	TGCAGGCAACTCACTTTATCC GTTTGCCTTTGGGACTGGTG	375	NM_024865.3
<i>NANOGP8</i>	TGGTTGGAGCCTAATCAGCGA GATTCTAAACCCTAAAGATATCCAAA CTCGT	461	NM_001297698.1
<i>SOX2</i>	TTTGTCGGAGACGGAGAAGC TAACTGTCCATGCGCTGGTT	237	NM_003106.3
<i>OCT4</i>	AGCAGATCAGCCACATCGCC CAGAACCACACTCGGACCAGTC	73	NM_002701.5
<i>MYC</i>	GGTGATGTCACCAGCCTGAG CTTCTGGCAGTGGAGGTTCC	359	NM_002467.4

<i>KLF4</i>	GGCTGTGGATGGAAATTCGC GGTGGTCCGACCTGGAAAAT	264	NM_001314052.1
<i>CD44</i>	AGTCACAGACCTGCCCAATG AACCTCCTGAAGTGCTGCTC	185	NM_001202557.1
<i>RPL13A</i>	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	126	NM_001270491.1

### 6.1.8 ANTIKÖRPER

**Tabelle 8** Auflistung der für die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzten primären Antikörper

Antigen	Antikörpername	Spezies	Hersteller	Verdünnung
CD44	CD44 (8E2)	Maus	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA	1 : 1500
EMA	Anti-EMA antibody [GP1.4]	Maus	Abcam, Cambridge, UK	1 : 100
Ki-67	Ki67 (H-300)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA	1 : 50
NANOG	Nanog (D73G4) XP™ mAb	Kaninchen	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA	1 : 1000
Nestin	Anti-Nestin antibody [10C2]	Maus	Abcam, Cambridge, UK	1 : 500
OCT4	OCT4 Polyclonal Antibody	Kaninchen	proteintech™, Manchester, UK	1 : 200
SOX2	Sox2 (D6D9) XP® Rabbit mAb	Kaninchen	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA	1 : 400
Vimentin	Monoclonal Mouse Anti-Vimentin (Clone Vim 3B4)	Maus	DakoCytomation, Glostrup, DK	1 : 50

**Tabelle 9** Auflistung der für die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzten sekundären Antikörper

Antikörpername	Hersteller
AlexaFluor® 488-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
Rhodamine Red™-X-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA

### 6.1.9 SOFTWARE

**Tabelle 10** Auflistung der eingesetzten Programme und Software

Bezeichnung	Anbieter
EndNote X9	EndNote, Thomas Reuters, Philadelphia, PA, USA
ImageJ	ImageJ; <a href="http://imagej.net">http://imagej.net</a>
PubMed	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a> ; NCBI – National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
SPSS Statistics 27	IBM, Armonk, NY, USA
Microsoft Office 2019	Microsoft, Redmond, WA, USA

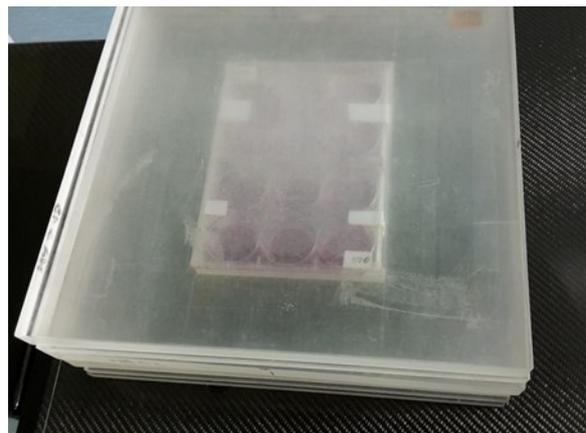
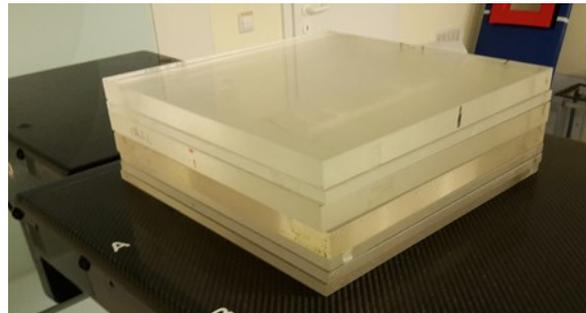
## 6.2 METHODEN

### 6.2.1 BESTRAHLUNG, ZELLKULTIVIERUNG, PROBENENTNAHME UND ZELLMORPHOLOGIE

Ausgangspunkt und -material für alle folgenden Versuche waren die sechs primären, nicht immortalisierten Zellkulturen, die aus intraoperativ gewonnenem Gewebe gezogen wurden. Dazu zählten die drei Dura mater-Zellkulturen DM001, DM002 und DM003. Die anderen drei Positionen waren die drei Meningeomzellkulturen M°I001, M°I002 und M°I003. Bei jeder Ausgangskultur wurde bereits im Vorfeld ihre histologische Herkunft durch Fachärzte für Pathologie bzw. Neuropathologie bestätigt. Bei den Meningeomen erfolgte zusätzlich die Klassifizierung als ein benigner WHO°1-Tumor. Sämtliche Zellkulturen waren bereits vorhanden und wurden laborintern übernommen. Initial erfolgte die Kultivierung mit der Aussaat der Zellen mit einer Zelldichte von  $3\text{-}5 \times 10^6/100 \text{ mm}^2$ . Die entsprechende Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Insgesamt sollte ein Spektrum von 1 Gray (Gy) bis 20 Gy abgedeckt werden. Dabei wurden nicht-fractionierte Bestrahlungen mit einer Einzeldosis von 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy, 12 Gy, 16 Gy oder 20 Gy durchgeführt. Nicht bestrahlte Kulturen wurden als Kontrollgruppe mitgeführt. Somit gab es zu jeder Primärkultur jeweils acht Interventionsgruppen und übergreifend insgesamt 48 Kulturträger.

Die Auswahl dieses Dosisspektrums wurde dabei von verschiedenen klinischen Kriterien und Beobachtungen abgeleitet: In Abhängigkeit u.a. von Restvolumen und WHO-Grad werden Meningeome im klinischen Alltag adjuvant mit einer Gesamtdosis von 60 – 70 Gy über bis zu

30 Sitzungen bzw. Fraktionen bestrahlt, so dass sich eine Einzeldosis von 1 – 4 Gy ergibt (Apra et al. 2018). Andererseits zeigten in retrospektiven Studien Patienten, die beispielsweise aufgrund einer *Tinea capitis* eine kraniale Bestrahlung im Dosisbereich von 1 Gy bis 8 Gy erhalten haben, ein signifikant erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Meningeomen, so dass auch dieser Bereich abgedeckt werden sollte. Die höheren Dosisbereiche resultieren aus der erhöhten Meningeominzidenz bei Überlebenden der Atombombenabwürfe von Hiroshima und Nagasaki (Umansky et al. 2008, Sadetzki et al. 2002).



**Abb. 4 Lagerung der Zellkulturen.** Darstellung der Plexiglasscheiben zur Lagerung der Zellkulturen während der Bestrahlung.

Am Anfang wurden die Primärkulturen so lange herangezogen und umgesetzt, bis für jede Versuchsgruppe eine bewachsene 6-Well-Platte zur Verfügung steht. Sobald in der 6-Well-Platte eine Gesamtkonfluenz von 100 % erreicht wurde, konnten die Platten mit der vorgesehenen Dosis bestrahlt werden. Am Tag der Intervention erfolgt dabei noch vor der Bestrahlung selbst ein Wechsel des Nährmediums und die Abnahme einer Mediumprobe.

Anhand der später erläuterten Ergebnisse konnten die verschiedenen Strahlendosen in mehrere Gruppen eingeteilt werden: eine Niedrigdosisgruppe mit 1 Gy und 2 Gy sowie eine Hochdosisgruppe mit 12 Gy, 16 Gy und 20 Gy. Charakteristisch für diese Gruppen war, dass ihre einzelnen Mitglieder ein ähnliches Verhalten als Reaktion auf die jeweilige Strahlendosis zeigten. Lediglich die mit 4 Gy und 8 Gy bestrahlten Kulturen ließen sich anhand dessen weder zu der einen noch zu der anderen Gruppe zuordnen. Sie können daher auch zu der *intermediate dosage group* zusammengefasst werden.

Für die Bestrahlung wurden immer zwei Kulturträger, die der gleichen Dosisgruppe zugehörig waren, in der Bestrahlungsvorrichtung positioniert (**Abb. 4**). Diese bestand aus mehreren, geschichteten Plexiglasscheiben. Die mittleren waren als Fassung für die zwei 6-Well-Platten so ausgefräst, dass die Kulturträger sowohl von oben als auch von unten vollständig bedeckt wurden. Daraufhin erfolgte die Exposition der vorgesehenen Dosis mittels eines Linearbeschleunigers, der auch für therapeutische Zwecke eingesetzt wird, und die anschließende Kultivierung der nun behandelten Zellkulturen (**Abb. 5**).

Das grundlegende Prinzip bei jeder Passagierung war die Verdopplung der Kultivierungsfläche bzw. im späteren Verlauf die Halbierung der Zellzahl. Voraussetzung für die Passagierung war jedoch im Regelfall eine unter mikroskopischer Kontrolle festgestellte Zellkonfluenz im Durchschnitt von mindestens 95 %. Im Rahmen der Passagierung wurden zunächst Proben von dem Nährmedium entnommen und rasch kryokonserviert. Das verbleibende Medium wurde verworfen. Anschließend wird die Kultur mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gründlich gespült. Die Ablösung der Zellen wurde durch eine Beschichtung des Zellteppichs mit Trypsin-Lösung erreicht. Die tatsächliche Ablösung der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Das Trypsin selber wurde wiederum durch die Zugabe von frischem Medium inaktiviert. Von diesem zellhaltigen Medium wurde nun die Hälfte des Volumens, zentrifugiert und der flüssige Überstand abgekippt, so dass ein zellreicher Bodensatz verblieb. Dieser wurde ebenfalls zügig eingefroren.

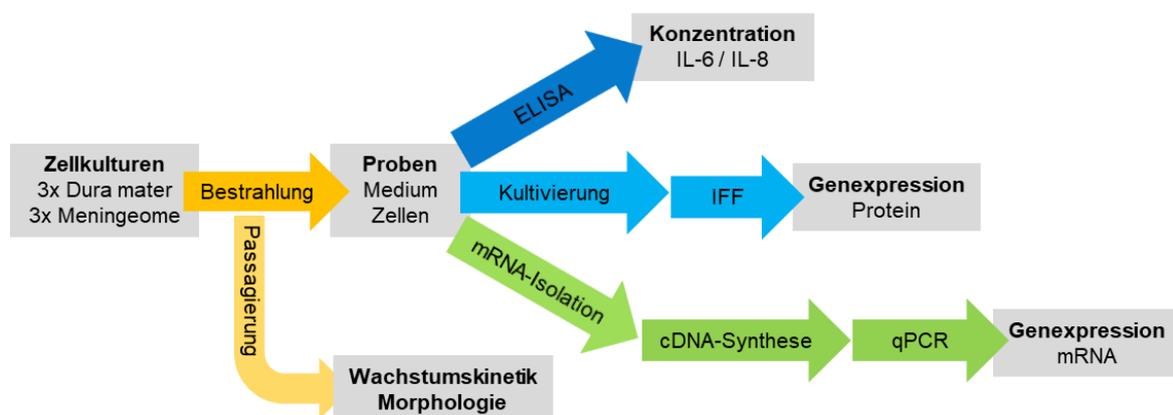
Neben einer Passagierung erfolgte dabei an jedem dritten Tag ein Wechsel des Nährmediums. Am ersten Tag nach Bestrahlung erfolgte die erste Passagierung der Kulturen unabhängig von der derzeitigen Konfluenz. Reagenz- und Probenvolumina wurden so gewählt, dass die Zellzahl halbiert wurde. Die Kultivierungsfläche von 57,6 cm<sup>2</sup> bleibt unverändert. Alle weiteren Passagierungen erfolgten nur noch unter der Voraussetzung einer mittleren Zellkonfluenz von mindestens

95 %. Bei der zweiten bzw. dritten Passagierung wurde die Fläche zusätzlich auf 115,2 cm<sup>2</sup> bzw. 225 cm<sup>2</sup> verdoppelt.

In allen weiteren Passagierungen wurde die Kultivierungsfläche beibehalten, so dass die Reagenz- und Probenvolumina so gewählt wurden, dass die Zellzahl im Nährmedium nach Passagierung halbiert war.

Die Endpunkte der Kultivierung wurden in Abhängigkeit von der Konfluenz und der Passagenzahl festgelegt: Der primäre Endpunkt lag somit bei zehn Passagierungen innerhalb von 84 Tagen nach Bestrahlung. Der sekundäre Endpunkt liegt konsekutiv bei 84 Tagen nach der Radiation. Erreichte eine Zellkultur nach der Bestrahlung also nicht 10 Passagen innerhalb von 84 Tagen, so erfolgte am 84. Tag die letzte Passagierung mit Abnahme von Zell- und Mediumproben und der Anzucht von Zellen für die spätere Immunfluoreszenzfärbung unabhängig von der Konfluenz.

Wie schon beschrieben war die Voraussetzung für eine Passagierung im Regelfall eine mittlere Konfluenz von mindestens 95 %. Diese wurde dabei mikroskopisch anhand der Kultivierungsfläche bestimmt, die von Zellen bedeckt war. Dabei wurde zunächst die Morphologie der Zellverbände anhand verschiedener Kriterien beurteilt: Vorhandensein von Zelltrümmern, Ablösung von Zellen, Zelldichte oder Ausbildung von *Multilayern* oder *Cell Clustern*. *Multilayer* beschreiben dabei eine größere Kulturfläche, die von einem kontinuierlichem, mehrreihigen oder -schichtigen Zellrasen bedeckt wird. Ein *Cell Cluster* dagegen ist eine umschriebene, zirkuläre Fläche, auf der die Zellen mehrschichtig und kolonieförmig wachsen und so auf einer kleinen Fläche zu einer massiv erhöhten Zelldichte führen. Gleichzeitig wurde auch der Phänotyp der einzelnen Zellen registriert, z.B. Größe des Zellkörpers, Adhäsion an der Grundfläche und Granulation des Zytoplasmas. Besonderes Augenmerk gilt dabei auch seneszenten Zellen, deren Fähigkeit zur



**Abb. 5 Vereinfachte und schematische Darstellung des Versuchsaufbaus**

Zu Beginn wurden die primären Zellkulturen bestrahlt. Anhand der anschließenden Passagierung konnten morphologische Veränderungen sowie die Wachstumskinetik registriert werden. Die gesammelten Zell- und Mediumproben dienten letztlich der Konzentrationsbestimmung der Interleukine und der Analyse der Genexpression mittels verschiedener Methoden.

Zellteilung stark limitiert ist und die sich im Zyklusarrest befinden: Im Vergleich zu nicht seneszenten Zellen nehmen sie an Volumen zu, verlieren ihre ursprüngliche Form, bilden einen abgeflachten Zellkörper aus und zeigen in ihrem Zytoplasma einen höheren Anteil an Granulationen (Goldstein 1990). Vor dem Hintergrund, dass die Ausbildung eines sphäroiden Phänotyps zu den typischen Stammzeleigenschaften gezählt wird, wurde auch die Ablösung kugeliger Zellen von der Kultivierungsfläche samt des Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens regelmäßig kontrolliert (Allegra et al. 2014, Nath und Devi 2016).

### **6.2.2 ISOLATION DER mRNA**

Für die Isolation der mRNA aus den Zellproben wurde ein zweitägiges Protokoll verwendet: Die kryokonservierten Zellsedimente wurden zunächst jeweils in 0,5 ml Isolationslösung I homogenisiert und anschließend mittels medizinischer Kanülen und 1 ml-Spritzen geschert und anschließend in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Dieser Zellsuspension wurden nun 0,65 ml Isolationslösung II zugefügt. Diese Suspension wurde mittels Vortexer weiter homogenisiert. Die entstandene Reaktionslösung wurde daraufhin für 30 min auf Eis gelagert. Nach diesem Arbeitsschritt erfolgte das Zentrifugieren der Reaktionslösung für 15 min bei 4 °C mit 10000 Umdrehungen pro Minute (rpm). Dabei entstanden in der Lösung mehrere Phasen, von denen die oberste, wässrige Phase die benötigte mRNA enthält. Diese Phase wurde abgenommen und in ein eigenes Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die mRNA-haltige Lösung mit der gleichen Volumeneinheit an Isolationslösung III versetzt. Der entstandene Reaktionsansatz wurde anschließend für 4 h bei -20 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Ansatz für 30 min bei 4 °C bei 14000 rpm zentrifugiert. Es setzte sich ein mRNA-haltiges Sediment ab. Der flüssige Überstand wurde entfernt. Das mRNA-Sediment wurde in 600 µl der Isolationslösung I gelöst und darauf mit 600 µl der Isolationslösung III homogenisiert. Dieser Ansatz wurde anschließend bei -20 °C für mindestens 12 h inkubiert.

Nach dieser mehrstündigen Inkubation wurde der Ansatz erneut für 30 min bei 4 °C mit 13000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des flüssigen Überstandes wurde das entstandene Sediment in 500 µl der eisgekühlten Isolationslösung IV gelöst und anschließend für 5 min bei 4 °C mit 12000 rpm zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde entfernt und dieser Vorgang wiederholt. Nach letztmaliger Entfernung des flüssigen Überstandes wurden die Reaktionsgefäße unter einer Abdeckung mit Aluminiumfolie bei einer Umgebungstemperatur von 4 – 7 °C so lange getrocknet, bis makroskopisch keine Flüssigkeitsreste vorhanden waren. Anschließend wurden die mRNA-haltigen Sedimente in 50 µl DEPC-Lösung gelöst und bei -80 °C kryokonserviert.

### **6.2.3 HERSTELLUNG VON KOMPLEMENTÄRE DNA**

Der nächste Schritt zur Auswertung der strahleninduzierten Veränderungen in der Genexpression ist die Umschreibung der mRNA in komplementäre DNA (cDNA).

Vor Beginn der cDNA-Synthese wurde bei jeder Probe die mRNA-Konzentration bestimmt. Dies erfolgte mittels Spektrophotometrie (Nano Drop 2000, Thermo Fisher Scientific). Die Reinheit wurde durch zwei Quotienten ermittelt, die sich aus der optischen Dichte, gemessen bei 260 nm/280 nm bzw. 260 nm/230 nm, ergaben.

Ausgangsmaterial ist die isolierte und in 50 µl DEPC-Wasser gelöste mRNA. Zunächst wird ein Reaktionsansatz aus 1 µl Oligo(dT)15-Primer und 1 µl Random Hexamer-Primer angesetzt. Ein Volumen von 1,25 µl dieses Reaktionsansatzes werden dann mit 10,25 µl an mRNA-Lösung vermischt, für 5 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert und dann auf 4 °C abgekühlt. Parallel hierzu wird ein zweiter Reaktionsansatz angesetzt: Dieser setzt sich zusammen aus 4 µl *reaction buffer*, 2 µl einer 2,5-millimolaren (mM) MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 1 µl einer 0,5-mM Desoxyribonukleosidtriphosphat-Lösung, 0,5 µl des RNase-Inhibitor-Ansatzes in einer Konzentration von 40 U/µl und 1 µl der Lösung mit der Reversen Transkriptase. Der bereits inkubierte und mRNA-haltige Reaktionsansatz wird nun mit 8,5 µl des zweiten Reaktionsansatzes homogenisiert. Der Gesamtansatz wird nun automatisiert im Thermocycler weiterbearbeitet: Zunächst wird für 5 min die Temperatur auf 25 °C erhöht und anschließend für 60 min auf 42 °C temperiert. Diese Sequenz wird insgesamt sechsmal durchgeführt. Abschließend wird die Temperatur für 15 min auf 70 °C erhöht und dann zur Stabilisierung auf 4 °C gesenkt.

## **6.2.4 QUANTITATIVE ECHTZEIT-POLYMERASE-KETTENREAKTION**

### **6.2.4.1 METHODIK**

Für die Durchführung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde das DyNAmo Flash SYBR Green qPCR-Kit samt 2X Master Mix (Thermo Scientific Inc.) eingesetzt. Der 2X Master Mix enthält bereits u.a. die nötige DNA-Polymerase und die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) als Bausteine für die DNA-Vervielfältigung.

Die qPCR stellt den letzten und entscheidenden Schritt in der Analyse der alterierten Genexpression dar: Ausgangsmaterial war die synthetisierte cDNA. Hierzu wurde die cDNA jeder Probe zunächst auf eine Konzentration von 10 ng/µl mit nukleasefreiem Wasser verdünnt.

Zunächst wurden 2,5 µl der cDNA-Lösung mit 5 µl des Master Mix, 1,5 µl der Primer-Lösung und 1 µl RNase-freiem Wasser in das entsprechende Reaktionsgefäß pipettiert. Es ergab sich somit insgesamt ein Reaktionsvolumen von 10 µl. Die Amplifizierung der Proben erfolgte dann am Rotor-Gene. In dem qPCR-Programm wurden die Proben zunächst zur Aktivierung der Polymerasen über 7 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die eigentliche Kettenreaktion über 40 Zyklen. Zu Beginn eines Zyklus wurden die Proben in der Denaturierungsphase über 10 Sekunden (s) auf 95 °C erhitzt. In der anschließenden *Annealing*-Phase wurde die Tempe-

ratur abgesenkt und über 20 s bei 55 °C gehalten. Lediglich für *NANOGP8* wurde eine Annealing-Temperatur von 60 °C gewählt. In der abschließenden Extensionsphase wurde die Temperatur erneut erhöht und für 30 s bei 72 °C gehalten.

Der entscheidende Mechanismus der qPCR beruht dabei auf der Messung eines spezifischen Fluoreszenzsignals: Dieses Fluoreszenzsignal wird dabei durch den SYBR Green-Farbstoff vermittelt, der bereits in den Reaktionslösungen enthalten ist. Dieser Farbstoff lagert sich an die entstehenden DNA-Stränge an und wird in seiner Signalintensität am Ende jedes Zyklus gemessen. Anhand der Signalintensität erfolgt indirekt der Erkenntnisgewinn über die ursprüngliche mRNA-Menge.

Da sich der Farbstoff jedoch auch teils unspezifisch an die DNA anlagerte, erfolgte am Ende jeder qPCR eine Kontrolle der entstandenen Produkte. Hierzu wurde eine Schmelzkurve erstellt: Die Reaktionslösung wurde progredient erhitzt. Die entstandenen DNA-Produkte wurden aufgetrennt bzw. „aufgeschmolzen“ und der Farbstoff progredient freigesetzt. So kann für jede Temperatur die Signalintensität des Farbstoffs gemessen werden. Die entstandene Schmelzkurve wurde mit einer jeweiligen Positivkontrolle der Gene verglichen, sodass die Spezifität der qPCR-Produkte bestimmt werden konnte.

#### 6.2.4.2 BERECHNUNG DER RELATIVEN EXPRESSION

Auf Grundlage von laborinternen und publizierten Vorarbeiten wurde *RPL13A* als Referenzgen (*housekeeper*) genutzt. Anhand derselben Vorarbeiten konnte auf bereits vorhandene genspezifische Primer mit jeweils bekannter Effizienz (E) bei der Amplifikation zurückgegriffen werden (Freitag et al. 2017, Freitag et al. 2018).

Zur Berechnung der relativen Expression eines Gens nach Pfaffl wurde zunächst bei jeder Probe in Abhängigkeit von Strahlendosis, Passage und Zellkultur die Differenz aus den ausgegebenen  $C_t$ -Werten von Ziel- und Referenzgen gebildet (Pfaffl 2001):

$$\Delta C_t = C_{t(\text{Zielgen})} - C_{t(\text{Referenzgen})}$$

##### **Formel 1 Berechnung von $\Delta C_t$**

Darstellung der Berechnung des  $\Delta C_t$  aus Ziel- und Referenzgen nach Pfaffl.

Anschließend wurde für jedes Zielgen und das Referenzgen in jeder Zellkultur dosisübergreifend das arithmetische Mittel aus den jeweiligen  $C_t$ -Werten berechnet. Dies wird im Folgenden als  $C_{t-MW}$  bezeichnet.

Nach Pfaffl wurde in dieser Arbeit für jede spezifische Probe das effizienzbasierte relative Expressionslevel eines Zielgens, in folgenden Kapiteln auch relative Genexpression oder Ratio (R) genannt, nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{ratio } R = \frac{E_{\text{Zielgen}}^{C_t - MW(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Probe})(\text{Zielgen})}}{E_{\text{Referenzgen}}^{C_t - MW(\text{Referenzgen}) - C_t(\text{Probe})(\text{Referenzgen})}}$$

#### **Formel 2 Berechnung der relativen Genexpression**

Darstellung der Berechnung der relativen Genexpression (ratio R) nach Pfaffl unter Einbeziehung der bereits bekannten Primereffizienzen.

Der Mittelwert der relativen Genexpression einer dosis- und Passage-abhängigen Gruppe wurde anschließend über das geometrische Mittel gebildet. Somit wurde für die ratio R die Expression des jeweiligen Zielgens – auch für die Kontrollgruppen – in Bezug zum *housekeeper RPL13A* gesetzt.

#### **6.2.5 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG**

Die Immunfluoreszenzfärbung diente dem Nachweis der strahleninduzierten Zellalterationen auf Proteinebene. Ausgangsmaterial hierfür waren die bereits passagierten bzw. abgelösten und noch in Lösung befindlichen Zellen bei Erreichen des primären oder sekundären Endpunktes. Im Vorhinein wurden gläserne Deckplättchen in 24-Well-Platten mit Poly-D-Lysin beschichtet. Die zellhaltige Lösung wurde auf die Deckplättchen geträufelt und für 48 Stunden (h) inkubiert. Sobald auf den Gläsern eine Konfluenz von mindestens 60 % erreicht wurde, wurde das Medium abgesaugt, die Kultur mit PBS gespült und jedes Well mit jeweils 0,5 ml einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) aufgefüllt und für 20 min so belassen. Nach Entfernung der PFA-Lösung wurden die Gläser erneut mit PBS gespült. Anschließend wurden sie zweimalig für jeweils 5 min mit einer 0,25 %igen PBS-Triton-Lösung beschichtet.

Zu Beginn der eigentlichen Färbung erfolgte die Blockierung der nicht adressierten Proteinbindungsstellen mittels eines Blockadepuffers. Dieser Blockadepuffer setzte sich zusammen aus PBS-0,25% Triton als Hauptträger und einem 10 %igen Anteil an fetalem Kälberserum (FBS). Jedes Well wurde mit 0,5 ml dieses Blockadepuffers für 10 min versetzt. Anschließend wurden die Primärantikörper im jeweils benötigten Verhältnis in  $\lambda$ -Carrageenan-Lösung verdünnt. Die Deckgläser wurden nun mit 0,2 ml der Antikörper-Lösung pro Well beschichtet und bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Nach Entfernung der Antikörper-Lösung und ausgiebigen Spülen mit PBS-0,25%Triton erfolgte die Hybridisierung mit dem Sekundärantikörper, der den eigentlichen Fluoreszenzfarbstoff trug und am Primärantikörper binden sollte. Auch hierzu wurde der Sekundärantikörper in einem spezifischen Verhältnis in Carrageenan gelöst, mit 0,1 ml pro Deckglas aufgetragen und erneut bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach Entfernung der Antikörper-Lösung und erneutem Spülen mit

PBS erfolgte die Kerbfärbung mit Hoechst33258 (1 : 1000) für 5 min bei Raumtemperatur. Nach erneuter Spülung mittels PBS und destilliertem Wasser wurden die Gläser mit Eindeckmedium auf Objektträgern eingedeckelt. Nach Trocknen des Mediums über Nacht konnte die Fluoreszenzmikroskopie erfolgen.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch unter entsprechender Filterung der Wellenlängen. Hierbei wurden die Lokalisation und auch die Intensität der Positivsignale berücksichtigt. Für die spätere statistische Auswertung wurde der relative Anteil der Zellen mit positivem Signal pro Deckglas herangezogen.

#### **6.2.6 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)**

Das ELISA ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht und zu den enzymatischen Immunadsorptionsverfahren gehört. Es diente in diesem Kontext der Konzentrationsbestimmung der Interleukine, u.a. IL-6 und IL-8, in den kryokonservierten Mediumproben. Zur Durchführung wurden die entsprechenden ELISA-Kits von BioLegends verwendet.

Zu Beginn wurde eine 96-Well-Platte mit dem *1x Capture Antibody* beschichtet. Dieser band einerseits am Plattenboden. Andererseits band er auch die späteren Targets – die Interleukine. Die beschichtete Platte wurde dann für 24 Stunden lichtgeschützt und bei einer Temperatur von 2 – 8 °C inkubiert. Nach Entfernung des *Capture Antibody*s und mehrfachem Spülen der Wells mit einem Waschpuffer wurde das *1x Assay Diluent A* aufgetragen, das die unspezifischen Bindungsstellen der Antikörper abdeckte. Es erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

Zeitgleich wurden mit dem Human-Standard die Verdünnungsreihen des Messstandards angesetzt. Diese Standardreihen erlaubten überhaupt erst die Konzentrationsbestimmung in den späteren Proben: Der Human-Standard enthielt das entsprechende Interleukin in Reinform. So konnte anhand der photometrischen Ergebnisse der Standardreihen bei bekannter Konzentration und Verdünnung des Human-Standards auf die Konzentration der Interleukine in den Proben durch deren optische Dichte rückgeschlossen werden. Für IL-6 deckt die Standardreihe initial eine Spanne von 7,8 pg/ml bis 1000 pg/ml ab. Für IL-8 wurde eine Spanne von ca. 8,8 pg/ml bis 1125 pg/ml gewählt.

Nach Entfernen des *Diluent A* und erneutem Waschen der Wells wurden nun die Verdünnungsreihen und die auf Eis aufgetauten Mediumproben aufgetragen und anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit banden nun die Interleukine an den spezifischen Bindungsstellen der *Capture Antibodies*.

Zwischenzeitlich wurde eine Detektionslösung mittels *200x Detection Antibody* angesetzt. Als Lösungsmittel diente erneut das *Assay Diluent A*. Nach Entfernen der Mediumlösungen und der Standardreihen und ausgiebigen Spülen der Wells wurde nun die angesetzte Detektionslösung

aufgetragen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der *Detection Antibody* band nun an den Interleukinen, die wiederum bereits an dem *Capture Antibody* gebunden waren. Gleichzeitig war der *Detection Antibody* auch mit einer Biotin-Gruppe verknüpft.

Nach Entfernen der Detektionslösung und erneutem Spülen der Wells wurde anschließend eine 1x Avidin-HRP-Lösung aufgetragen. Diese enthielt das Metalloenzym Meerrettichperoxidase (HRP), welche die Reduktion von Peroxiden katalysierte. Das Enzym war mit Avidin verknüpft, welches wiederum eine hohe Affinität zum Biotin des *Detection Antibody*s besaß. Nach Entfernung der Detektionslösung wurde nun die Avidin-HRP-Lösung aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die HRP band nun über ihre Avidin-Gruppe an der Biotin-Gruppe der *Detection Antibodies*, welche wiederum am Interleukin gebunden waren. Nach Abkippen der Avidin-HRP-Lösung wurde nun die Substratlösung aufgetragen, die sich zu gleichen Teilen aus Substrat A und Substrat B zusammensetzte. Die Inkubation erfolgte für ca. 15 – 25 min bei Raumtemperatur unter absolutem Lichtausschluss. Die Substratlösung bildete das Edukt für die Meerrettichperoxidase und ist zu Beginn farblos. Erst durch die Reduktion durch die HRP erfolgt ein Umschlag in einen gelben Farbton. Der Abbruch chemischen Reaktion war hierbei auch von den Standardreihen abhängig: Erst wenn hier bereits makroskopisch klare Abstufungen in der Farbintensität erkennbar waren, erfolgte die Reduktion auf der gesamten 96-Well-Platte mittels 1M Schwefelsäure-Lösung. Dabei war ein plötzlicher Farbumschlag von Gelb zu Blau zu beobachten.

Anschließend erfolgte die Ausmessung der optischen Dichte mit einem Photometer (Tecan Sunrise): Unabhängig von Substrat und Target lag die Messlängenwelle bei 450 nm. Als Referenzwellenlänge wurden 562 nm gewählt.

Die Messwerte der optischen Dichte der einzelnen Standardkonzentrationen werden anschließend als Y-Koordinaten gegen die bekannten Konzentrationen auf einer X-Achse in einem Diagramm eingetragen. Hiervon wurde eine quadratische Funktion als Standardkurve abgeleitet, anhand derer die Interleukin-Konzentration in den Messproben bestimmt bzw. berechnet wurden.

### **6.2.7 ANALYSE UND STATISTISCHE TESTS**

Für die statistische Analyse und Auswertung wurde die Software *SPSS Statistics* (Version 27) von IBM und Microsoft Excel 2019 verwendet. Außerdem wurden die Beratungsangebote des Instituts für Medizinische Statistik, Informatik und Datenwissenschaften des Universitätsklinikums Jena genutzt.

Für die statistischen Tests wird das Signifikanzniveau mit  $p \leq 0,050$  gewählt.

Bei der Analyse der Proliferationskinetik stand insbesondere der Zeitpunkt des Erreichens des primären bzw. sekundären Endpunktes in Abhängigkeit von der Strahlendosis im Mittelpunkt. Es wurde also der zeitliche Verlauf betrachtet, nach wie vielen Tagen nach Intervention eine

Passage erreicht wird. Hierzu wurde das Gemischt Lineare Modell (MLM) verwendet. Als Referenz bzw. Kontrollgruppe dienten im Regelfall die nicht bestrahlten Zellkulturen.

Gleichzeitig sollte – auch in Abhängigkeit von Strahlendosis und Gewebeentität – verglichen werden, nach wie vielen Passagen erstmals abgelöste oder sphäroide Zellen auftraten. Gewöhnlich erfolgte dies mittels T-Test in Bezug auf die Kontrollgruppen.

Unterschiede in der Genexpression auf Proteinebene, dargestellt durch die Immunfluoreszenzfärbung, wurden primär statistisch mittels des exakten Fisher- bzw. Chi-Quadrat-Test analysiert. Auch hier wurden Messwerte der nicht bestrahlten Zellkulturen als Maßstab herangezogen. Bei diesem wurde wiederum die exakte zweiseitige Signifikanz verwendet.

Bei der Genexpression auf mRNA-Ebene erfolgte in jeder Passage eine Messung mittels qPCR. Es bot sich daher auch hier an mittels Gemischt linearem Modell die Genexpression einer Interventionsgruppe im zeitlichen Verlauf mit der Kontrollgruppe zu vergleichen. Dabei war zu berücksichtigen, dass hierbei eine Normierung der Expression der Zielgene sowohl für die Kontrolle- als auch für die Interventionsgruppen in Bezug auf den *housekeeper RPL13A* erfolgte. Somit galt effektiv für die Kontrollgruppen  $R_{MW}^{\text{Zielgen}} \neq 1$ , solange Ziel- und Referenzgen nicht tatsächlich gleich stark exprimiert waren.

Ähnlich verhielt es sich bei der Auswertung der Interleukine: Bei jeder Passagierung erfolgte eine Messung der Interleukin-konzentration mittels ELISA. Dadurch erhielt man für jede Interventionsgruppe eine Messkurve im Zeitverlauf bzw. in Bezug auf die Passage, die im Regelfall mit der Kurve der Kontrollgruppe im Gemischt Linearen Modell verglichen wurde.

## 7 RESULTATE

Um den Einfluss der ionisierenden Strahlung auf meningeale Zellkulturen zu bestimmen wurden mehrere Parameter untersucht. Dazu zählen die zelluläre Morphologie einschließlich des Auftretens der sphäroiden Wuchsform und Wachstumsverhalten sowie Veränderungen in der Expression von mRNA, Proteinen und der Sekretion von Interleukinen.

### 7.1 EINFLUSS DER IONISIERENDEN STRALUNG AUF MORPHOLOGIE UND WACHSTUMSVERHALTEN

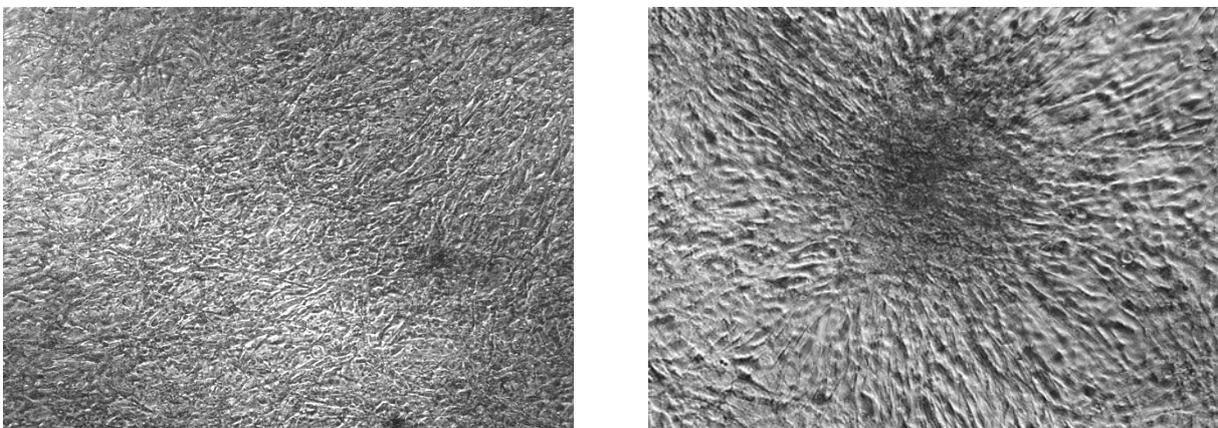
#### 7.1.1 DESKRIPTIVE VERÄNDERUNGEN DER ZELL- UND KULTURMORPHOLOGIE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER STRAHLENDOSIS

##### 7.1.1.1 MORPHOLOGIE

Bereits während des postinterventionellen Beobachtungsintervalls, beginnend am ersten Tag nach der Bestrahlung, zeigten sich in ausgeprägter Dosisabhängigkeit morphologische Veränderungen sowohl der Zellverbände als auch der einzelnen Zellen.

Im Niedrigdosisbereich von 1 bis 2 Gy ließ sich nach Bestrahlung die vermehrte Ausbildung eines mehrschichtigen Zellrasens (*Multilayer*) beobachten (**Abb. 6**). Im zeitlichen Verlauf der Passagierungen entwickelten sich zusätzlich kolonieförmige Zellhaufen (*Cell Cluster*) mit einer massiv erhöhten Zelldichte. Zeitgleich lösten sich nach Bestrahlung vermehrt Zellen aus den Zellverbänden und es lagen freie Einzelzellen oder als Zellaggregate (Sphäroide Grad 1) im Nährmedium vor.

Nach einer Intervention von 12 Gy oder höher (Hochdosisbereich) zeichnete sich dagegen ein Bild der zunehmenden Zelloberfläche ab: Das Nährmedium war reich an Zelltrümmern und -fragmenten. Das Zytoplasma der einzelnen Zellen war rasch und deutlich granuliert. Insgesamt kam es zu einem massiven Zelluntergang nach Bestrahlung. Zwar kam es auch in diesen Kulturen zu einer Ablösung von Zellen aus ihren Verbänden, welche deskriptiv sowohl bei den Meningeomzellen als auch bei der Dura mater-Zellkulturen früher auftrat als im Niedrigdosisbereich. Aber spätestens ab einer Dosis von 12 Gray entwickelten sich weder bei der einen noch bei der



**Abb. 6 Exemplarische Darstellung der zellulären Morphologie**

a) Darstellung eines multilayers in einer mit 1 Gy bestrahlten Dura mater-Kultur. b) Darstellung eines cell clusters anhand einer mit 4 Gy bestrahlten Dura mater-Kultur.

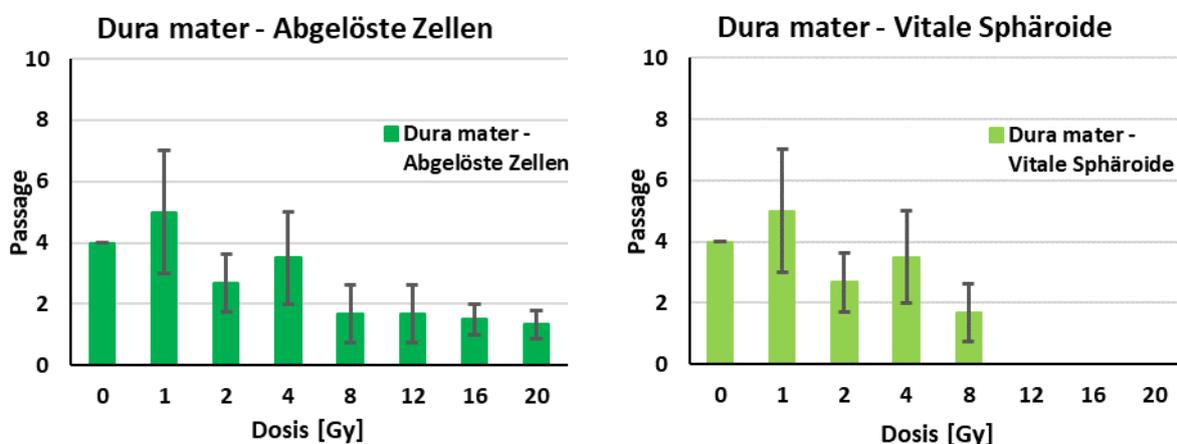
anderen Entität vitale Sphäroide. In ihrem Phänotyp ähnelten die verbleibenden, adhärenen Zellen einem seneszenten Zelltyp.

### 7.1.1.2 SPHÄRENFORMATION

Da die Ausbildung von sphäroiden Zellverbänden als eine essenzielle Stammzeleigenschaft gewertet wird, sollte der Blick insbesondere auf das zeitlich Auftreten von nicht adhärenen Zellen und Sphäroiden gelenkt werden. Auch hier dienten die nicht-bestrahlten Kulturen als Kontrollgruppe.

#### 7.1.1.2.1 ABLÖSEVERHALTEN DER DURA MATER-ZELLEN

Es zeigten sich im Falle der Dura mater-Zellkulturen bereits im Niedrigdosisbereich entsprechende Effekte auf die Ausbildung der Zellverbände: Während sich in der Kontrollgruppe im Mittel nach 4,0 Passagen (SD  $\pm$  0,00) die ersten Zellen aus den Zellverbänden lösten, geschah dies bei einer 1 Gy-Intervention erst nach 5,0 Passagen (SD  $\pm$  2,00). Gleichzeitig traten nach einer Bestrahlung mit 2 Gy die ersten Zellen bereits im Mittel nach 2,7 Passagen (SD  $\pm$  0,94) in das Medium über (**Abb. 7**). Ab einer Dosis von 4 Gy war der Zeitpunkt der Loslösung stetig früher zu detektieren: Bei 4 Gy lösten sich die ersten Zellen nach 3,5 Passagen (SD  $\pm$  1,50) aus den Verbänden, bei 8 Gy und 12 Gy bereits jeweils nach 1,7 Passagen (SD<sub>8Gy/12Gy</sub>  $\pm$  0,94). Nach einer Radiatio mit 16 Gy konnten die ersten frei im Medium schwimmenden Zellen schon nach 1,5 Passagen (SD  $\pm$  0,50) beobachtet werden. In der 20 Gy-Gruppe war dies sogar bereits nach 1,3 Passagen (SD  $\pm$  0,47) der Fall. Hinsichtlich des Zeitpunktes des erstmaligen Auftretens von abgelösten Zellen war bei keiner Strahlendosis ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den einzelnen Interventionsgruppen der Dura mater registrierbar (T-Test,  $p > 0,05$ ). Allerdings ließ sich für die 2 Gy-Kulturen eine Tendenz zu einem früheren Auftreten der vitalen Sphäroide registrieren als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,423$ ).



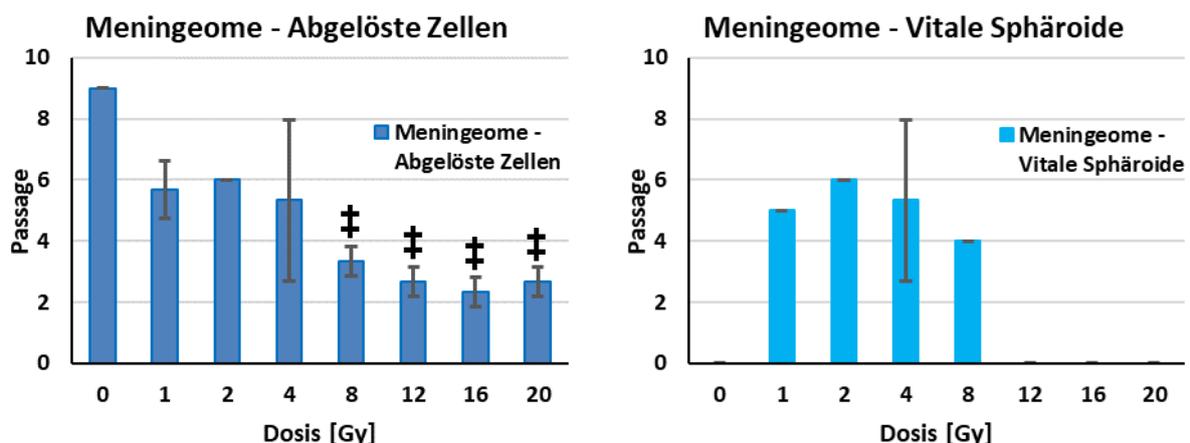
**Abb. 7 Abgelöste und sphäroide Zellen in der Dura mater**

In allen Zellkulturen wart eine Ablösung von Zellen nachzuweisen. Allerdings waren nur bis einschließlich 8 Gy auch vitale Sphäroide zu beobachten. (T-Test;  $p \leq 0,050$ )

Auffällig innerhalb der Gruppe der Dura mater-Zellkulturen war jedoch, dass das erstmalige Auftreten von abgelösten und sphäroiden Zellen zeitlich zusammenfiel: Dies bedeutet, dass in der Kontrollgruppe vitale Sphäroide nach 4,0 Passagen ( $SD \pm 0,00$ ) auftraten, bei 1 Gy nach 5,0 Passagen ( $SD \pm 2,00$ ), bei 2 Gy nach 2,7 Passagen ( $SD \pm 0,94$ ), bei 4 Gy nach 3,5 Passagen ( $SD \pm 1,50$ ) und bei 8 Gy nach 1,7 Passagen ( $SD \pm 0,94$ ). Ab einer Strahlendosis von 12 Gy waren keine vitalen Sphäroide zu beobachten. Dementsprechend fielen auch die Ergebnisse des unverbundenen T-Tests aus: Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich auch hier bei keiner Strahlendosis ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des zeitlichen Auftretens der Sphäroide (T-Test,  $p > 0,05$ ).

#### 7.1.1.2.2 ABLÖSEVERHALTEN DER ZELLEN IN PRIMÄREN MENINGEOMZELLKULTUREN

Bei den Kulturen der Meningeome zeichnete sich dagegen ein konträres Bild ab: In der Kontrollgruppe lösten sich erst nach 9,0 ( $SD \pm 0,00$ ) Passagen erstmalig Zellen ab. Dabei wurden im Verlauf zu keinem Zeitpunkt vitale Sphäroide beobachtet (**Abb. 8**). In allen Interventionsgruppen kam es zu einer früheren Auslösung von Zellen. Im Niedrigdosisbereich traten bei 1 Gy bzw. 2 Gy die ersten freien Zellen bereits nach 5,7 Passagen ( $SD \pm 0,94$ ) bzw. 6,0 Passagen ( $SD \pm 0,00$ ) auf. Mit steigender Strahlendosis lösten sich die Zellen initial immer früher ab: Bei 4 Gy waren es 5,3 Passagen ( $SD \pm 2,62$ ) und bei 8 Gy nur noch 3,3 Passagen ( $SD \pm 0,47$ ). Bei 12 Gy erfolgte die Trennung vom Zellverband bereits nach 2,7 Passagen ( $SD \pm 0,47$ ), bei 16 Gy sogar schon nach 2,3 Passagen ( $SD \pm 0,47$ ). Erst nach Bestrahlung mit einer Dosis von 20 Gy verschob sich der Zeitpunkt wieder auf 2,7 Passagen ( $SD \pm 0,47$ ). Bis zu einer Strahlendosis von einschließlich 4 Gy konnten für keine der ermittelten Passagenzahlen signifikante Unter-



**Abb. 8 Abgelöste und sphäroide Zellen in den Meningeom-Kulturen**

In allen Zellkulturen konnte eine Ablösung von Zellen beobachtet werden, wobei dies bei den Interventionsgruppen deskriptiv früher erfolgte. Vitale Sphäroide waren nur im Bereich von 1 Gy bis 4 Gy nachweisbar. Markierung von Signifikanzen mittels ‡ im entsprechenden Diagramm. (T-Test;  $p \leq 0,050$ )

schiede ermittelt werden. Eine Bestrahlung von 8 Gy oder höher führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem statistisch signifikant früheren Auftreten von abgelösten und im Medium freien Meningeomzellen (T-Test; jeweils pro Strahlendosis  $p < 0,050$ ).

Auch beim Auftreten der vitalen Sphäroide wiesen die Meningeome ein divergentes Verhalten auf: In der Kontrollgruppe waren zu keinem Zeitpunkt Sphäroide nachweisbar. Nach einer Bestrahlung mit 1 Gy traten bereits nach 5,0 Passagen (SD  $\pm 0,00$ ) sphäroide Zellformationen auf. Dies steht nur scheinbar im Widerspruch zum Zeitpunkt des ersten Ablösens von Zellen. Tatsächlich liegt hier lediglich ein statistisches Kuriosum vor: Bei allen drei Kulturen lösten sich bestrahlte Zellen aus dem Verband. Bei zwei Meningeomzellkulturen war dies nach jeweils 5 Passagen der Fall, bei der dritten Kultur nach 7 Passagen. Allerdings ließen sich nur bei den beiden ersten Kulturen auch nach jeweils 5 Passagen vitale Sphäroide nachweisen. Die dritte Kultur bildete keine Sphäroide aus, so dass im statistischen Mittel vitale Sphäroide früher nachweisbar waren als abgelöste Zellen.

Im Falle einer 2 Gy- und 4 Gy-Intervention markierte die Ablösung von Zellen nach 6,0 Passagen (SD  $\pm 0,00$ ) bzw. 5,3 Passagen (SD  $\pm 2,62$ ) auch das erstmalige Auftreten von Sphäroiden. Erst bei 8 Gy zeigten sich Sphäroide erst nach 4,0 Passagen (SD  $\pm 0,00$ ) und somit später als die ersten abgelösten Zellen. Im Hochdosisbereich von 12 Gy bis 20 Gy waren potentielle Tumorstammzellen im gesamten Verlauf zu keinem Zeitpunkt detektierbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich vitale, sphäroide Zellen in den Meningeomzellkulturen lediglich im Dosisbereich von 1 Gy bis 8 Gy entwickelten. Dabei war statistisch nicht nachvollziehbar, ob eine bestimmte Dosis ein früheres oder späteres Auftreten der Sphäroide induzierte.

## **7.1.2 DER EINFLUSS DER BESTRAHLUNG AUF DIE PROLIFERATION VON DURA MATER- UND MENINGEOMZELLEN**

Der zweite Schritt zur Beurteilung des Strahleneinflusses war die Beantwortung der Frage, inwiefern sich das Wachstumsverhalten der Zellkulturen nach Bestrahlung veränderte. Dieser Sachverhalt ist auch im klinischen Kontext interessant, da die Strahlentherapie sowohl im kurativen als auch im palliativen Ansatz zur Verlangsamung des Tumorwachstums bzw. zur Reduktion des Tumolvolumens eingesetzt wird.

### **7.1.2.1 PROLIFERATIONSKINETIK DER DURA MATER**

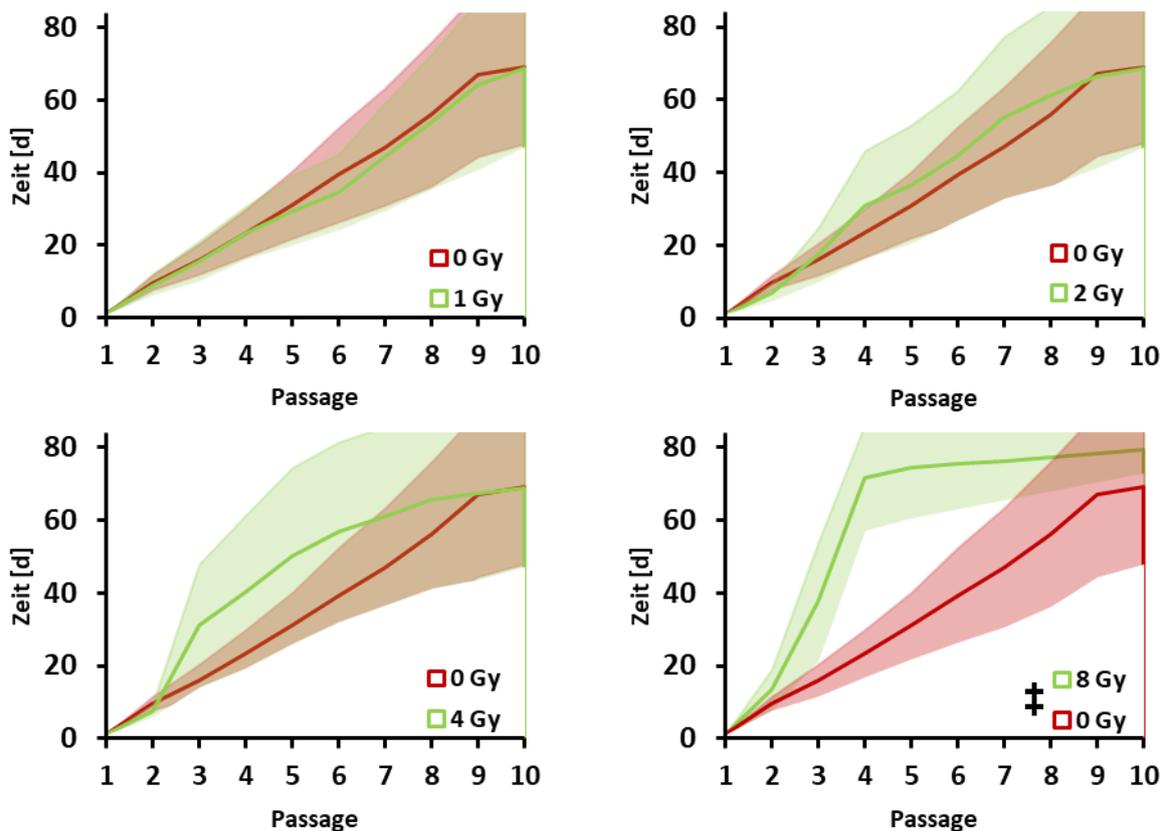
Die nicht bestrahlten Kontrollgruppen der Dura mater erreichten den Versuchsendpunkt im Mittel nach 69 Tagen.

Die 1 Gy- und 2 Gy-Kulturen erzielten ihren gemittelten Endpunkt jeweils 68,7 Tagen nach Bestrahlung. Dabei wurde in beiden Interventionsgruppen der primäre Endpunkt jeweils nur durch die DM003-Kulturen erzielt. Allerdings ließ sich durch die Radiatio kein signifikanter Einfluss auf die Wachstumsdynamik beobachten (1 Gy,  $p = 0,835$ ; 2 Gy,  $p = 0,691$ ) (**Abb. 9**).

Ein ähnliches Verhalten ließ sich auch nach einer Bestrahlung mit 4 Gy beobachten: Auch hier erreichte nur die DM003-Kultur nach 38 Tagen den primären Endpunkt, während bei den restlichen zwei Kulturen der sekundäre Endpunkt bei 5 und 8 Passagen eintrat. Insgesamt führte eine Dosis von 4 Gy tendenziell bereits zu einer Hemmung der Wachstumsproliferation ( $p = 0,223$ ). Dieser inhibitorische Effekt fiel in Passage 8 am stärksten aus ( $p = 0,171$ ), so dass es in den verbleibenden Passagen wieder zu einer Angleichung des Wachstumsverhalten von Interventions- und Kontrollgruppe kam.

Nach einer Radiatio mit 8 Gy wurde der Versuchsendpunkt erst nach 79,3 Tagen erreicht. Dieser lag nahe am Definitionspunkt des sekundären Endpunktes und war bereits ein deskriptiver Hinweis für die signifikante Wachstumshemmung nach 8 Gy ( $p = 0,002$ ). Diese inhibitorische Effekt trat dabei erstmals ab der 5. Passage auf ( $p = 0,026$ ).

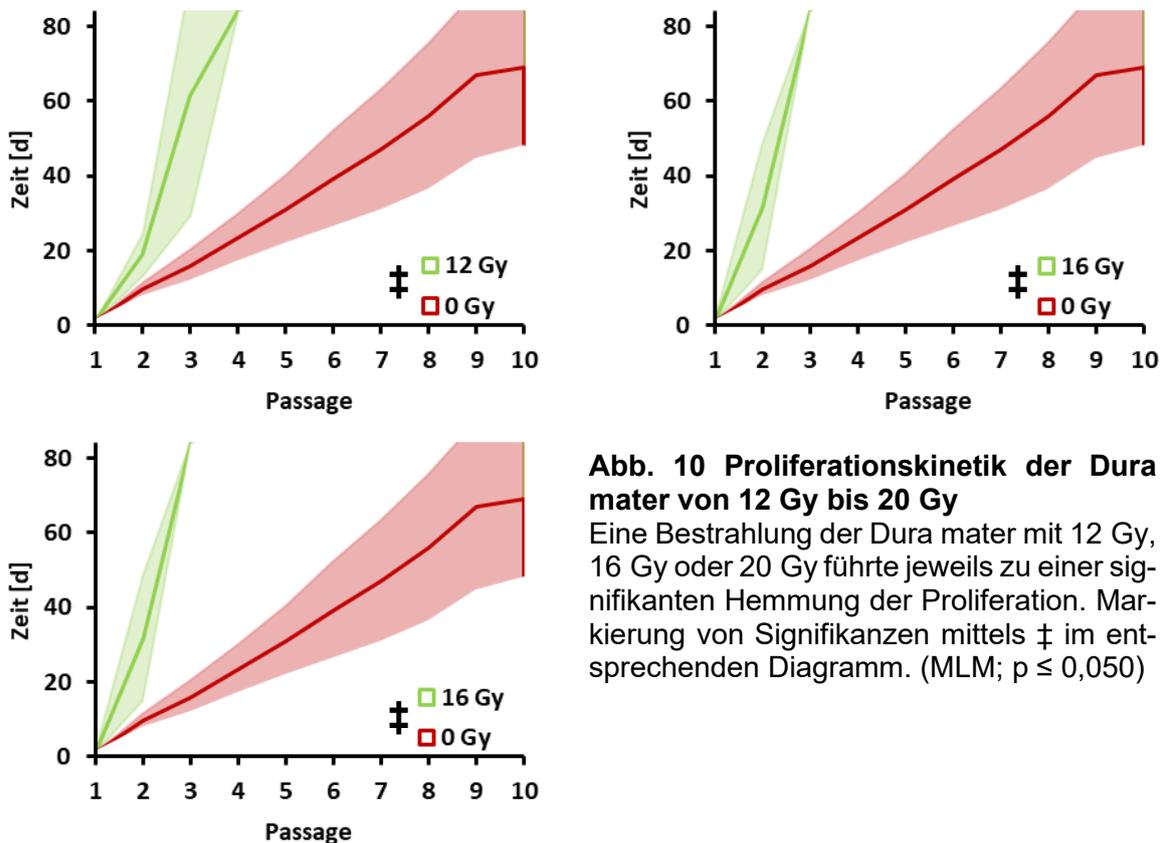
Ab einer Strahlendosis von 12 Gy oder höher erreichte keine Zellkultur mehr den primären Endpunkt. Es ließ sich eine massive Hemmung der Proliferation nachweisen (jeweils  $p < 0,001$ ) (Abb. 10).



**Abb. 9 Proliferationskinetik der Dura mater von 1 Gy bis 8 Gy**

Weder bei 1 Gy noch bei 2 Gy ließen sich selbst tendenzielle Veränderungen in der Proliferationskinetik nachweisen. Lediglich bei 4 Gy zeigte sich ein Intervall mit der Neigung zur Wachstumshemmung. Für 8 Gy lag eine signifikante Inhibition der Proliferation vor. Markierung von Signifikanzen mittels ‡ im entsprechenden Diagramm. (MLM;  $p \leq 0,050$ )

Anhand dieser Daten ließ sich die effektive Dosis (ED<sub>50</sub>) für die Dura mater als ED<sub>50</sub> = 6,95 Gy berechnen. Bei einer nicht-fraktionierten Bestrahlung mit mehr als 6,95 Gy würden die bestrahlten Kulturen weniger als 5 Passagen erreichen.



**Abb. 10 Proliferationskinetik der Dura mater von 12 Gy bis 20 Gy**  
 Eine Bestrahlung der Dura mater mit 12 Gy, 16 Gy oder 20 Gy führte jeweils zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation. Markierung von Signifikanzen mittels ‡ im entsprechenden Diagramm. (MLM;  $p \leq 0,050$ )

#### 7.1.2.2 PROLIFERATIONSKINETIK DER MENINGEOME

Die Kontrollgruppe der Meningeome erreichte ihren Endpunkt nach 77,7 Tagen. Tatsächlich erreichte von den drei Zellkulturen nur eine den primären Endpunkt. Bei Betrachtung sämtlicher Kulturen anhand der Kriterien des primären Endpunktes lag die maximal erreichte Passagenzahl bei 8,33 nach 66 Tagen (**Abb. 11**).

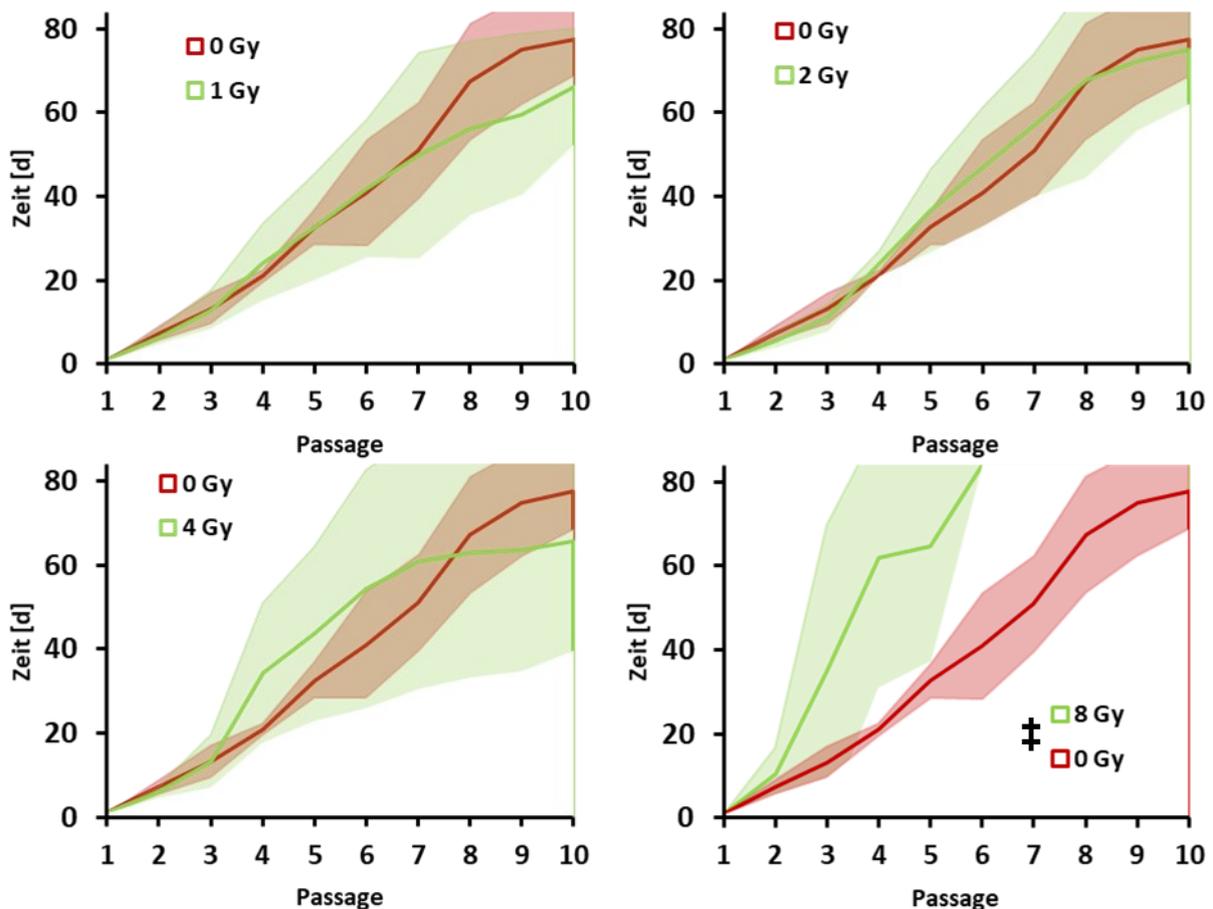
Die mit 1 Gy bestrahlten Meningeome erreichten ihren Endpunkt im Mittel nach 66,3 Tagen und somit 11,4 Tage früher als die Kontrollgruppe. Tatsächlich erfüllten sogar zwei Zellkulturen die Kriterien des primären Endpunktes. Es fiel auf, dass die Divergenz zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe sich erst ab Passage 7 entwickelte und die maximale Differenz von 15,3 Tagen in Passage 9 auftrat. Dennoch ließ sich im Gesamtverlauf kein relevanter Strahleneffekt auf das Zellwachstum nachweisen ( $p = 0,663$ ). Andererseits konnte im isolierten Intervall ab einschließlich Passage 7 aufwärts eine deutliche Tendenz zur Stimulation der Proliferation nachgewiesen werden ( $p = 0,071$ ).

Die Wachstumskurve der mit 2 Gy bestrahlten Meningeomzellen undulierte stärker: Zwar wurde der Endpunkt im Mittel nach 75 Tagen und somit in ähnlicher Geschwindigkeit wie durch die

Kontrollgruppe erreicht. Allerdings überschritten sich ihre Graphen mehrfach, so dass sich Phasen von deskriptiver Wachstumshemmung und -beschleunigung abwechselten. Im Endeffekt ließ sich jedoch auch nach 2 Gy am Endpunkt kein relevanter Strahleneffekt nachweisen ( $p = 0,903$ ).

Nach einer Bestrahlung von 4 Gy erreichten die Meningeome ihren Endpunkt nach 65,7 Tagen und somit 12 Tage früher als die Kontrollgruppe.

Hinsichtlich der Wachstumskurve undulierten die 4 Gy-Kulturen ähnlich wie die 2 Gy-Meningeome. Die Differenz zur Kontrollgruppe fiel jedoch deutlich stärker aus: So erreichte die Kontrollgruppe die Passagen 4 und 6 jeweils 13,3 Tage früher als die 4 Gy-Gruppe, was eher für eine Wachstumshemmung durch Bestrahlung spricht. In Passage 8 kehrten sich jedoch die Vorzeichen wieder um und die 4 Gy-Kulturen erreichten ihren Endpunkt 12 Tage früher. Im Endeffekt glichen sich diese Phasen von Proliferationsstimulation und -inhibition so aus, dass sich am Endpunkt kein relevanter Strahleneffekt nachweisen ließ ( $p = 0,820$ ). Bei isolierter Betrachtung verschiedener Kurvenabschnitte zeigte sich jedoch im Intervall von Passage 3 bis 7 die Tendenz



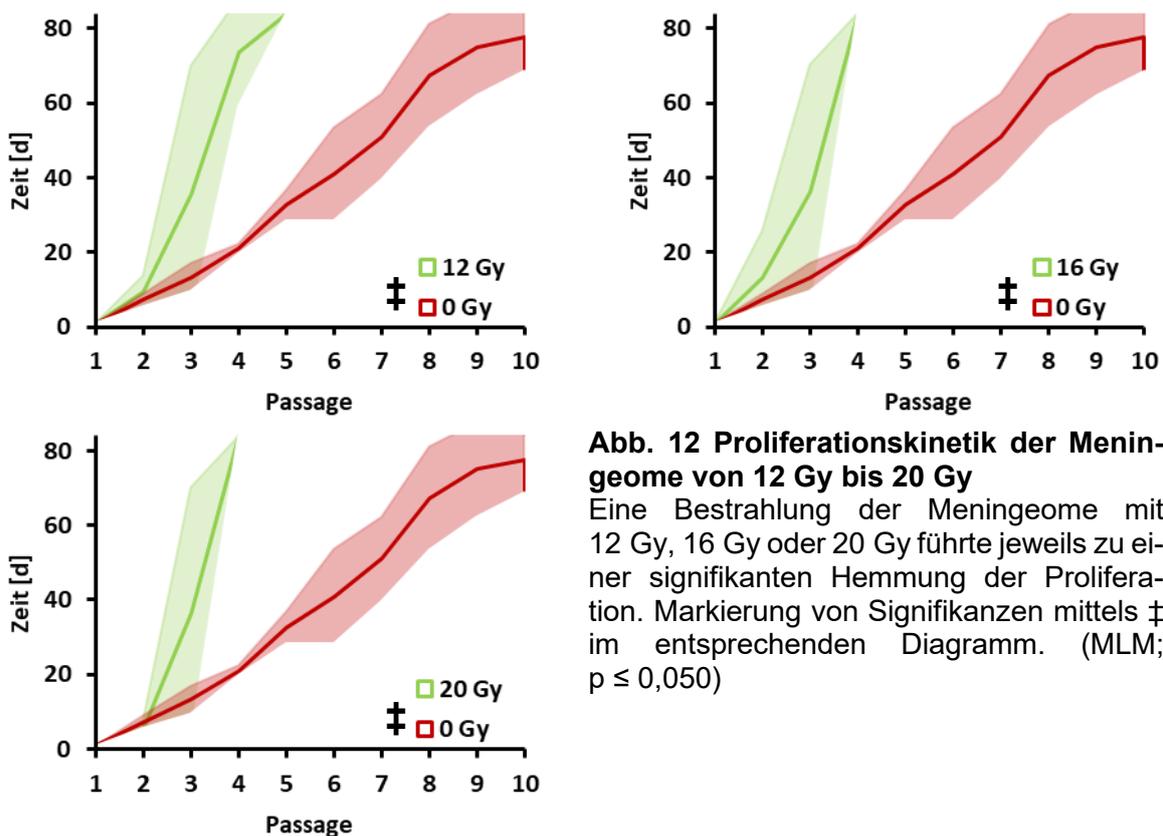
**Abb. 11 Proliferationskinetik der Meningeome von 1 Gy bis 8 Gy**

Insbesondere bei 1 Gy und 4 Gy konnten Intervalle mit Neigungen zur Wachstumshemmung als auch zur Wachstumsstimulation beobachtet werden. Allerdings führten nur die 8 Gy über den Gesamtverlauf zu einem signifikanten Strahleneffekt im Sinne einer Wachstumshemmung. Markierung von Signifikanzen mittels ‡ im entsprechenden Diagramm. (MLM;  $p \leq ,050$ )

zur strahleninduzierten Wachstumshemmung ( $p = 0,251$ ), während sich im anschließenden Intervall von Passage 8 bis 10 eine stärkere Tendenz zur strahleninduzierten Wachstumsstimulation beschreiben ließ ( $p = 0,109$ ).

Bei einer Dosis von 8 Gy und höher fiel das Bild klarer aus: Hier führten die Strahleneffekte zu einer deutlichen Hemmung des Kulturwachstums. Keine der Kulturen erreichte den primären Endpunkt. Das sekundäre Abbruchkriterium wurde dabei *per definitionem* nach 84 Tagen erfüllt. Sowohl eine Bestrahlung mit 8 Gy ( $p = 0,013$ ), als auch mit 12 Gy ( $p = 0,004$ ), 16 Gy ( $p = 0,002$ ) und 20 Gy ( $p = 0,003$ ) führte zu einer signifikanten Wachstumshemmung (**Abb. 12**).

Mittels Excel wurde erneut anhand der maximal erreichten Passagenzahl eine Trendlinie mit der dazugehörigen exponentiellen Funktion erstellt. So ließ sich eine effektive Dosis von  $ED_{50} = 6,77$  Gy für die Bestrahlungsversuche der benignen Meningeomzellkulturen berechnen. Es konnte also davon ausgegangen werden konnte, dass bei einer Dosis von 8 Gy mehr als 50 % der Meningeomzellkulturen eine signifikante Wachstumshemmung erfuhren. Auffällig ist, dass die einzelnen  $ED_{50}$  von M°I002 und M°I003 einen Wert von 4,80 Gy nicht überschritten, während die  $ED_{50}$  für M°I001 mit 10,45 Gy die  $ED_{50}$  für die gesamten Meningeom um mehr als 3 Gy überschreitet und somit näher an den 12 Gy als an den 8 Gy liegt. Aufgrund dieser Beobachtung wurden in den folgenden Analysen, soweit relevant, auch die Ergebnisse der 12 Gy-Versuchsgruppe entitätsübergreifend differenzierter dargestellt.



**Abb. 12 Proliferationskinetik der Meningeome von 12 Gy bis 20 Gy**

Eine Bestrahlung der Meningeome mit 12 Gy, 16 Gy oder 20 Gy führte jeweils zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation. Markierung von Signifikanzen mittels ‡ im entsprechenden Diagramm. (MLM;  $p \leq 0,050$ )

Obwohl sich Meningeome und Dura mater-Kulturen in ihrem postinterventionellen Proliferationsverhalten doch wesentlich unterschieden, lag die ED<sub>50</sub> der Meningeome nur unwesentlich unter der ED<sub>50</sub> der Dura mater. Vom rein deskriptiven Standpunkt aus ließ sich hieraus dennoch ableiten, dass die Tumorkulturen strahlensensibler waren und es daher einer geringeren Dosis bedurfte, um eine effektive Hemmung des Tumorwachstums zu erzielen.

## 7.2 EXPRESSIONSANALYSEN

### 7.2.1 STRAHLENINDUZIERTE PROTEINEXPRESSIONEN

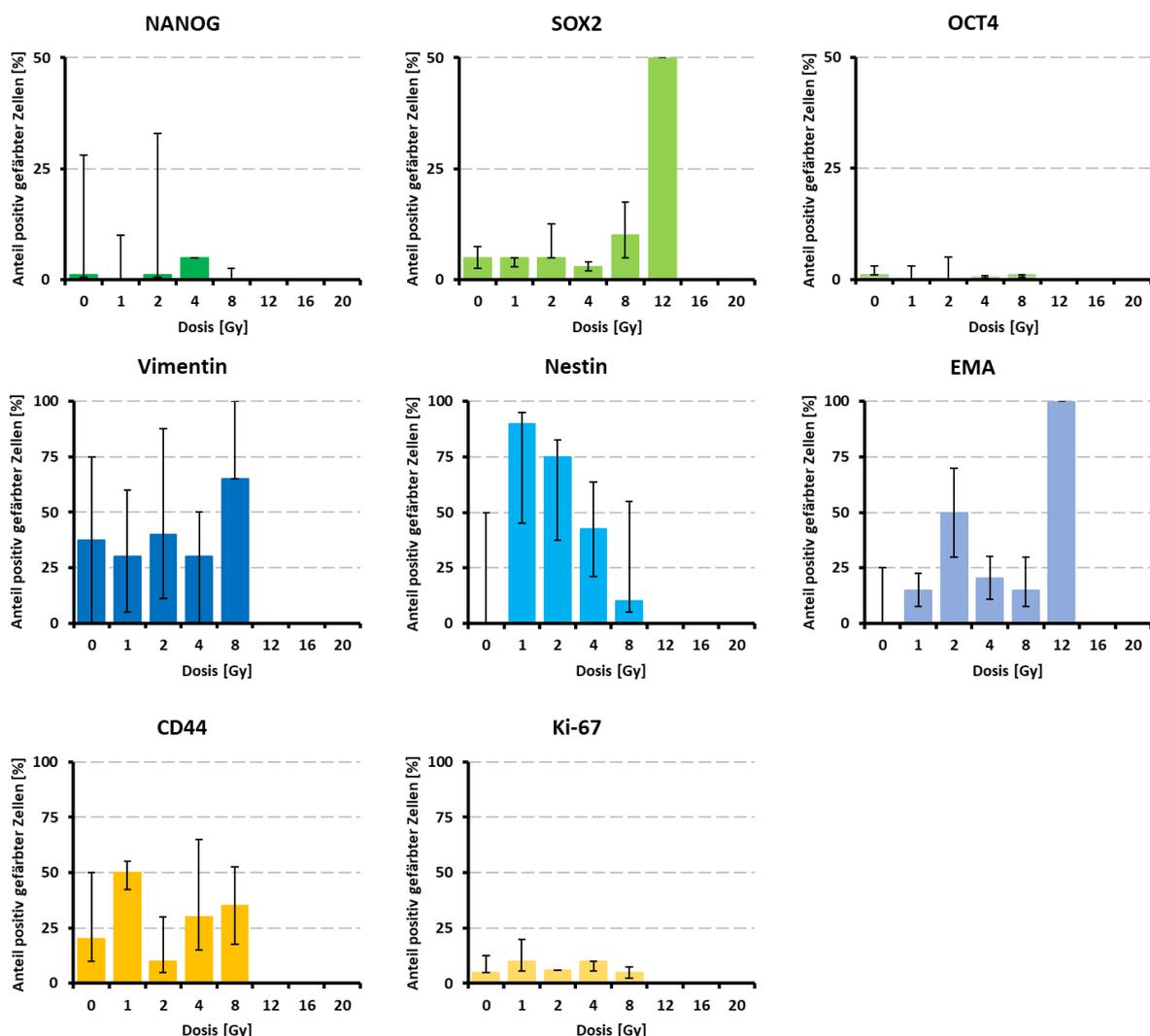
Die immunzytochemische Färbung ermöglichte die Darstellung der Proteinexpression bei Erreichen des jeweiligen Endpunktes. Hierbei wurden verschiedene Marker und Proteine mittels Antikörperbindung detektiert, die zum einen eine potentielle Pluripotenz, zum anderen aber auch den histopathologischen Status der Zielzellen demaskieren sollten. In den folgenden Kapiteln wurde die mittlere Proteinexpression als Median der positiv gefärbten Zellen mit samt der 25 %- und 75 %-Quartile als Fehlerindikator angegeben. Im Allgemeinen beziehen sich die p-Werte auf den Fisher-Test. Bei Verwendung des Mann-Whitney-U-Test wird darauf explizit verwiesen.

#### 7.2.1.1 PROTEINEXPRESSION IN DURA MATER

In den nicht-bestrahlten Kulturen der Dura mater zeigten 1,00 % (0,50 %; 28,00 %) der Zellen eine NANOG-Expression auf Proteinebene. Gleichzeitig wurden die NANOG-regulierenden Transkriptionsfaktoren SOX2 und OCT4 von 5,00 % (2,50 %; 7,50 %) bzw. 1,00 % (1,00 %; 3,00 %) der analysierten Zellen synthetisiert. Die Meningeommarker Vimentin, Nestin und EMA zeigten eine Ausprägung von 37,50 % (0,00 %; 75,00 %) für Vimentin, 0,00 % (0,00 %; 25,00 %) für EMA und 0,00 % (0,00 %; 50,00 %) für Nestin. Der Stammzellmarker CD44 wies eine mittlere Proteinexpression von 20,00 % (10,00 %; 50,00 %) auf. Der Proliferationsindex Ki-67 wurde von 5,00 % (5,00 %; 12,50 %) der Zellen synthetisiert (**Abb. 13**).

Die 1 Gy-Kulturen entwickelten bei Erreichen des Endpunktes eine statistisch irrelevante Abnahme der NANOG-Expression auf 0,00 % (0,00 %; 10,00 %; p = 1,000) in Relation zur Kontrollgruppe. Für SOX2 konnte mit 5,00 % (3,00 %, 5,00 %; p = 1,000) ebenfalls keine signifikante Veränderung detektiert werden. Leidglich für OCT4 war mit 0,00 % (0,00 %; 3,00 %; p = 0,200) eine relative Expressionsabnahme registrierbar. Auch die beiden Meningeommarker EMA und Vimentin zeigten mit 15,00 % (7,50 %; 22,50 %; p = 1,000) für EMA und 30,00 % (5,00 %; 60,00 %; p = 1,000) für Vimentin nur unwesentliche Veränderungen in ihrer Ausprägung. Nestin wurde mit 90,00 % (45,00 %; 95,00 %; p = 1,000) nur deskriptiv stärker exprimiert. Auch CD44 mit 50,00 % (42,50 %; 55,00 %; p = 0,700) zeigte einen nicht relevanten Anstieg in der Syntheserate. Allerdings zeigte Ki-67 mit 10,00 % (5,50 %; 20,00 %; p = 0,400) einen tendenziellen Anstieg der Expression.

Die mit 2 Gy bestrahlten Dura mater-Kulturen exprimierten dagegen in 1,00 % (0,50 %; 33,00 %) der Zellen den Pluripotenzmarker NANOG ohne statistisch relevante Relevanz ( $p = 1,000$ ). Im Falle der NANOG-Regulatoren waren 5,00 % (5,00 %; 12,50 %;  $p = 1,000$ ) der Zellen positiv für SOX2. Aber auch hier zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der OCT4-Expression mit 0,00 % (0,00 %; 5,00 %;  $p = 0,200$ ). Die Translation von EMA mit 50,00 % (30,00 %; 70,00 %;  $p = 0,600$ ) und Vimentin mit 40,00 % (11,25 %; 87,50 %;  $p = 1,000$ ) war postinterventionell eher deskriptiv gesteigert. Auch Nestin war in 75,00 % (37,50 %; 82,50 %;  $p = 1,000$ ) der Zellen ohne relevante Änderung zur Kontrollgruppe detektierbar. CD44 verzeichnete mit 10,00 % (5,00 %; 30,00 %;  $p = 0,800$ ) eine nicht signifikante Expressionsänderung, während für Ki-67 mit 6,00 % (6,00 %; 6,00 %;  $p = 0,500$ ) erneut eine tendenzielle Expressionssteigerung nachweisbar war.



**Abb. 13 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen der Dura mater**

Von besonderer Relevanz ist die Expressionssteigerung der Stammzell- und Differenzierungsmarker NANOG und CD44 sowie von Ki-67 nach 4 Gy im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch Nestin und EMA verzeichneten eine deskriptive Zunahme ihrer Expression bis 8 Gy bzw. 12 Gy. Sonst undulierten SOX2, OCT4, CD44 und Ki-67 bis 8 Gy um das Niveau der Kontrollgruppe. Markierung von Signifikanzen mittels † über dem entsprechenden Balken. (Chi-Quadrat-Test;  $p \leq 0,050$ )

Mit 4 Gy erfolgte eine Bestrahlung im Einflussbereich der ED<sub>50</sub>: Hier ließ sich mit 5,00 % (5,00 %; 5,00 %; p = 0,400) in Tendenz ein Anstieg der NANOG-Expression nachweisen. Für OCT4 wurde dagegen nur noch eine Expression von 0,50 % (0,25 %; 0,75 %; p = 1,000) registriert. Für SOX2 wurde mit 3,00 % (2,00 %; 4,00 %; p = 1,000) eine deskriptive Expressionsabnahme gemessen. Der eine Meningeommarker Nestin nahm mit 42,50 % (21,25 %; 63,75 %; p = 1,000) nicht relevant zu. Für EMA konnte dagegen eine tendenzielle Zunahme seiner Expression mit 20,50 % (10,75 %; 30,25 %; p = 0,400) festgestellt werden. Für Vimentin ließ sich mit 30,00 % (0,00 %; 50,00 %; p = 1,000) positiv angefärbter Zellen keine relevante Änderungs-verhalten bestimmen. Für CD44 konnte eine Zunahme auf 30,00 % (15,00 %; 65,00 %; p = 0,800) registriert werden. Auch nach einer Bestrahlung mit 4 Gy zeigten die Kulturen der Dura mater eine erneute tendenzielle Expressionszunahme des Proliferationsmarker Ki-67 mit 10,00 % (5,50 %; 10,00 %; p = 0,200).

Mit dem Überschreiten der ED<sub>50</sub> ließ sich nochmals eine deskriptive Veränderung in der Proteinexpression registrieren: Zwar waren nur 0,00 % (0,00 %; 2,50 %; p = 1,000) der Zellen positiv für NANOG und 1,00 % (0,50 %; 1,00 %; p = 1,000) positiv für OCT4. Allerdings exprimierten 10,00 % (5,00 %; 17,50 %; p = 1,000) der Zellen SOX2 und 65,00 % (65,00 %; 100,00 %; p = 1,000) der Zellen den Meningeommarker Vimentin. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ließ sich für die beiden anderen Tumormarker Nestin mit 10,00 % (5,00 %; 55,00 %; p = 1,000) und EMA mit 15,00 % (7,50 %; 30,00 %; p = 1,000) nur eine deskriptive Steigerung feststellen. Während die Expression von Ki-67 mit 5,00 % (2,50 %; 7,50 %; p = 0,400) tendenziell stabil blieb, nahm die Ausprägung des Stammzellmarkers CD44 deskriptiv auf 35,00 % (17,50 %; 52,50 %; p = 1,000) zu.

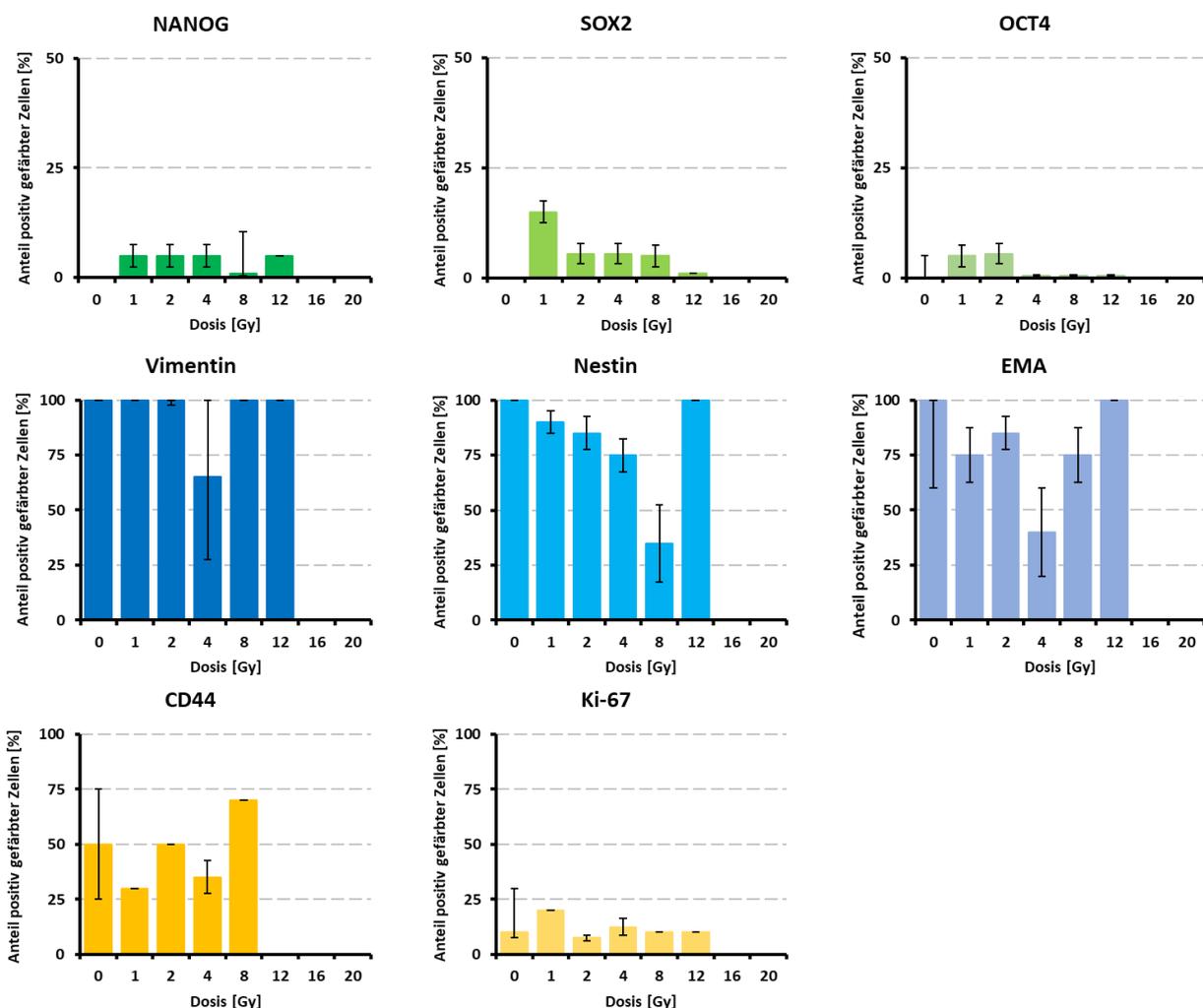
Mit Erreichen des Hochdosisbereichs ab 12 Gy zeigte sich auch in den Ergebnissen der immunzytochemischen Färbung der wachstumshemmende und zum Zelluntergang führende Effekt der ionisierenden Strahlung. So wuchsen bei Erreichen des Endpunktes in keiner der drei Hochdosis-kulturen genug Zellen auf den Objektträgern an, um eine adäquate Färbung mit belastbaren Resultaten durchzuführen. Nur bei den mit 12 Gy bestrahlten Kulturen ließen sich 100,00 % (100,00 %; 100,00 %; p = 0,500) der Zellen für EMA und 50,00 % (50,00 %; 50,00 %; p = 1,000) für SOX2 anfärben. Nestin mit 0,00 % (0,00 %; 0,00 %; p = 1,000) und OCT4 mit 0,00 % (0,00 %; 0,00 %; p = 0,500) waren dagegen nicht nachweisbar.

#### 7.2.1.2 PROTEINEXPRESSION IN MENINGEOMEN

Die Kontrollgruppe zeigte eine mittlere Ausprägung von 100,00 % (100,00 %; 100,00 %) für Nestin, 100,00 % (60,00 %; 100,00 %) für EMA und 100,00 % (100,00 %; 100,00 %) für Vimentin. Allerdings ließ sich keine Expression von NANOG oder SOX2 mit jeweils 0,00 % (0,00 %; 0,00 %) nachweisen. Für OCT4 zeigte sich eine Ausprägung von 0,00 % (0,00 %; 5,00 %). Der

Stammzellmarker CD44 und der Proliferationsmarker Ki-67 waren mit 50,00 % (25,00 %; 75,00 %) bzw. 10,00 % (7,50 %; 30,00 %) exprimiert (**Abb. 14**).

Ähnlich setzte sich das Bild auch in der Niedrigdosisgruppe fort: So ließen sich in den 1 Gy-Kulturen für EMA 100,00 % (60,00 %; 100,00 %;  $p = 1,000$ ) und für Nestin 90,00 % (85,00 %; 95,00 %;  $p = 0,400$ ) der Zellen anfärben. Für Vimentin zeigten weiterhin 100,00 % (100,00 %; 100,00 %) der Zellen eine Ausprägung. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs wurde hier im Fall von Vimentin auf den Mann-Whitney-U-Test zurückgegriffen. Dieser lieferte mit einem p-Wert von  $p = 1,000$  keinen relevanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Gleichzeitig stieg die Ausprägung von OCT4 auf 5,00 % (2,50 %; 7,50 %;  $p = 1,000$ ). Erstmals ließ sich SOX2 mit 15,00 % (12,50 %; 17,50 %;  $p = 0,100$ ) und auch NANOG selbst mit 5,00 % (2,50 %; 7,50 %;  $p = 0,400$ ) nachweisen. Für Ki-67 mit 20,00 % (20,00 %; 20,00 %;  $p = 1,000$ ) und CD44 mit



**Abb. 14 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen der Meningeome**

Nach Bestrahlung verzeichneten die Meningeome eine Expressionssteigerung der Stammzellmarker NANOG, SOX2 und CD44. Bis auf 4 Gy verblieben alle Dosisgruppen bis einschließlich 12 Gy auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Nestin und EMA zeigten dagegen nach Bestrahlung eher eine verminderte Ausprägung bis 8 Gy. CD44 und Ki-67 undulierten bis 8 Gy bzw. 12 Gy um das Maß der Kontrollgruppe. Markierung von Signifikanzen mittels ‡ über dem entsprechenden Balken. (Chi-Quadrat-Test;  $p \leq 0,050$ )

30,00 % (30,00 %; 30,00 %; p = 0,700) wurden dagegen keine statistisch relevanten Veränderungen in der Expression beobachtet.

Nach einer Bestrahlung mit 2 Gy konnte bei den Meningeomen weiterhin eine tendenziell verminderte Expression von Nestin mit 85,00 % (77,50 %; 92,50 %, p = 0,400) registriert werden. Gleichzeitig verzeichnete EMA mit 85,00 % (77,50 %; 92,50 %; p = 1,000) eine deskriptive Abnahme, während Vimentin mit 100,00 % (97,50 %; 100,00 %; p = 0,400) stabil blieb. Auch für NANOG mit 5,00 % (2,50 %; 7,50 %; p = 0,400) und OCT4 mit 5,50 % (3,25 %; 7,75 %; p = 0,600) nahm die Proteinsynthese im Vergleich zur Kontrollgruppe eher zu. Auch SOX2 zeigte einen tendenziellen Anstieg der Expression: Immerhin 5,50 % (3,25 %; 7,75 %; p = 0,100) der Zellen synthetisierten den Transkriptionsfaktor. Für Ki-67 wurde ein nicht signifikanter Rückgang der Expression auf 7,50 % (6,25 %; 8,75 %; p = 1,000) verzeichnet. CD44 zeigte mit 50,00 % (50,00 %; 50,00 %; p = 1,000) eine stabile Expression.

Auch in den mit 4 Gy bestrahlten Kulturen zeigten sich strahleninduzierte Alterationen auf Proteinebene: Die Ausprägung von Nestin mit 75,00 % (67,50 %; 82,50 %; p = 0,100), EMA 40,00 % (20,00 %; 60,00 %; p = 0,400) und Vimentin 65,00 % (27,50 %; 100,00 %; p = 0,100) fiel im Vergleich zur Kontrollgruppe in Tendenz ab. Gleichzeitig nahm die Expression von NANOG mit 5,00 % (2,50 %; 7,50 %; p = 0,400) und SOX2 mit 5,50 % (3,25 %; 7,75 %; p = 0,100) tendenziell zu. Für OCT4 mit 0,50 % (0,25 %; 0,75 %; p = 1,000) konnte keine relevante Veränderung in der Expression beobachtet werden. CD44 wurde mit 35,00 % (27,50 %; 42,50 %; p = 1,000) nur deskriptiv vermindert exprimiert.

Ähnlich wie in den 4 Gy-Kulturen führte eine Radiatio mit 8 Gy in den Meningeomzellen zu einer tendenziell gesteigerten Synthese der Stammzellmarker NANOG mit 1,00 % (0,5 %; 10,50 %; p = 0,400) und SOX2 mit 5,00 % (2,50 %; 7,50 %; p = 0,400). Auch OCT4 mit 0,50 % (0,25 %; 0,75 %; p = 1,000) nahm zumindest deskriptiv in der Expression zu. Für EMA mit 75,00 % (62,50 %; 87,50 %; p = 1,000) und Nestin mit 35,00 % (17,50 %; 52,50 %; p = 0,100) wurde dagegen eine Abnahme verzeichnet. Vimentin blieb in seiner Ausprägung mit 100 % (100,00 %; 100,00 %) stabil. Auch hier musste auf den Mann-Whitney-U-Test zurückgegriffen für einen p-Wert von p = 1,000. Auch Ki-67 blieb mit 10,00 % (10,00 %; 10,00 %; p = 1,000). CD44 zeigte mit 70,00 % (70,00 %; 70,00 %; p = 1,000) eine Zunahme ohne Signifikanz.

Grundsätzlich setzte sich dieses Muster nach der Bestrahlung mit 12 Gy fort: Die Bestrahlung führte zu einer relativen Steigerung der Stammzellmarker NANOG mit 5,00 % (5,00 %; 5,00 %; p = 0,250) und SOX2 mit 1,00 % (1,00 %; 1,00 %, p = 0,250). Die anderen Targets CD44 (p = 1,000), OCT4 (p = 1,000), Ki-67 (p = 1,000), Nestin (p = 1,000), EMA (p = 1,000) und Vimentin (p = 1,000) wurden statistisch nicht beeinflusst. Aufgrund des Stichprobenumfangs wurde für Nestin und Vimentin auf den Mann-Whitney-U-Test zurückgegriffen.

Ab einer Strahlendosis von 16 Gy ließen sich an den Meningeomzellen keine spezifische Zellfärbung mehr nachweisen.

## 7.2.2 STRAHLENINDUZIERTER mRNA-EXPRESSIONEN

Problematisch bei der Untersuchung der Proteinsynthese mittels Immunfluoreszenzfärbung war, dass eine sichere Unterscheidung zwischen NANOG1 und NANOGP8 kaum möglich war. Diese Differenzierung war zum Zeitpunkt der Versuche nur anhand der Genexpressionen von *NANOG1* und *NANOGP8* sicher möglich. Hinzu kam, dass der Versuchsaufbau durch die qPCR-Analyse der mRNA-Konzentration bei jeder Passagierung eine bessere Übersichtlichkeit des zeitlichen Verlaufs erlaubte als die Immunfluoreszenzfärbung allein bei Erreichen des Endpunkts.

Auch hier erfolgte die statistische Analyse einerseits über die Expressionsraten der einzelnen Interventionsgruppen über den zeitlichen Verlauf, andererseits anhand der für eine gesamte Dosisgruppe über alle Passagen gemittelten Expressionsrate und deren Ratios. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf den stammzelltypischen Genen *NANOG1* und *CD44* sowie auf den Tumorzellmarker *NANOGP8*.

### 7.2.2.1 GENEXPRESSION IN DEN ZELLKULTUREN DER DURA MATER

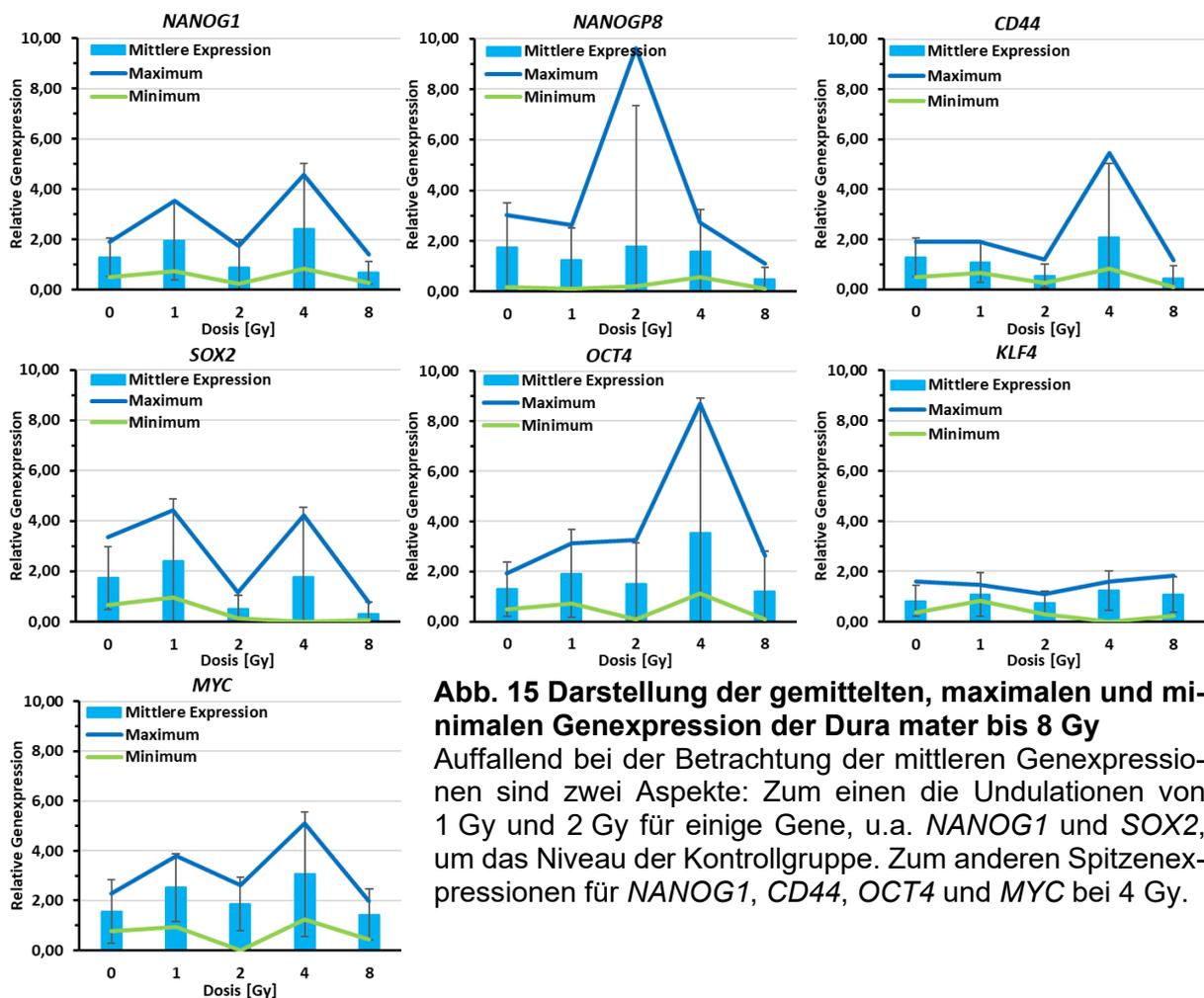
Die Kontrollgruppe zeigte für *NANOG1* eine mittlere Expressionsrate von  $R_{MW}^{NANOG1} = 1,29$  (SD  $\pm 0,77$ ) und  $R_{MW}^{CD44} = 1,28$  (SD  $\pm 0,77$ ) für *CD44*. Die *NANOG*-regulierenden Gene *SOX2* und *OCT4* zeigten eine mittlere Expressionsrate von  $R_{MW}^{SOX2} = 1,73$  (SD  $\pm 1,24$ ) und  $R_{MW}^{OCT4} = 1,29$  (SD  $\pm 1,08$ ). Für das Pseudogen *NANOGP8* ergab sich eine mittlere Expressionsrate von  $R_{MW}^{NANOGP8} = 1,76$  (SD  $\pm 1,76$ ). Die Expression für *KLF4* lag im Mittel bei  $R_{MW}^{KLF4} = 0,83$  (SD  $\pm 0,61$ ) und für *MYC* bei  $R_{MW}^{MYC} = 1,56$  (SD  $\pm 1,27$ ) (**Abb. 15**).

In den Kulturen der Dura mater, welche mit 1 Gy bestrahlt wurden, betrug die mittlere Expressionsrate für *NANOG1*  $R_{MW}^{NANOG1} = 1,95$  (SD  $\pm 1,56$ ) und lag so tendenziell über der Kontrollgruppe ( $p = 0,102$ ) (**Abb. 17**). Das Oberflächenprotein *CD44* wurde in dieser Interventionsgruppe mit  $R_{MW}^{CD44} = 1,09$  (SD  $\pm 0,81$ ) deskriptiv schwächer exprimiert als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,524$ ). Die mittlere Expressionsrate von *NANOGP8* fiel mit  $R_{MW}^{NANOGP8} = 1,26$  (SD  $\pm 1,26$ ) relativ niedriger als in der Kontrollgruppe aus ( $p = 0,456$ ). Für die *NANOG*-Regulatoren *SOX2* und *OCT4* konnten mittlere Expressionsraten von  $R_{MW}^{SOX2} = 2,42$  (SD  $\pm 2,46$ ;  $p = 0,211$ ) und  $R_{MW}^{OCT4} = 1,92$  (SD  $\pm 1,76$ ;  $p = 0,402$ ) berechnet werden, die beide tendenziell über der jeweiligen mittleren Expression der Kontrollgruppe liegen. Auch die gemittelte *KLF4*-Expression fiel mit  $R_{MW}^{KLF4} = 1,08$  (SD  $\pm 0,88$ ) relativ höher aus als in den nicht bestrahlten Kulturen ( $p = 0,213$ ). Für *MYC* ließ sich mit einer mittleren Expression von  $R_{MW}^{MYC} = 2,52$  (SD  $\pm 1,36$ ) sogar eine signifikante Steigerung nachweisen ( $p = 0,011$ ).

In der 2 Gy-Interventionsgruppe zeichnete sich ein teilweise konträres Bild ab: Hier betrug die mittlere *NANOG1*-Expression lediglich  $R_{MW}^{NANOG1} = 0,88$  (SD  $\pm 1,10$ ) und ist somit tendenziell

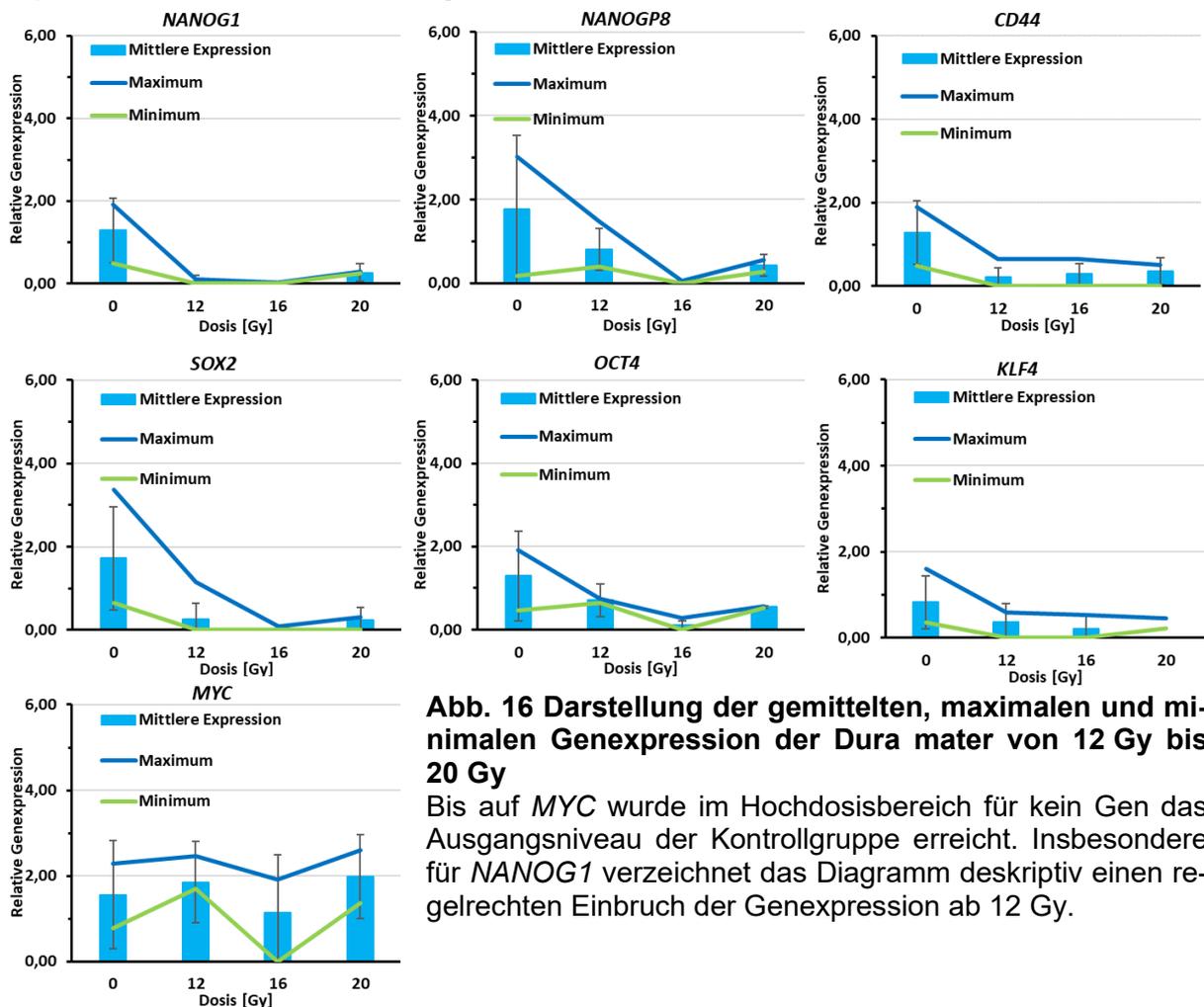
schwächer als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,307$ ). In Relation zur 1 Gy-Interventionsgruppe fiel die *NANOG1*-Expression sogar signifikant niedriger aus ( $p = 0,011$ ). Der andere Stammzellmarker *CD44* zeigte ein ähnliches Expressionsmuster: Hier fiel die mittlere Expressionsrate mit  $R_{MW}^{CD44} = 0,55$  (SD  $\pm 0,47$ ) signifikant niedriger aus als bei der Kontrollgruppe ( $p = 0,044$ ) und tendenziell niedriger als bei den 1 Gy-Kulturen ( $p = 0,167$ ). Für *NANOGP8* dagegen überstieg die mittlere Expression mit  $R_{MW}^{NANOGP8} = 1,80$  (SD  $\pm 5,56$ ) sowohl die Kontroll- ( $p = 0,964$ ) als auch relativ die 1 Gy-Interventionsgruppe ( $p = 0,447$ ). Auch für *SOX2* und *OCT4* fielen die gemittelten Expressionen mit  $R_{MW}^{SOX2} = 0,51$  (SD  $\pm 0,55$ ;  $p < 0,001$ ) und  $R_{MW}^{OCT4} = 1,52$  (SD  $\pm 1,64$ ;  $p = 0,576$ ) niedriger aus als bei den 1 Gy-Kulturen. Auch in Relation zur Kontrollgruppe war die Expression von *SOX2* ( $p = 0,008$ ) und *OCT4* ( $p = 0,802$ ) erniedrigt. Für *KLF4* mit  $R_{MW}^{KLF4} = 0,76$  (SD  $\pm 0,45$ ;  $p = 0,624$ ) und *MYC* mit  $R_{MW}^{MYC} = 1,87$  (SD  $\pm 1,06$ ;  $p = 0,556$ ) ließen sich keine relevanten Alterationen in der Genexpression registrieren.

Mit den 4 Gy-Kulturen wurde nun der kritische Bereich der  $ED_{50}$  der Dura mater erreicht: Tatsächlich war in diesen Zellkulturen die Expression von *NANOG1* und *CD44* mit  $R_{MW}^{NANOG1} = 2,43$  (SD  $\pm 2,59$ ;  $p = 0,008$ ) und  $R_{MW}^{CD44} = 2,07$  (SD  $\pm 2,98$ ;  $p = 0,005$ ) nicht nur deskriptiv im Mittel unter allen Dura mater-Kulturen am höchsten, sondern auch signifikant erhöht zur Kontrollgruppe (**Abb. 18**). Gleichzeitig lag  $R_{MW}^{NANOGP8} = 1,57$  (SD  $\pm 1,68$ ) unter dem



Niveau der 0 Gy-Kulturen ( $p = 0,982$ ). Die *NANOG*-regulierenden Transkriptionsfaktoren *SOX2* und *OCT4* zeigten ein ähnliches Muster: Mit  $R_{MW}^{SOX2} = 1,76$  (SD  $\pm 2,79$ ) übertrafen die 4 Gy-Kulturen knapp das Niveau der Kontrollgruppe ( $p = 0,539$ ) oder überstiegen mit  $R_{MW}^{OCT4} = 3,53$  (SD  $\pm 5,39$ ) die Kontrollgruppe signifikant ( $p = 0,004$ ). Dieses Verhalten setzte sich bei *KLF4* und *MYC* weiter: Hier zeigte die 4 Gy-Gruppe mit  $R_{MW}^{KLF4} = 1,24$  (SD  $\pm 0,80$ ;  $p = 0,054$ ) und  $R_{MW}^{MYC} = 3,06$  (SD  $\pm 2,50$ ;  $p < 0,001$ ) in Tendenz bzw. sogar signifikant eine gesteigerte Expression. Zusätzlich lagen auch hier deskriptiv die höchsten mittleren Expressionsraten von allen Kulturen der Dura mater vor.

Mit einer Bestrahlung von 8 Gy und dem Überschreiten der für die Dura mater-Zellen berechneten  $ED_{50}$  von 6,95 Gy wandelte sich auch das Muster der exprimierten Gene: Die mittleren Expressionsraten für *NANOG1* und *CD44* betrug nur noch  $R_{MW}^{NANOG1} = 0,68$  (SD  $\pm 0,46$ ;  $p = 0,164$ ) und  $R_{MW}^{CD44} = 0,45$  (SD  $\pm 0,50$ ;  $p = 0,089$ ) und lagen so relativ unter dem Niveau der Kontrollgruppe. Auch für *NANOGP8* ließ sich mit  $R_{MW}^{NANOGP8} = 1,57$  (SD  $\pm 1,68$ ;  $p = 0,167$ ) ein tendenzieller Expressionsabfall beobachten. Dieses Verhaltensmuster setzte sich bei *SOX2* und *OCT4* weiter fort: Die mittleren Expressionsraten verringerten sich auf  $R_{MW}^{SOX2} = 0,31$  (SD  $\pm 0,45$ ;  $p = 0,006$ ) und  $R_{MW}^{OCT4} = 1,21$  (SD  $\pm 1,59$ ;  $p = 0,836$ ). Die Expression von *KLF4* und *MYC* zeigten einen konträren Verlauf: *KLF4* nahm mit  $R_{MW}^{KLF4} = 1,07$



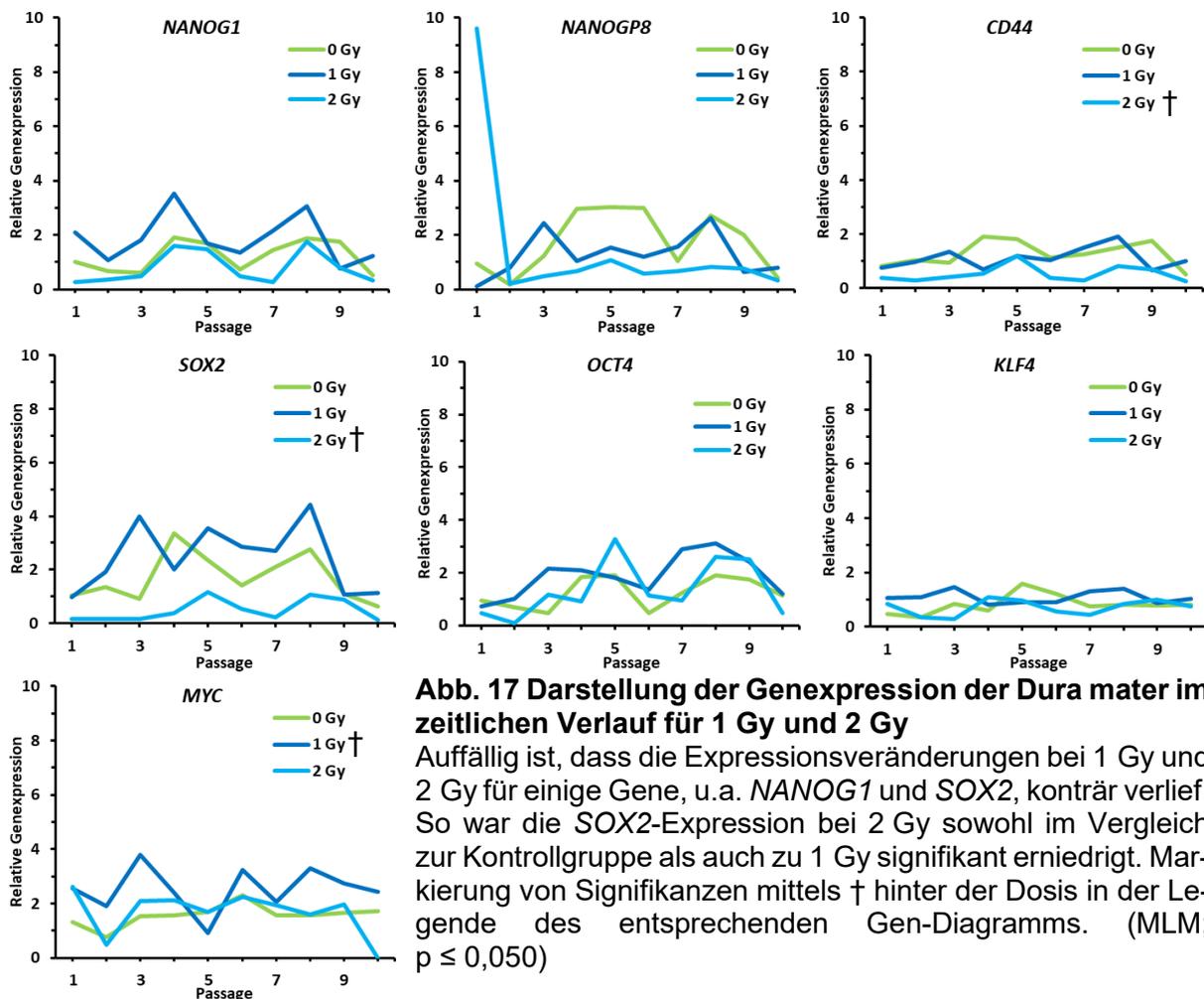
**Abb. 16 Darstellung der gemittelten, maximalen und minimalen Genexpression der Dura mater von 12 Gy bis 20 Gy**

Bis auf *MYC* wurde im Hochdosisbereich für kein Gen das Ausgangsniveau der Kontrollgruppe erreicht. Insbesondere für *NANOG1* verzeichnet das Diagramm deskriptiv einen regelrechten Einbruch der Genexpression ab 12 Gy.

(SD  $\pm$  0,70;  $p = 0,361$ ) eher zu, während *MYC* mit  $R_{MW}^{MYC} = 1,44$  (SD  $\pm$  1,02;  $p = 0,918$ ) eher abnahm.

Auch bei der Genexpression auf mRNA-Ebene markierte die Bestrahlung mit 12 Gy den Übergang in den Hochdosisbereich. Dies äußerte sich auch im weiteren Rückgang einzelner Gene. So ließ sich für die beiden Stammzellmarker *NANOG1* ( $R_{MW}^{NANOG1} = 0,07$ ; SD  $\pm$  0,14;  $p = 0,089$ ) und *CD44* ( $R_{MW}^{CD44} = 0,21$ ; SD  $\pm$  0,23;  $p = 0,135$ ) ein tendenzieller Rückgang der Expression beobachten (**Abb. 16**). Auch für *NANOGP8* zeichnete sich mit  $R_{MW}^{NANOGP8} = 0,80$  (SD  $\pm$  0,51;  $p = 0,440$ ) eine regrediente Expression ab. Ähnlich verhielten sich die *NANOG*-Regulatoren *SOX2* und *OCT4*: Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab sich mit  $R_{MW}^{SOX2} = 0,27$  (SD  $\pm$  0,38;  $p = 0,081$ ) und  $R_{MW}^{OCT4} = 0,71$  (SD  $\pm$  0,39;  $p = 0,635$ ) leichte Abnahme der Expression. Dieses Bild setzte sich auch hinsichtlich der *KLF4*-Expression fort: Die mittlere Expression betrug lediglich  $R_{MW}^{KLF4} = 0,36$  (SD  $\pm$  0,44) und lag so auch tendenziell unter der *KLF4*-Expression der Kontrollgruppe ( $p = 0,153$ ). Andererseits führte eine Bestrahlung mit 12 Gy sogar zu einer relativ verstärkten Expression von *MYC* ( $R_{MW}^{MYC} = 1,85$ ; SD  $\pm$  0,95;  $p = 0,459$ ) (**Abb. 19**).

Nach einer Bestrahlung mit 16 Gy zeigten die Stammzellmarker *NANOG1* und *CD44* nur noch mittlere Expressionsraten von  $R_{MW}^{NANOG1} = 0,01$  (SD  $\pm$  0,03;  $p = 0,070$ ) und  $R_{MW}^{CD44} = 0,29$

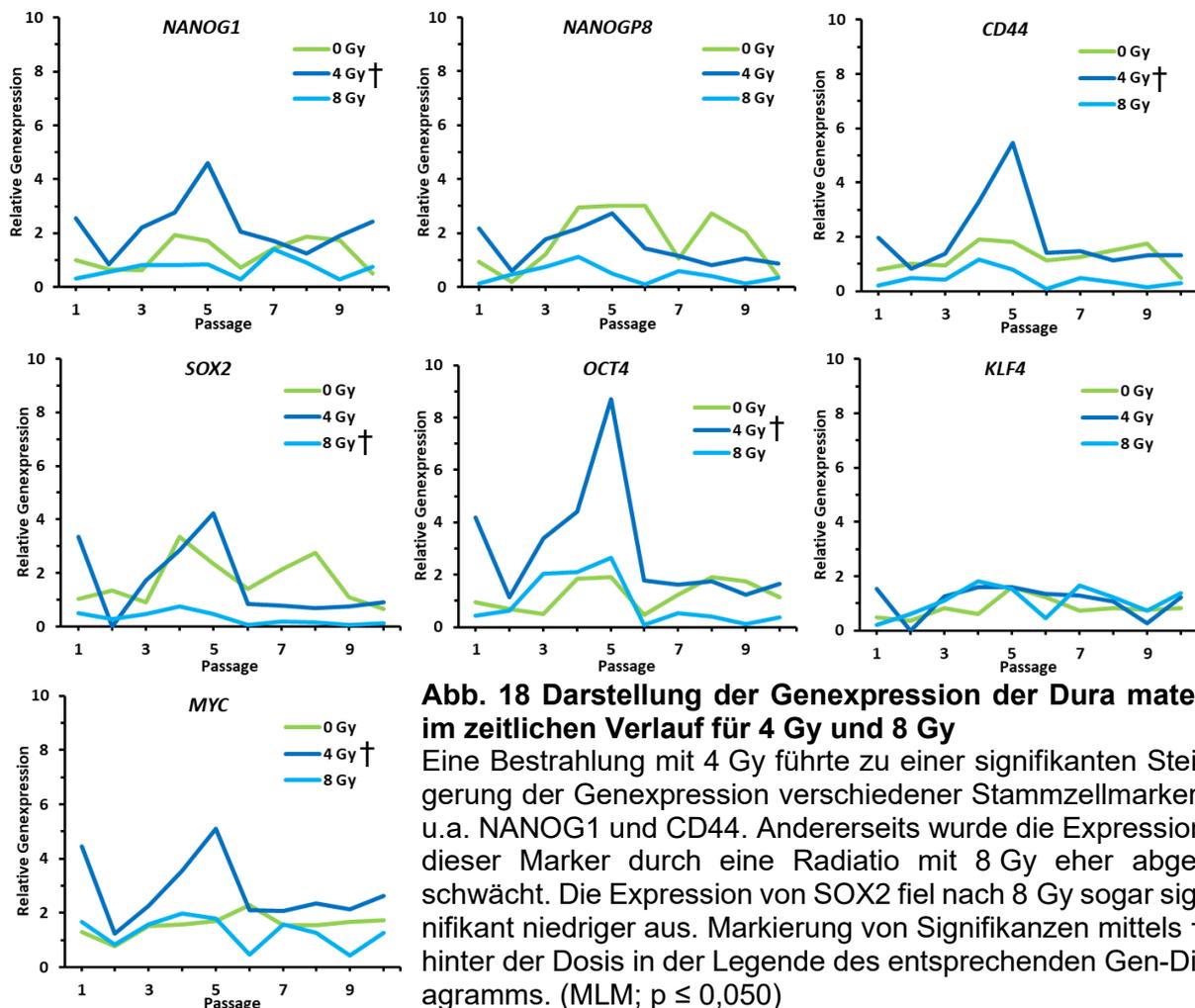


**Abb. 17 Darstellung der Genexpression der Dura mater im zeitlichen Verlauf für 1 Gy und 2 Gy**

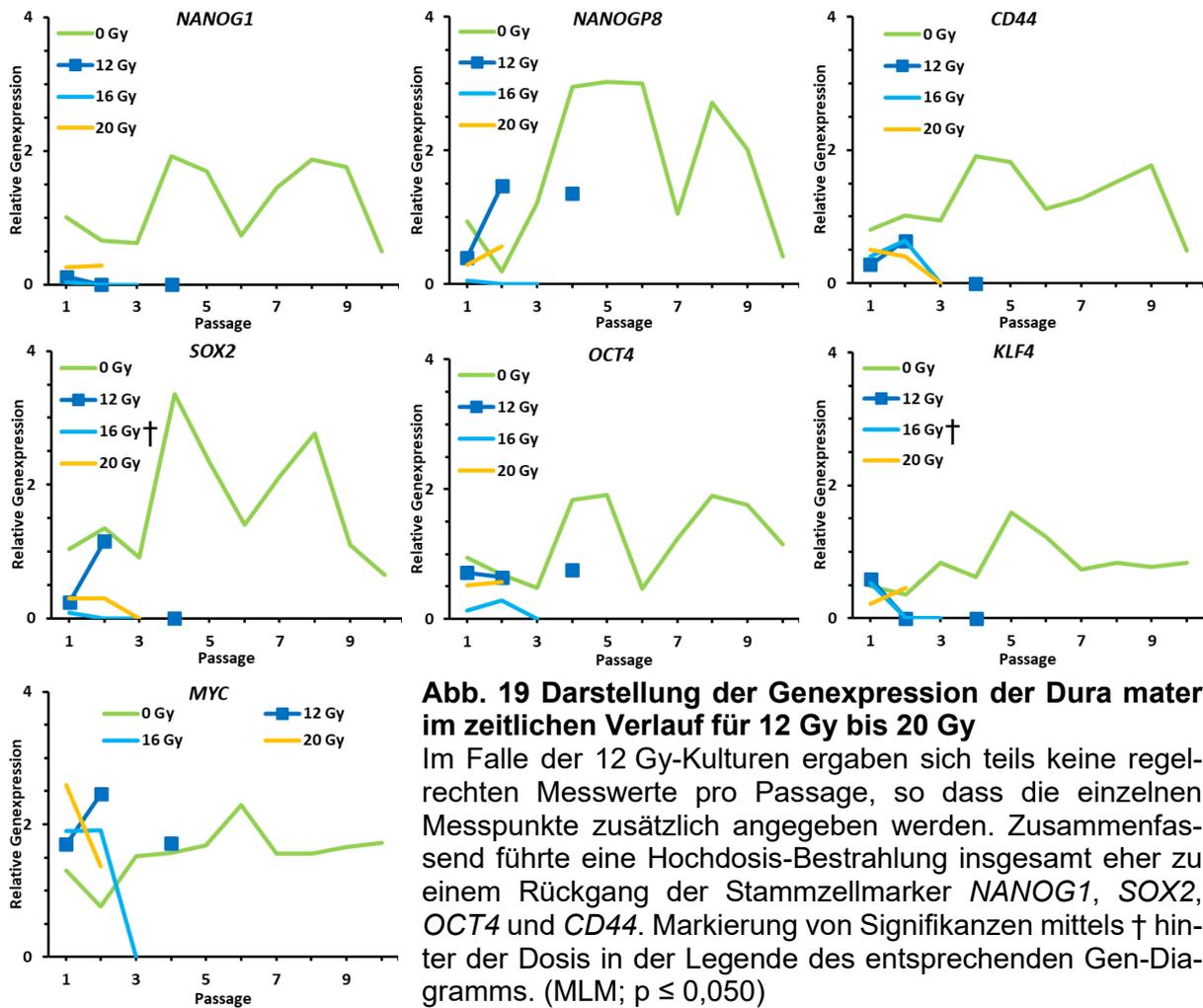
Auffällig ist, dass die Expressionsveränderungen bei 1 Gy und 2 Gy für einige Gene, u.a. *NANOG1* und *SOX2*, konträr verlief. So war die *SOX2*-Expression bei 2 Gy sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch zu 1 Gy signifikant erniedrigt. Markierung von Signifikanzen mittels † hinter der Dosis in der Legende des entsprechenden Gen-Diagramms. (MLM;  $p \leq 0,050$ )

(SD  $\pm$  0,25;  $p = 0,085$ ). Auch *SOX2* ( $R_{MW}^{SOX2} = 0,04$ ; SD  $\pm$  0,07;  $p = 0,020$ ) und *OCT4* ( $R_{MW}^{OCT4} = 0,11$ ; SD  $\pm$  0,11;  $p = 0,320$ ) nahmen in ihrer Ausprägung – im Fall von *SOX2* signifikant – weiter ab. Auch *NANOGP8* wurde mit  $R_{MW}^{NANOGP8} = 0,02$  (SD  $\pm$  0,04;  $p = 0,172$ ) tendenziell schwächer exprimiert. Während die Expression von *MYC* durch 16 Gy nicht wesentlich beeinflusst wurde ( $R_{MW}^{MYC} = 1,14$ ; SD  $\pm$  1,34;  $p = 0,629$ ), ließ sich für *KLF4* sogar eine signifikante Abnahme beobachten ( $R_{MW}^{KLF4} = 1,21$ ; SD  $\pm$  0,30;  $p = 0,047$ ).

In ihrem Expressionsmuster verhielten sich die mit 20 Gy behandelten Dura mater-Kulturen ähnlich zu den 16 Gy-Kulturen: Die Stammzellmarker *NANOG1* ( $R_{MW}^{NANOG1} = 0,27$ ; SD  $\pm$  0,20;  $p = 0,189$ ) und *CD44* ( $R_{MW}^{CD44} = 0,36$ ; SD  $\pm$  0,32;  $p = 0,200$ ) nahmen in ihrer Expression genauso tendenziell ab wie der *NANOG*-Regulator *SOX2* ( $R_{MW}^{SOX2} = 0,24$ ; SD  $\pm$  0,30;  $p = 0,080$ ). Auch *NANOGP8* ( $R_{MW}^{NANOGP8} = 0,02$ ; SD  $\pm$  0,04;  $p = 0,336$ ) und *KLF4* ( $R_{MW}^{KLF4} = 0,21$ ; SD  $\pm$  0,30;  $p = 0,154$ ) nahmen in ihrer Expression tendenziell ab. *OCT4* ( $R_{MW}^{OCT4} = 0,11$ ; SD  $\pm$  0,11;  $p = 0,568$ ) und *MYC* ( $R_{MW}^{MYC} = 1,98$ ; SD  $\pm$  0,99;  $p = 0,510$ ) wurden durch 20 Gy in keinem relevanten Ausmaß beeinflusst.



**Abb. 18 Darstellung der Genexpression der Dura mater im zeitlichen Verlauf für 4 Gy und 8 Gy**  
 Eine Bestrahlung mit 4 Gy führte zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression verschiedener Stammzellmarker, u.a. *NANOG1* und *CD44*. Andererseits wurde die Expression dieser Marker durch eine Radiatio mit 8 Gy eher abgeschwächt. Die Expression von *SOX2* fiel nach 8 Gy sogar signifikant niedriger aus. Markierung von Signifikanzen mittels † hinter der Dosis in der Legende des entsprechenden Gen-Diagramms. (MLM;  $p \leq 0,050$ )



**Abb. 19 Darstellung der Genexpression der Dura mater im zeitlichen Verlauf für 12 Gy bis 20 Gy**  
 Im Falle der 12 Gy-Kulturen ergaben sich teils keine regelrechten Messwerte pro Passage, so dass die einzelnen Messpunkte zusätzlich angegeben werden. Zusammenfassend führte eine Hochdosis-Bestrahlung insgesamt eher zu einem Rückgang der Stammzellmarker *NANOG1*, *SOX2*, *OCT4* und *CD44*. Markierung von Signifikanzen mittels † hinter der Dosis in der Legende des entsprechenden Gen-Diagramms. (MLM;  $p \leq 0,050$ )

**7.2.2.2 GENEXPRESSION IN DEN ZELLKULTUREN DER MENINGEOME**

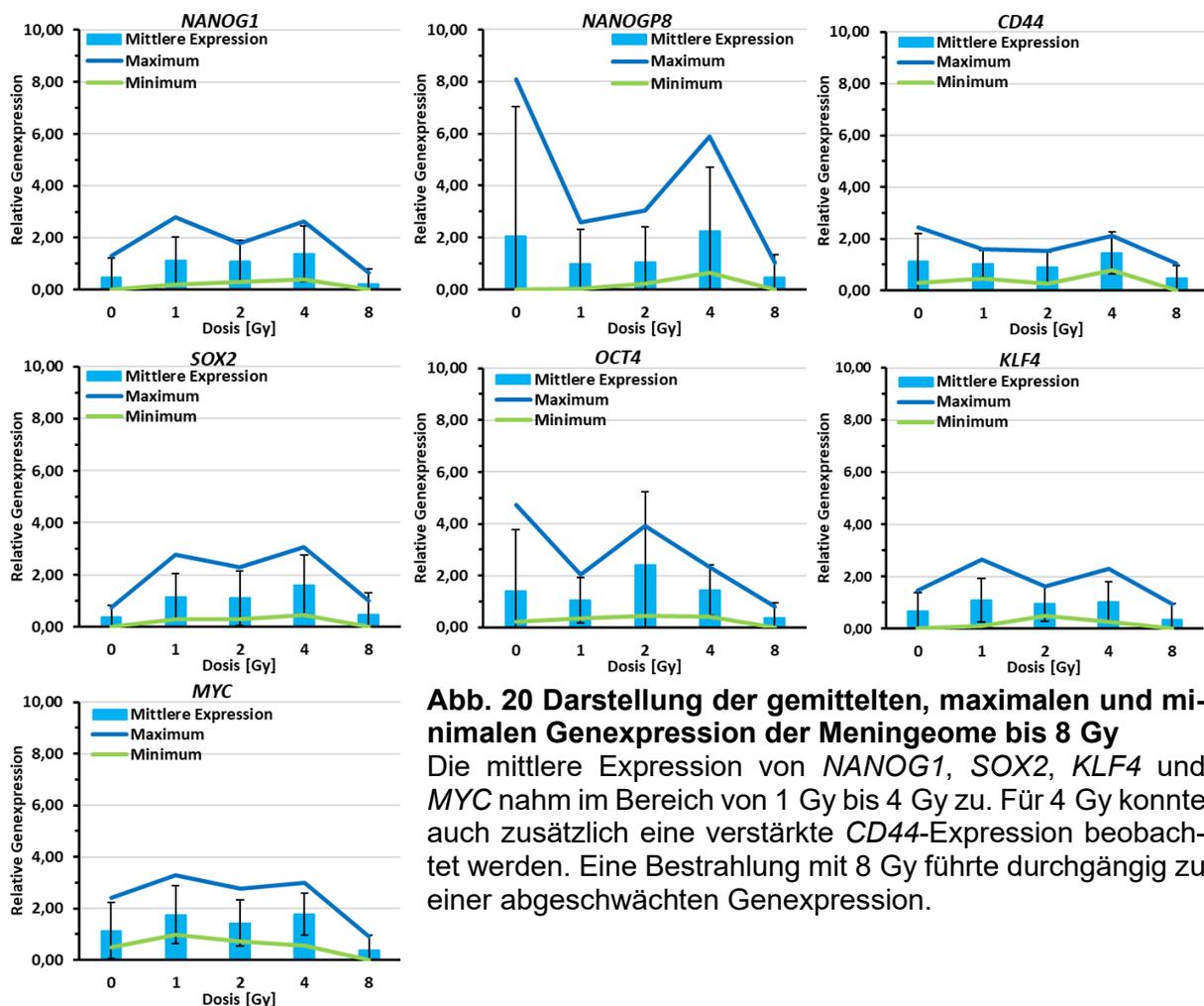
Die Kontrollgruppe der Meningeome zeigte für die Stammzellmarker *NANOG1* und *CD44* eine mittlere Expression von  $R_{MW}^{NANOG1} = 0,49$  (SD  $\pm 0,74$ ) und  $R_{MW}^{CD44} = 1,12$  (SD  $\pm 1,09$ ). Die mittlere *SOX2*-Expression fiel mit  $R_{MW}^{SOX2} = 0,38$  (SD  $\pm 0,44$ ) ebenfalls niedriger als bei der Dura mater. Für *OCT4* lag die mittlere Expression bei  $R_{MW}^{OCT4} = 1,40$  (SD  $\pm 2,39$ ). *NANOGP8* zeigte dabei eine mittlere Expression von  $R_{MW}^{NANOGP8} = 2,05$  (SD  $\pm 4,98$ ). Für *CMYC* und *KLF4* betragen die mittleren Expressionsraten  $R_{MW}^{CMYC} = 1,13$  (SD  $\pm 1,09$ ) und  $R_{MW}^{KLF4} = 0,67$  (SD  $\pm 0,72$ ) (**Abb. 20**).

Eine Bestrahlung mit 1 Gy führte in den Meningeomzellen zu einer signifikanten Zunahme der *NANOG1*-Expression ( $R_{MW}^{NANOG} = 1,11$ ; SD  $\pm 0,94$ ;  $p = 0,047$ ). Der Stammzellmarker *CD44* wurde mit  $R_{MW}^{CD44} = 1,04$  (SD  $\pm 0,53$ ;  $p = 0,656$ ) dagegen nicht relevant beeinflusst. Auch die Transkriptionsfaktoren *SOX2* und *OCT4* zeigten ein Stück weit ein konträres Verhalten: Während die *SOX2*-Expression  $R_{MW}^{SOX2} = 1,15$  (SD  $\pm 0,89$ ;  $p = 0,015$ ) signifikant über dem Niveau der Vergleichsgruppe lag, fiel die *OCT4*-Expression mit  $R_{MW}^{OCT4} = 1,05$  (SD  $\pm 0,88$ ;  $p = 0,707$ ) nur deskriptiv ab. Die *NANOGP8*-Expression fiel mit  $R_{MW}^{NANOGP8} = 0,99$  (SD  $\pm 1,32$ ;

$p = 0,284$ ) dagegen auch niedriger aus als in der Kontrollgruppe. Für *MYC* und *KLF4* zeichnete sich ein klareres Bild ab: Hier nahmen die mittleren Expressionsraten mit  $R_{MW}^{MYC} = 1,75$  ( $SD \pm 1,12$ ;  $p = 0,089$ ) und  $R_{MW}^{KLF4} = 1,09$  ( $SD \pm 0,83$ ;  $p = 0,066$ ) mit deutlicher Tendenz zu (**Abb. 22**).

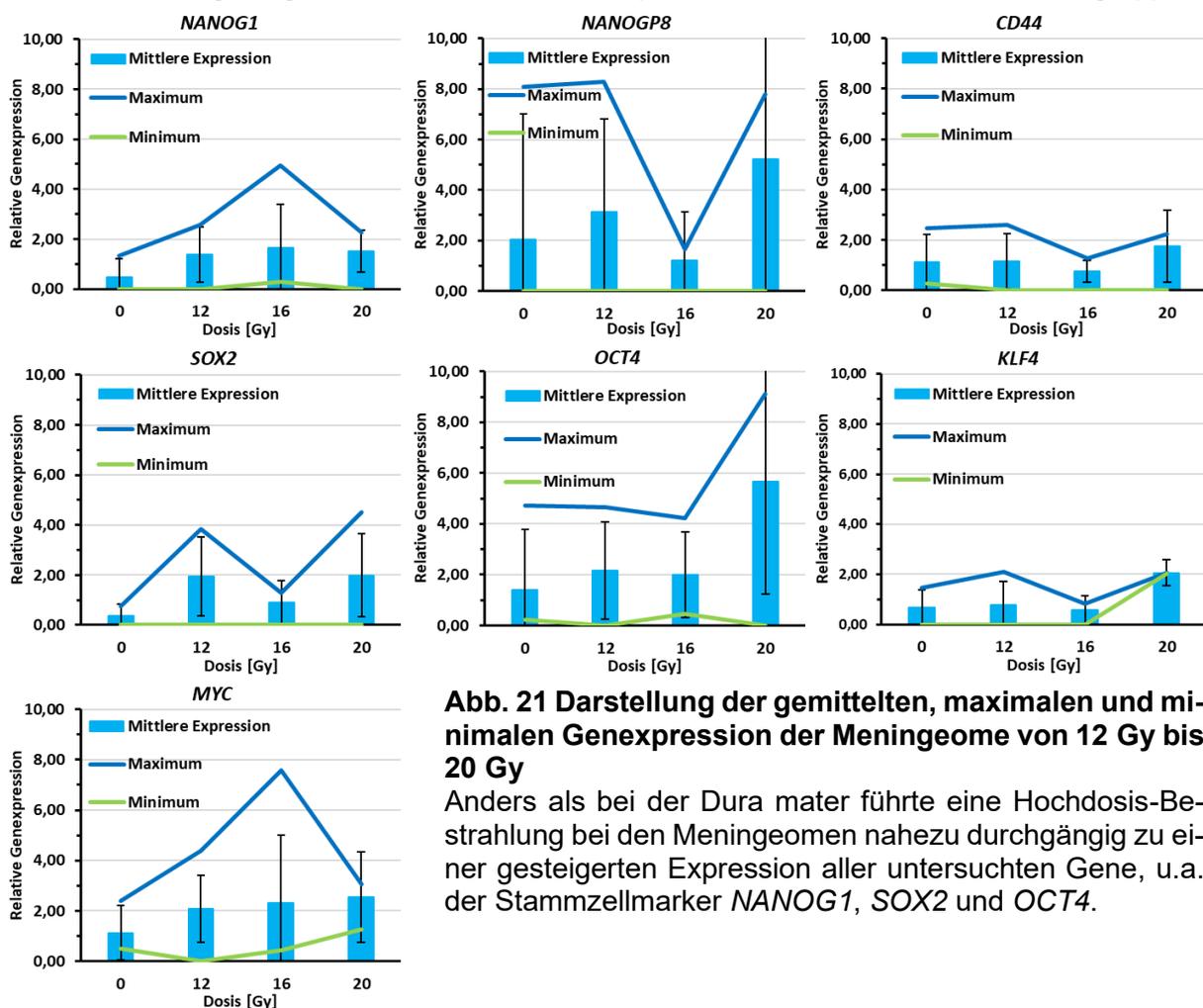
Bei den mit 2 Gy bestrahlten Meningeom-Kulturen nahm die Expression von *NANOG1* mit  $R_{MW}^{NANOG1} = 1,09$  ( $SD \pm 0,81$ ;  $p = 0,045$ ) ebenfalls signifikant zu. Die Expression des anderen Stammzellmarkers *CD44* nahm sogar tendenziell ab mit  $R_{MW}^{CD44} = 0,89$  ( $SD \pm 0,58$ ;  $p = 0,377$ ). Auch für *SOX2* ließ sich mit  $R_{MW}^{SOX2} = 1,10$  ( $SD \pm 1,05$ ;  $p = 0,022$ ) erneut eine signifikante Expressionszunahme beobachten. Anders als bei den 1 Gy-Kulturen konnte nun auch für den anderen *NANOG*-Regulator *OCT4* mit  $R_{MW}^{OCT4} = 2,41$  ( $SD \pm 2,84$ ;  $p = 0,078$ ) tendenziell eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktor registriert werden. Im Fall von *NANOGP8* ( $R_{MW}^{NANOGP8} = 1,04$ ;  $SD \pm 1,37$ ;  $p = 0,337$ ) wurde eine tendenzielle Expressionsabnahme detektiert. Das bei *NANOG1* und *SOX2* beobachtete Muster setzte sich auch bei *MYC* und *KLF4* fort: Für beide konnte nach der Bestrahlung eine verstärkte Genexpression mit  $R_{MW}^{MYC} = 1,43$  ( $SD \pm 0,89$ ;  $p = 0,445$ ) und  $R_{MW}^{KLF4} = 0,98$  ( $SD \pm 0,68$ ;  $p = 0,159$ ) registriert werden.

Mit einer Strahlendosis von 4 Gy näherte man sich auch bei den Meningeomzellen dem kritischen Dosisbereich der  $ED_{50}$ : Auch hier kam es zu einer signifikanten Zunahme der *NANOG1*-



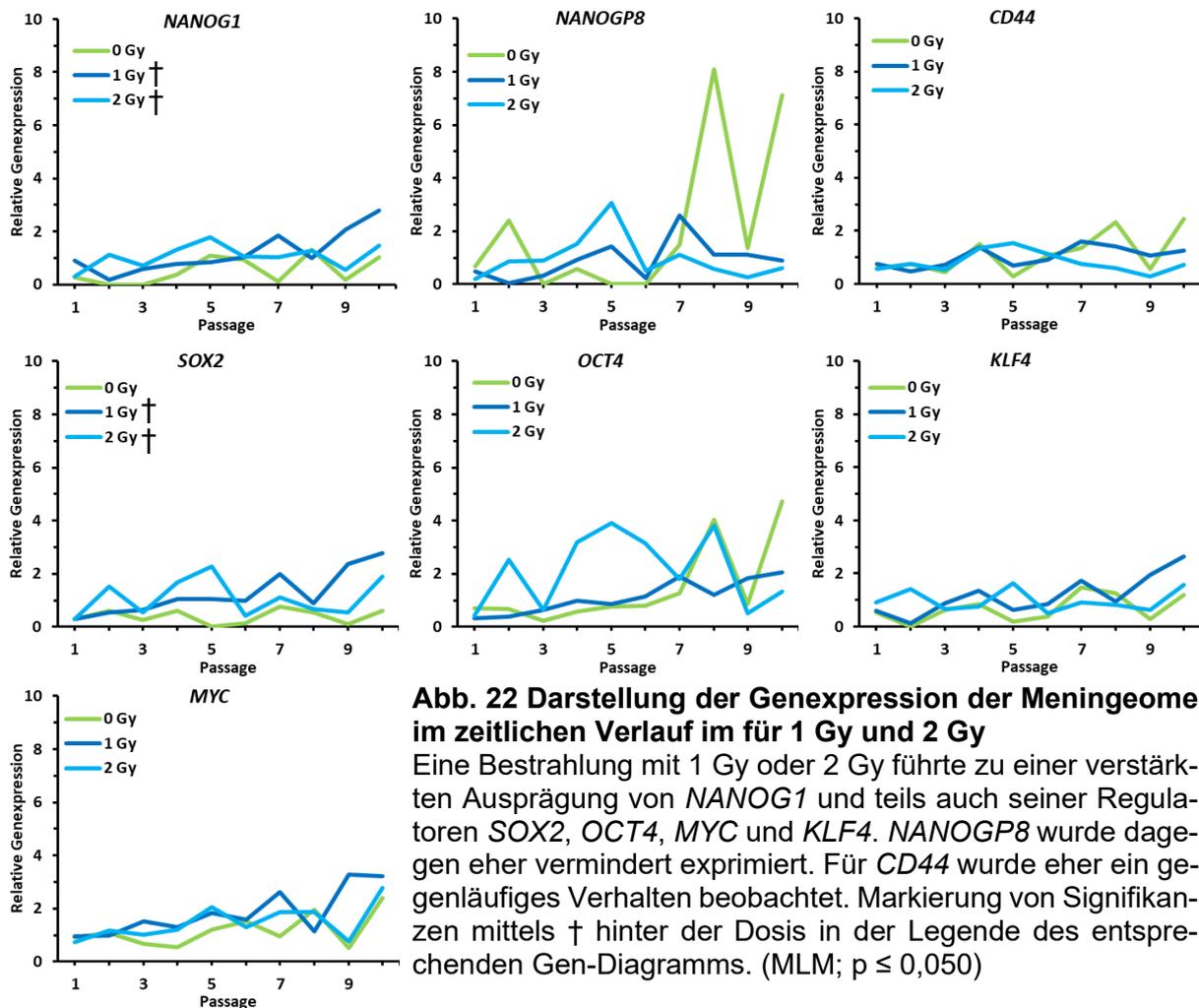
Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $R_{MW}^{NANOG1} = 1,39$ ;  $SD \pm 1,06$ ;  $p = 0,005$ ). Von besonderer Relevanz waren hier jedoch noch zwei weitere Aspekte: Zum einen ist die *NANOG1*-Expression nach einer 4 Gy-Bestrahlung in Tendenz auch höher als bei den mit 1 Gy- ( $p = 0,368$ ) und 2 Gy-Meningeomzellen ( $p = 0,348$ ). Zum anderen nahm auch die Expression des anderen Stammzellmarkers *CD44* erstmals tendenziell zu ( $R_{MW}^{CD44} = 1,44$ ;  $SD \pm 0,81$ ;  $p = 0,229$ ). Auch die Expression von *SOX2* nahm mit  $R_{MW}^{SOX2} = 1,59$  ( $SD \pm 1,18$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ( $p < 0,001$ ) bzw. im Vergleich zur Niedrigdosis-Gruppe tendenziell zu (1 Gy,  $p = 0,189$ ; 2 Gy,  $p = 0,129$ ). Der Transkriptionsfaktor *OCT4* wurde dagegen in keinem relevanten Maß beeinflusst ( $R_{MW}^{OCT4} = 1,44$ ;  $SD \pm 0,99$ ;  $p = 0,797$ ). Auch für *NANOGP8* lässt sich nur ein geringer und dazu lediglich deskriptiver Anstieg der mittleren Expression von  $R_{MW} = 2,25$  ( $SD \pm 2,45$ ;  $p = 0,987$ ) beobachten. Auch für *MYC* und *KLF4* wird mit  $R_{MW}^{MYC} = 1,78$  ( $SD \pm 0,82$ ;  $p = 0,094$ ) und  $R_{MW}^{KLF4} = 1,03$  ( $SD \pm 0,77$ ;  $p = 0,212$ ) eine relative Steigerung der Genexpression registriert (**Abb. 23**).

Mit Überschreiten der kritischen  $ED_{50}$  sind auch die mit 8 Gy bestrahlten Meningeom-Kulturen von besonderem Interesse: Tatsächlich zeigte sich für die Stammzellmarker *NANOG1* ( $R_{MW}^{NANOG1} = 0,23$ ;  $SD \pm 0,58$ ;  $p = 0,297$ ) und *CD44* ( $R_{MW}^{CD44} = 0,49$ ;  $SD \pm 0,48$ ;  $p = 0,046$ ) ein relativer bzw. sogar signifikanter Abfall der Genexpression in Relation zu den Kontrollgruppen.



Aber auch die *NANOGP8*-Expression ließ mit  $R_{MW}^{NANOGP8} = 0,47$  (SD  $\pm 0,88$ ;  $p = 0,135$ ) nach einer 8 Gy-Radiatio tendenziell nach. Kongruent sank in Tendenz auch für *OCT4* die mittlere Expression mit  $R_{MW}^{OCT4} = 0,38$  (SD  $\pm 0,57$ ;  $p = 0,304$ ). *SOX2* hingegen wurde durch eine Dosis mit 8 Gy in seiner Expression nicht wesentlich beeinflusst ( $R_{MW}^{SOX2} = 0,48$ ; SD  $\pm 0,82$ ;  $p = 0,807$ ). Parallel ließ auch für *MYC* und *KLF4* die mittlere Expression mit  $R_{MW}^{MYC} = 0,37$  (SD  $\pm 0,60$ ;  $p = 0,067$ ) und  $R_{MW}^{KLF4} = 0,36$  (SD  $\pm 0,61$ ;  $p = 0,168$ ) nach.

Hinsichtlich der Expressionsmuster grenzte sich der Hochdosisbereich, beginnend mit 12 Gy, deutlich von den mit 8 Gy bestrahlten Meningeomzellen ab (**Abb. 21**): Nach einer 12 Gy-Radiatio konnte eine signifikante Steigerung der Expression von *NANOG1* ( $R_{MW}^{NANOG1} = 1,38$ ; SD  $\pm 1,38$ ;  $p = 0,040$ ) und seinem Regulator *SOX2* ( $R_{MW}^{SOX2} = 1,95$ ; SD  $\pm 1,57$ ;  $p = 0,001$ ) beobachtet werden. Auch *NANOGP8* ( $R_{MW}^{NANOGP8} = 3,13$ ; SD  $\pm 3,70$ ;  $p = 0,403$ ), *OCT4* ( $R_{MW}^{OCT4} = 2,14$ ; SD  $\pm 1,92$ ;  $p = 0,365$ ) und *MYC* ( $R_{MW}^{MYC} = 2,08$ ; SD  $\pm 1,33$ ;  $p = 0,078$ ) nahmen tendenziell in ihrer Expression zu. Lediglich für *CD44* ( $R_{MW}^{CD44} = 1,14$ ; SD  $\pm 1,10$ ;  $p = 0,951$ ) und *KLF4* ( $R_{MW}^{KLF4} = 0,79$ ; SD  $\pm 0,93$ ;  $p = 0,743$ ) wurden keine statistisch relevanten Alterationen beobachtet (**Abb. 24**).

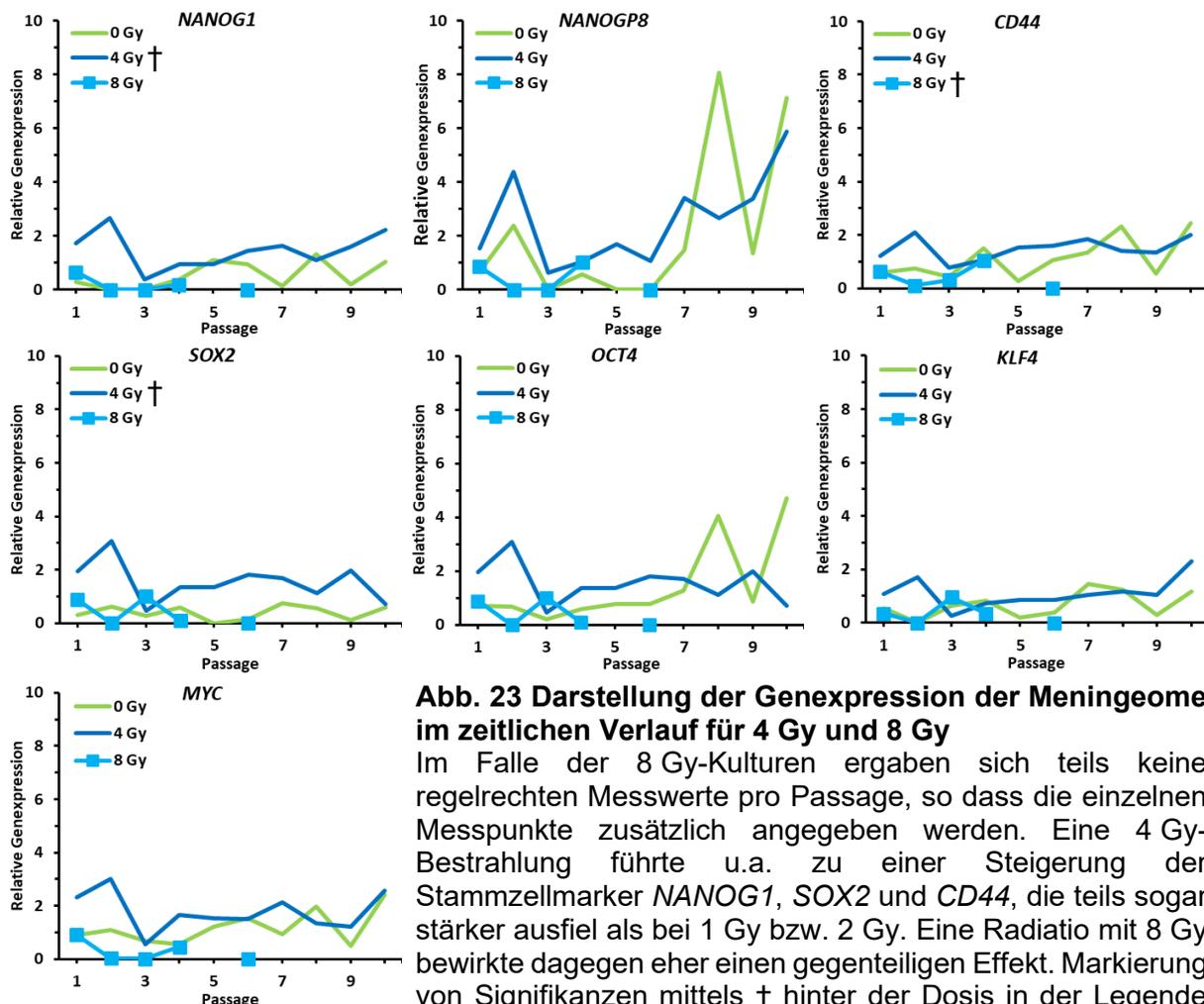


**Abb. 22 Darstellung der Genexpression der Meningeome im zeitlichen Verlauf im für 1 Gy und 2 Gy**

Eine Bestrahlung mit 1 Gy oder 2 Gy führte zu einer verstärkten Ausprägung von *NANOG1* und teils auch seiner Regulatoren *SOX2*, *OCT4*, *MYC* und *KLF4*. *NANOGP8* wurde dagegen eher vermindert exprimiert. Für *CD44* wurde eher ein gegenläufiges Verhalten beobachtet. Markierung von Signifikanzen mittels † hinter der Dosis in der Legende des entsprechenden Gen-Diagramms. (MLM;  $p \leq 0,050$ )

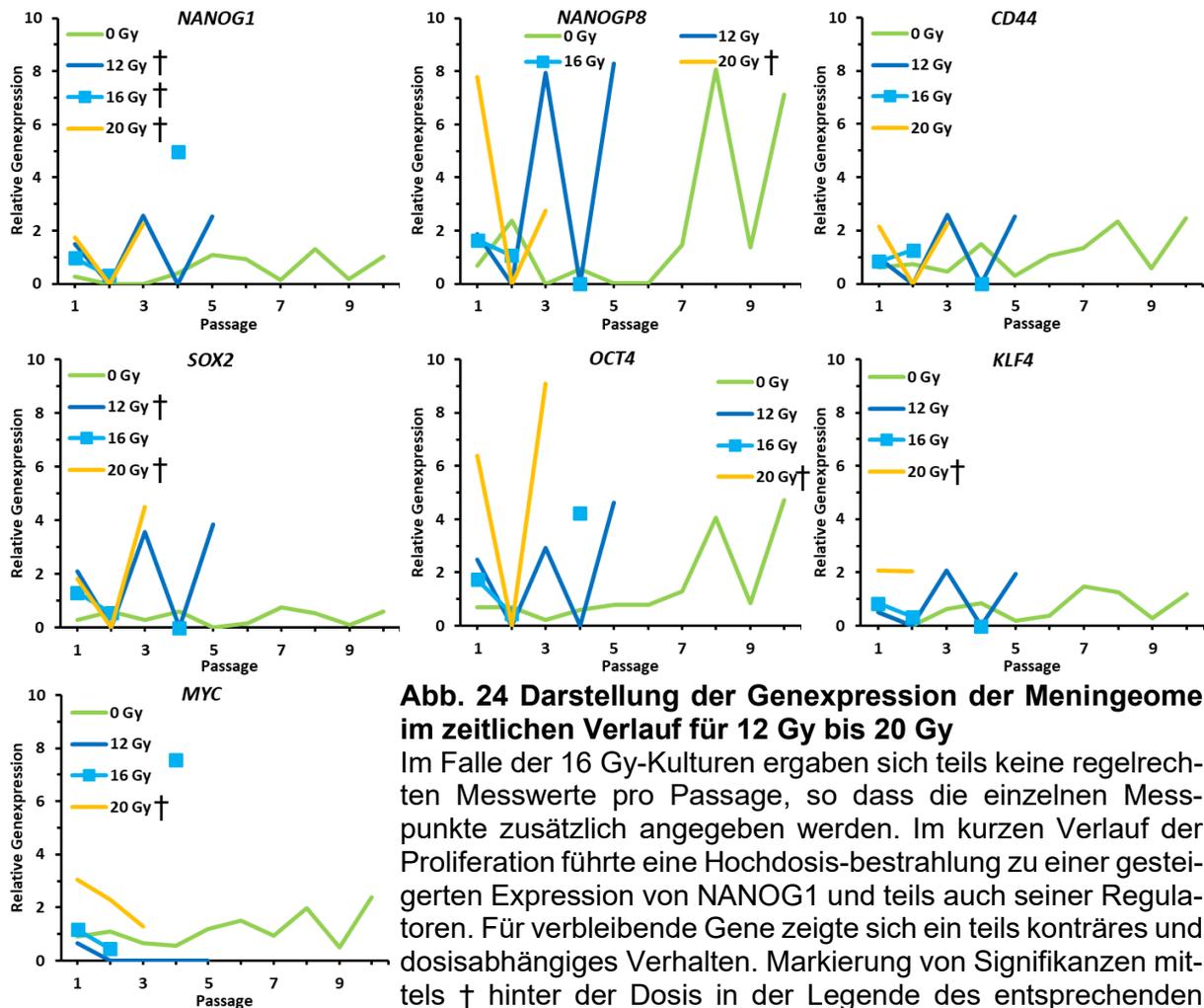
Ein nur teilweise ähnliches Bild ergab sich für die 16 Gy-Meningeome: Auch hier wurde eine signifikante Expressionssteigerung von *NANOG1* ( $R_{MW}^{NANOG1} = 1,64$ ;  $SD \pm 1,74$ ;  $p = 0,025$ ) erzielt. *SOX2* ( $R_{MW}^{SOX2} = 0,89$ ;  $SD \pm 0,89$ ;  $p = 0,332$ ), *OCT4* ( $R_{MW}^{OCT4} = 1,98$ ;  $SD \pm 1,69$ ;  $p = 0,489$ ) und *MYC* ( $R_{MW}^{MYC} = 2,30$ ;  $SD \pm 2,69$ ;  $p = 0,064$ ) nahmen alle in Tendenz in ihrer Expression zu. Für *CD44* ( $R_{MW}^{CD44} = 0,76$ ;  $SD \pm 0,42$ ;  $p = 0,394$ ) wurde nach einer 16 Gy-Bestrahlung dagegen sogar eine relative Expressionsabnahme beobachtet. *KLF4* ( $R_{MW}^{KLF4} = 0,57$ ;  $SD \pm 0,57$ ;  $p = 0,707$ ) und *NANOGP8* ( $R_{MW}^{NANOGP8} = 1,21$ ;  $SD \pm 1,92$ ;  $p = 0,599$ ) zeigten keine wesentliche Änderung im Expressionsmuster.

Die 20 Gy-Meningeome ähnelten in ihrem Verhalten auch eher der 12 Gy-Gruppe: Auch hier führte die Intervention zu einer signifikant gesteigerten Expression von *NANOG1* ( $R_{MW}^{NANOG1} = 1,51$ ;  $SD \pm 0,85$ ;  $p = 0,032$ ), *NANOGP8* ( $R_{MW}^{NANOGP8} = 5,23$ ;  $SD \pm 6,88$ ;  $p = 0,018$ ), *SOX2* ( $R_{MW}^{SOX2} = 1,99$ ;  $SD \pm 1,67$ ;  $p = 0,003$ ), *OCT4* ( $R_{MW}^{OCT4} = 5,65$ ;  $SD \pm 4,42$ ;  $p < 0,001$ ), *MYC* ( $R_{MW}^{MYC} = 2,55$ ;  $SD \pm 1,78$ ;  $p = 0,020$ ) und *KLF4* ( $R_{MW}^{KLF4} = 2,06$ ;  $SD \pm 0,52$ ;  $p = 0,001$ ). Aber selbst bei *CD44* ( $R_{MW}^{CD44} = 1,74$ ;  $SD \pm 1,43$ ;  $p = 0,114$ ) konnte eine tendenziell gesteigerte Expression beschrieben werden.



**Abb. 23 Darstellung der Genexpression der Meningeome im zeitlichen Verlauf für 4 Gy und 8 Gy**

Im Falle der 8 Gy-Kulturen ergaben sich teils keine regelrechten Messwerte pro Passage, so dass die einzelnen Messpunkte zusätzlich angegeben werden. Eine 4 Gy-Bestrahlung führte u.a. zu einer Steigerung der Stammzellmarker *NANOG1*, *SOX2* und *CD44*, die teils sogar stärker ausfiel als bei 1 Gy bzw. 2 Gy. Eine Radiatio mit 8 Gy bewirkte dagegen eher einen gegenteiligen Effekt. Markierung von Signifikanzen mittels † hinter der Dosis in der Legende des entsprechenden Gen-Diagramms. (MLM;  $p \leq 0,050$ )



**Abb. 24 Darstellung der Genexpression der Meningeome im zeitlichen Verlauf für 12 Gy bis 20 Gy**  
 Im Falle der 16 Gy-Kulturen ergaben sich teils keine regelrechten Messwerte pro Passage, so dass die einzelnen Messpunkte zusätzlich angegeben werden. Im kurzen Verlauf der Proliferation führte eine Hochdosis-bestrahlung zu einer gesteigerten Expression von NANOG1 und teils auch seiner Regulatoren. Für verbleibende Gene zeigte sich ein teils konträres und dosisabhängiges Verhalten. Markierung von Signifikanzen mittels † hinter der Dosis in der Legende des entsprechenden Gen-Diagramms. (MLM;  $p \leq 0,050$ )

### 7.3 INTERLEUKIN-SEKRETION UNTER BESTRAHLUNG

#### 7.3.1 VERÄNDERUNGEN DER ABSOLUTEN INTERLEUKIN-KONZENTRATIONEN UNTER IONISIERENDER STRAHLUNG

##### 7.3.1.1 VERÄNDERUNGEN IN DER INTERLEUKIN-KONZENTRATIONEN IN DURA MATER-ZELLEN NACH BESTRAHLUNG

###### 7.3.1.1.1 INTERLEUKIN-6-SEKRETION NACH BESTRAHLUNG

Als Referenzpunkt dienten auch hier wieder die mittels ELISA bei jeder Passage bestimmten Interleukin-Konzentrationen der nicht bestrahlten Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe der Dura mater-Zellen sezernierte dabei über alle Passagen gemittelt 2467,66 pg/ml (SD  $\pm$  2086,58 pg/ml) an IL-6 (**Abb. 25**).

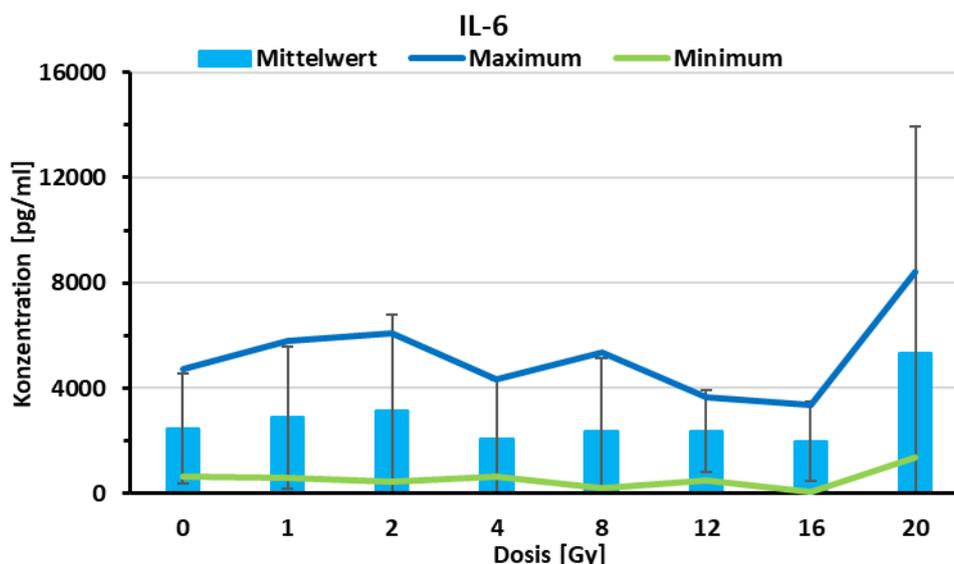
Die 1 Gy-Interventionsgruppe der Dura mater-Zellen sezernierte im Mittel eine IL-6-Konzentration im Medium von 2880,94 pg/ml (SD  $\pm$  2683,08 pg/ml) pro Passage aufrecht. Nach einer Bestrahlung mit 2 Gy produzierten die Kulturen durchschnittlich 3152,01 pg/ml (SD  $\pm$  3628,18 pg/ml) an IL-6 pro Passage. Bei 4 Gy wurde pro Passage durchschnittlich mit

2100,23 pg/ml weniger IL-6 produziert als bei allen niedrigeren und höheren – bis auf 16 Gy – Strahlendosen. Die 8 Gy-Kulturen sezernieren durchschnittlich 2379,39 pg/ml (SD ± 2778,33 pg/ml) an IL-6.

Ab einer Strahlendosis von 12 Gy wurde der Hochdosisbereich erreicht. Doch auch hier konnten die Dura mater-Kulturen in jeder Passage eine durchschnittliche IL-6-Konzentration von 2364,12 pg/ml (SD ± 1554,29 pg/ml) aufrechterhalten. Die 16 Gy-Kulturen erreichten eine mittlere Sekretion von 1981,17 pg/ml (SD ± 1528,78 pg/ml). Die 20 Gy-Gruppe wies, wie im oberen Kapitel, beschrieben eine deutlich niedrigere maximale Passagenzahl auf. Gleichzeitig erreichte sie jedoch im Durchschnitt mit 5335,99 pg/ml (SD ± 8591,56 pg/ml) die höchste IL-6-Konzentration im Verlauf.

Über Kontroll- und Interventionsgruppen gemittelt produzierten die Dura mater-Zellkulturen pro Passage 2697,66 pg/ml (SD ± 3217,03 pg/ml) an IL-6.

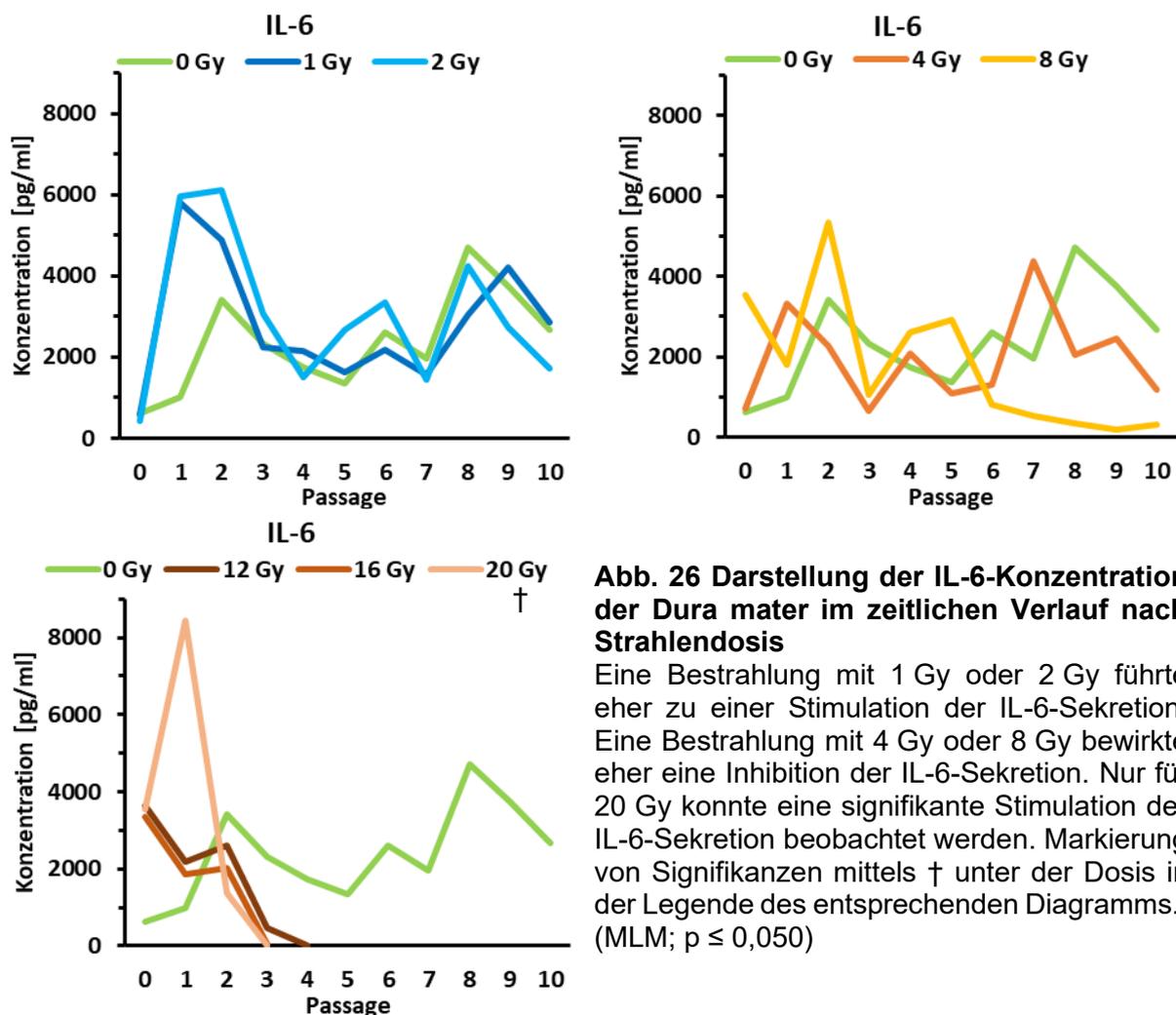
Von besonderer Relevanz war hier auch der Vergleich der IL-6-Konzentrationen der Interventionsgruppen mit der Kontrollgruppe im Verlauf. Im Niedrigdosisbereich mit 1 Gy und 2 Gy führte die Bestrahlung insgesamt tendenziell zu einer Stimulation der IL-6-Produktion (**Abb. 26**). So ergab sich für 1 Gy ein p-Wert von  $p = 0,496$  und für 2 Gy ein p-Wert von  $p = 0,407$ . Fasst man beide Dosen zusammen und vergleicht sie so mit der Kontrolle, so führte eine *Low dose*-Radiation mit einem  $p = 0,396$  zu einer verstärkten IL-6-Sekretion im Verlauf. Nach einer Intervention mit 4 Gy wurde im Verlauf tendenziell ein niedrigeres IL-6-Niveau beobachtet im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies spiegelte sich auch die Analyse mittels MLM mit  $p = 0,377$  wider. Im Falle von



**Abb. 25 Mittlere, maximale und minimale IL-6-Konzentration der Dura mater pro Passage nach Strahlendosis**

Im Fall der Dura mater unduliert deskriptiv die pro Passage gemittelte IL-6-Konzentration der Interventionsgruppe um das Niveau der Kontrollgruppe. Einen deskriptiven Ausreißer mit einer erhöhten Sekretion stellte die 20 Gy-Gruppe dar.

8 Gy ließ sich im MLM mit  $p = 0,705$  keine Tendenz mehr ausmachen, auch wenn die IL-6-Sekretion deskriptiv niedriger ausfiel als in den nicht bestrahlten Kulturen. Doch auch hier zeigte das MLM mit  $p = 0,451$ , dass in der *Intermediate dose*-Gruppe mit 4 Gy und 8 Gy die Radiatio zu einer Hemmung der IL-6-Produktion führte. Bei einem direkten Vergleich im MLM ließen sich *Low dose* und *Intermediate dose* deutlich abgrenzen: Mit einer Mittelwertdifferenz von 863,398 pg/ml fiel die Interleukin-Konzentration im *Intermediate dose*-Bereich geringer aus, was ein p-Wert von  $p = 0,062$  nur zusätzlich unterstreicht. Die bei 8 Gy eingeschlagene Entwicklung setzte sich bei den höheren Dosen fort: Weder bei 12 Gy ( $p = 0,935$ ) noch bei 16 Gy ( $p = 0,584$ ) ließ sich eine Tendenz zur Sekretionsstimulation oder -hemmung feststellen. Tatsächlich führte eine Bestrahlung mit 20 Gy zu einer signifikanten Stimulation der IL-6-Sekretion ( $p = 0,003$ ). Hier war jedoch auch die geringere maximale Passagenzahl dieser Interventionsgruppe zu berücksichtigen.



**Abb. 26 Darstellung der IL-6-Konzentration der Dura mater im zeitlichen Verlauf nach Strahlendosis**

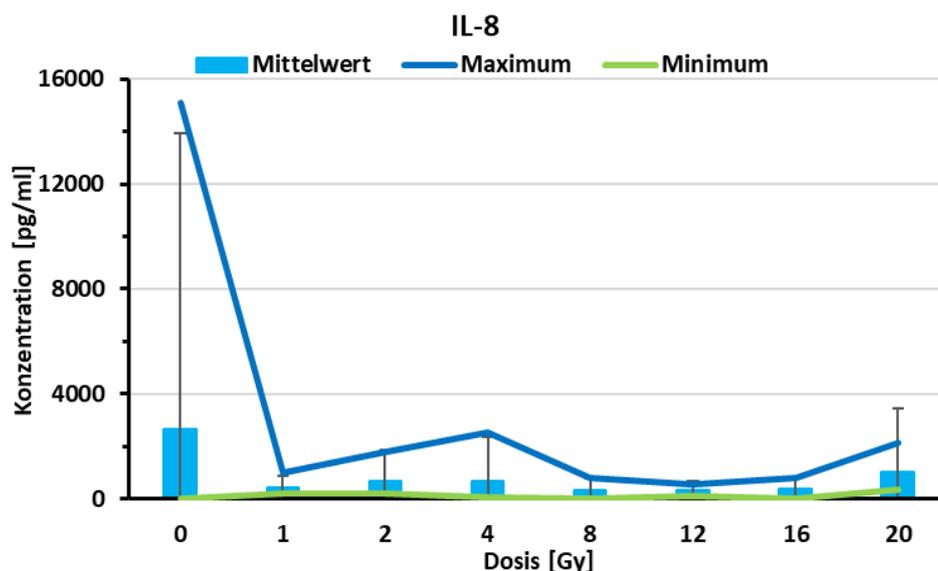
Eine Bestrahlung mit 1 Gy oder 2 Gy führte eher zu einer Stimulation der IL-6-Sekretion. Eine Bestrahlung mit 4 Gy oder 8 Gy bewirkte eher eine Inhibition der IL-6-Sekretion. Nur für 20 Gy konnte eine signifikante Stimulation der IL-6-Sekretion beobachtet werden. Markierung von Signifikanzen mittels † unter der Dosis in der Legende des entsprechenden Diagramms.. (MLM;  $p \leq 0,050$ )

#### 7.3.1.1.2 INTERLEUKIN-8-SEKRETION NACH BESTRAHLUNG

Die Kontrollgruppe sezernierte im Mittel 2654,67 pg/ml (SD  $\pm$  11265,93 pg/ml) an IL-8. Im Mittel sezernierten sämtliche Kulturen der Dura mater 937,50 pg/ml (SD  $\pm$  5007,87 pg/ml) an Interleukin-8 pro Passage (**Abb. 27**).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe dazu fielen die mittlere Konzentration bei 1 Gy mit 436,87 pg/ml (SD  $\pm$  466,54 pg/ml) und bei 2 Gy mit 676,31 pg/ml (SD  $\pm$  1179,89 pg/ml) deskriptiv deutlich geringer aus. Die 4 Gy-Kulturen produzierten im Mittel 703,80 pg/ml (SD  $\pm$  1653,28 pg/ml) an IL-8. Nach einer Radiatio mit 8 Gy produzierten die Dura mater-Zellen im Mittel 349,62 pg/ml (SD  $\pm$  461,10 pg/ml). Die *High dose*-Gruppe beginnt mit 12 Gy und 16 Gy, die im Mittel 366,65 pg/ml (SD  $\pm$  308,58 pg/ml) nach 12 Gy bzw. 398,30 pg/ml (SD  $\pm$  445,55 pg/ml) nach 16 Gy produzierten. Dieses Bild setzte sich auch in der höchsten Strahlengruppe fort, auch wenn hier die Konzentration wiederum höher ausfiel: Die mittlere IL-8-Konzentration über alle Passagen lag bei den mit 20 Gy bestrahlten Kulturen bei 1052,47 pg/ml (SD  $\pm$  2423,31 pg/ml) und somit zunächst merklich höher als bei den anderen beiden Interventionsgruppen der *high dosage*-Kulturen.

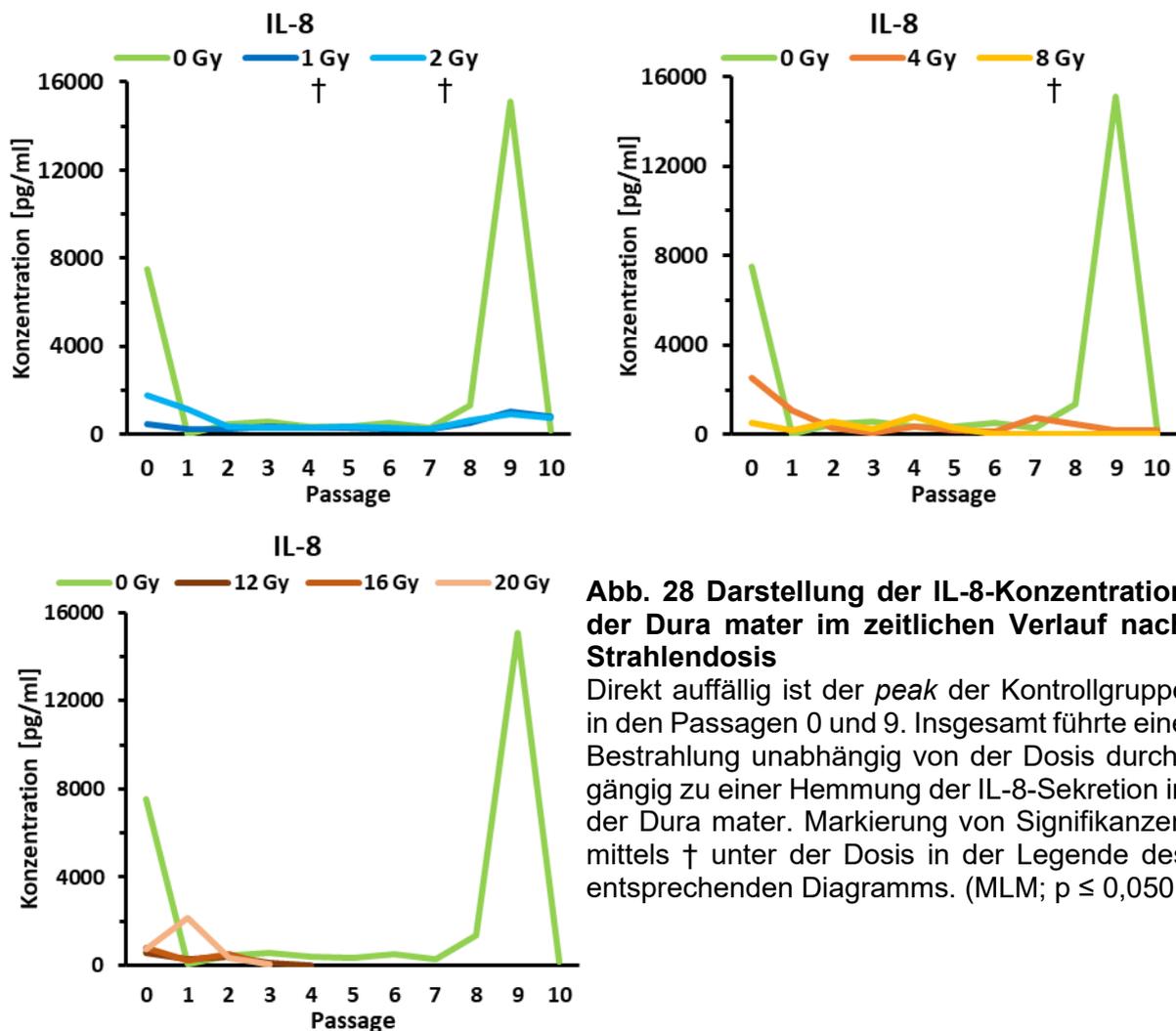
Auch hier sollte die IL-8-Konzentrationen der Interventionskulturen denen der Kontrollgruppe im MLM über den zeitlichen Verlauf gegenübergestellt werden. Hier zeigten die bestrahlten Dura mater-Kulturen tatsächlich ein gegenteiliges Bild zur IL-6-Sekretion: Bereits eine Bestrahlung mit 1 Gy ( $p = 0,014$ ) oder 2 Gy ( $p = 0,038$ ) führte zu mittleren IL-8-Konzentrationen, die im Verlauf der Passagen signifikant niedriger ausfielen als in der Kontrollgruppe (**Abb. 28**). Dieses Bild der signifikanten Sekretionshemmung bestätigte sich auch, wenn die 1 Gy- und 2 Gy-Kulturen zusammengefasst als *Low dose*-Gruppe mit der Kontrollgruppe verglichen wurden ( $p = 0,008$ ). Zwar ließ sich mit einem p-Wert von  $p = 0,053$  noch keine Signifikanz nachweisen. Aber auch 4 Gy führten tendenziell zu einer Hemmung der IL-8-Produktion. Eine relevante Hemmung ( $p = 0,023$ ) der Interleukin-Produktion setzte erst wieder bei 8 Gy ein. Auch im direkten



**Abb. 27 Mittlere, maximale und minimale IL-8-Konzentration der Dura mater pro Passage nach Strahlendosis**

Bereits deskriptiv zeigte sich durchgängig bei allen Interventionsgruppen ein deutlicher Abfall der IL-8-Konzentration nach Bestrahlung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Gruppenvergleich führte die Radiatio mit einer Dosis aus dem *Intermediate*-Bereich zu einer relevanten Inhibition der IL-8-Produktion ( $p = 0,012$ ). Diese Sekretionsinhibition ließ sich deskriptiv auch im Hochdosisbereich von 12 Gy bis 20 Gy aufzeigen. Tatsächlich lieferte das MLM zwar eine Tendenz, aber weder bei 12 Gy ( $p = 0,067$ ), noch bei 16 Gy ( $p = 0,063$ ) oder 20 Gy ( $p = 0,234$ ) eine statistische Signifikanz. Diese ließ sich erst mit einem p-Wert von  $p = 0,020$  nachweisen, wenn die gesamte *High dose*-Gruppe in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt wurde. Interessant war hier auch der Vergleich der Interventionsgruppen untereinander: So ließen sich die *Low dose*-Gruppe in ihrer IL-8-Produktion nicht einmal tendenziell im MLM von der *Intermediate dose*- ( $p = 0,998$ ) oder *High dose*-Gruppe ( $p = 0,972$ ) abgrenzen. Im direkten Vergleich konnte auch zwischen den *Intermediate dose*- und *High dose*-Kulturen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,972$ ).



**Abb. 28 Darstellung der IL-8-Konzentration der Dura mater im zeitlichen Verlauf nach Strahlendosis**

Direkt auffällig ist der *peak* der Kontrollgruppe in den Passagen 0 und 9. Insgesamt führte eine Bestrahlung unabhängig von der Dosis durchgängig zu einer Hemmung der IL-8-Sekretion in der Dura mater. Markierung von Signifikanzen mittels † unter der Dosis in der Legende des entsprechenden Diagramms. (MLM;  $p \leq 0,050$ )

### 7.3.1.2 VERÄNDERUNGEN IN DER INTERLEUKIN-KONZENTRATIONEN IN MENINGEOMEN NACH BE- STRAHLUNG

#### 7.3.1.2.1 INTERLEUKIN-6-SEKRETION NACH BESTRAHLUNG

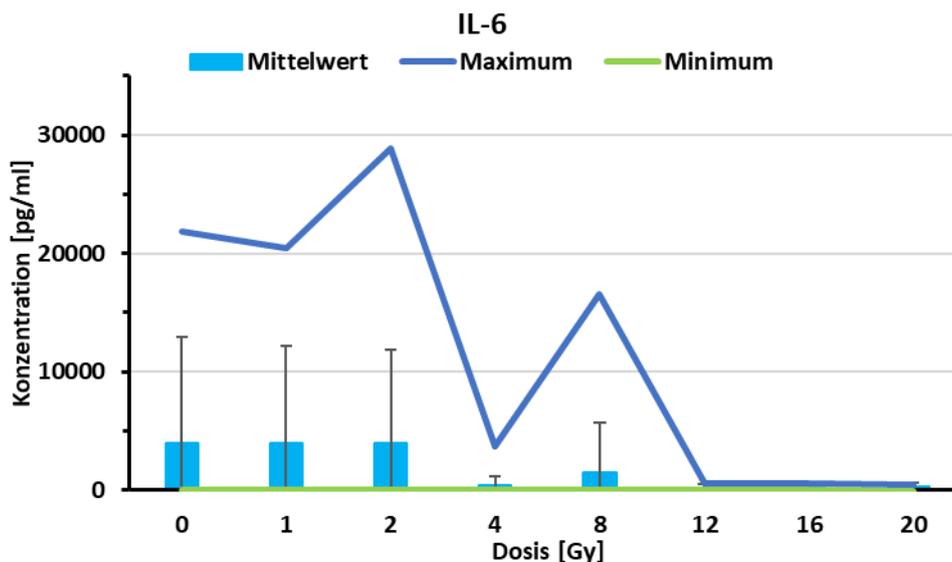
Die unbestrahlten Zellen der Kontrollgruppe produzierten im Mittel 3996,80 pg/ml (SD  $\pm$  8955,10 pg/ml) an Interleukin-6. Damit überschritt dieser Mittelwert den entsprechenden der Dura mater-Zellen um 1529,15 pg/ml (**Abb. 29**).

Die mit 1 Gy und 2 Gy bestrahlten Meningeomkulturen ähnelten in ihrem Sekretionsverhalten der Kontrollgruppe: So produzierten sie nach Intervention im Mittel 4030,75 pg/ml (SD  $\pm$  8170,02 pg/ml) bzw. 4025,94 pg/ml (SD  $\pm$  7889,70 pg/ml) und somit 1149,81 pg/ml bzw. 873,93 pg/ml mehr als die Dura mater-Kulturen der gleichen Strahlendosis.

Einen Bruch in dieser Reihe stellte die 4 Gy-Interventionsgruppe unter den Meningeomen dar: Mit einer mittleren IL-6-Sekretion von 395,54 pg/ml (SD  $\pm$  790,36 pg/ml) fiel diese nicht nur um 3600 pg/ml geringer aus als in der *Low dose*- oder Kontrollgruppe, sondern auch um 1704,69 pg/ml niedriger als in der dazugehörigen Dura mater-Kultur.

Nach einer Bestrahlung mit 8 Gy fiel die von den Meningeomzellkulturen produzierte IL-6-Konzentration mit 1467,99 pg/ml (SD  $\pm$  4222,25 pg/ml) wieder merklich höher aus. In Relation zu den entsprechenden Dura mater-Kulturen fiel die mittlere Sekretionsrate um 911,40 pg/ml niedriger aus.

Der Hochdosisbereich zeigte sich bei den Meningeomen zumindest deskriptiv homogen: Hier wurden mittlere Sekretionsraten von 184,24 pg/ml (SD  $\pm$  350,51 pg/ml) nach 12 Gy, 221,84 pg/ml (SD  $\pm$  410,20 pg/ml) nach 16 Gy und 257,45 pg/ml (SD  $\pm$  336,97 pg/ml) nach



**Abb. 29 Mittlere, maximale und minimale IL-6-Konzentration der Meningeome pro Passage nach Strahlendosis**

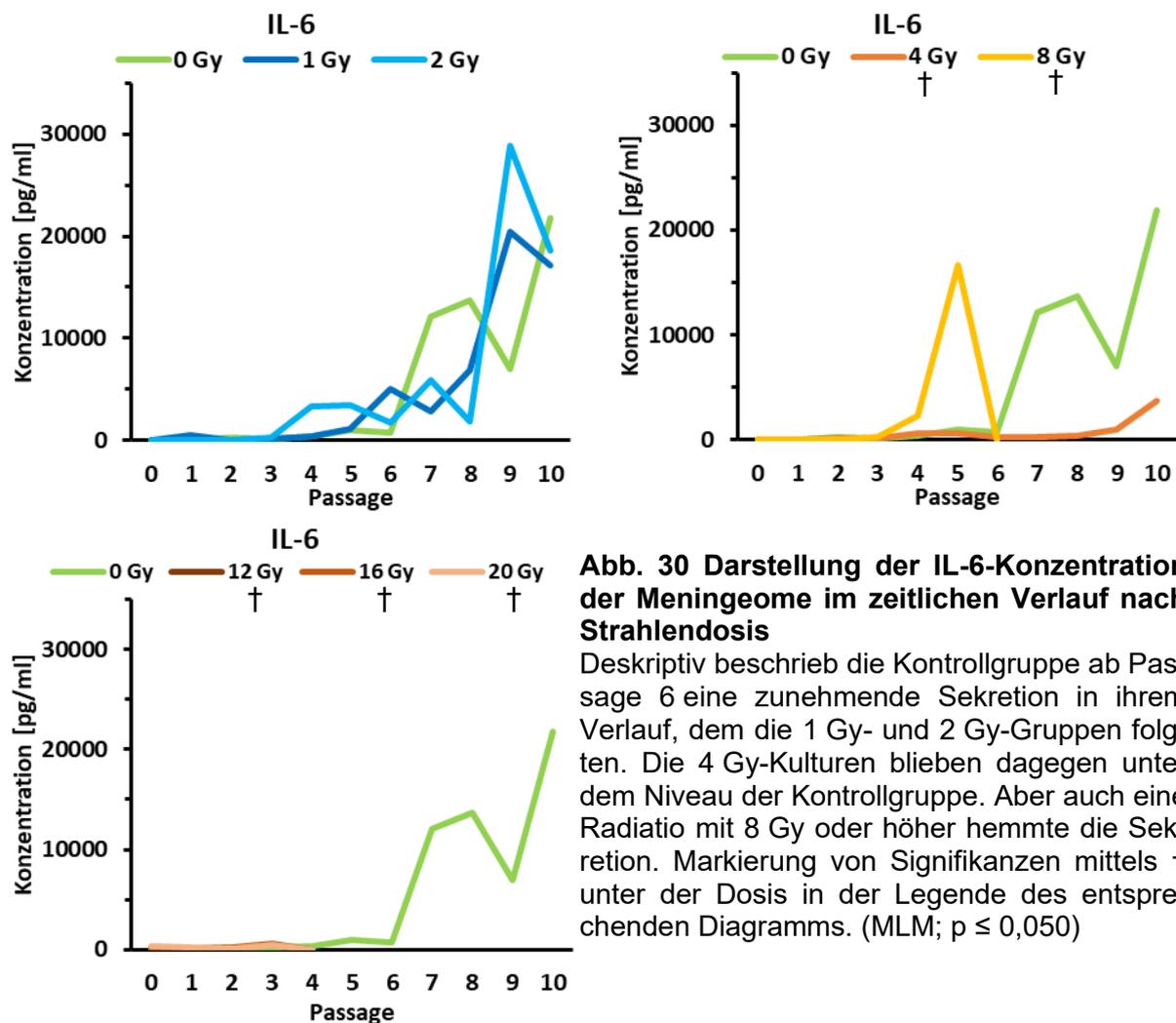
Auffallend in der Deskription ist die Undulation der 1 Gy- und 2 Gy-Gruppen um das Niveau der Kontrollgruppe mit Sekretionseinbruch nach 4 Gy und nur einer geringen Erholung nach 8 Gy.

20 Gy gemessen. Im Vergleich zur Hochdosisgruppe der Dura mater-Zellen waren die mittlere Sekretionsraten mit Differenzen von 2179,88 pg/ml (12 Gy), 1759,33 pg/ml (16 Gy) und 5078,54 pg/ml (20 Gy) deutlich niedriger.

Über alle Zellkulturen gemittelt produzierten die Meningeomzellen 2204,75 pg/ml (SD ± 6231,44 pg/ml) an IL-6. Im Vergleich zu den Dura mater-Kulturen fiel diese mittlere Sekretionsrate an IL-6 um 492,91 pg/ml niedriger aus.

Unter Zusammenfassung aller bestrahlten der Interventionsgruppen fiel die mittlere Sekretionsrate auf 1839,17 pg/ml (SD ± 5440,96 pg/ml) ab. Im zeitlichen Verlauf des MLM zeigten sich deutlich dosisabhängige Strahleneffekte in der IL-6-Sekretion: So führte weder eine Dosis von 1 Gy ( $p = 0,997$ ) noch von 2 Gy ( $p = 0,896$ ) zu einer relevanten Veränderung in der Interleukin-Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abb. 30**).

Erst mit einer Dosis von 4 Gy oder höher konnten signifikante Hemmungen der IL-6-Synthese erzielt werden: Die Sekretionen waren in der 4 Gy- ( $p = 0,001$ ), 8 Gy- ( $p = 0,044$ ), 12 Gy- ( $p = 0,009$ ), 16 Gy- ( $p = 0,009$ ) und 20 Gy-Interventionsgruppe ( $p = 0,010$ ) in Relation zu den nicht bestrahlten Kulturen signifikant niedriger. Auch der Vergleich der Interventionsgruppen untereinander zeigte ein deutliches Bild: So zeigten die 4 Gy-Kulturen im zeitlichen Verlauf eine



**Abb. 30 Darstellung der IL-6-Konzentration der Meningeome im zeitlichen Verlauf nach Strahlendosis**

Deskriptiv beschrieb die Kontrollgruppe ab Passage 6 eine zunehmende Sekretion in ihrem Verlauf, dem die 1 Gy- und 2 Gy-Gruppen folgten. Die 4 Gy-Kulturen blieben dagegen unter dem Niveau der Kontrollgruppe. Aber auch eine Radiotherapie mit 8 Gy oder höher hemmte die Sekretion. Markierung von Signifikanzen mittels † unter der Dosis in der Legende des entsprechenden Diagramms. (MLM;  $p \leq 0,050$ )

signifikant niedrigere IL-6-Sekretion als die 1 Gy- ( $p = 0,001$ ) und 2 Gy-Meningeom-Kulturen ( $p = 0,002$ ). Tatsächlich zeigte sich auch bei Zusammenfassung von Dosisgruppen, dass eine *Low dose*-Bestrahlung zu keinen relevanten Veränderungen in der IL-6-Konzentration führte ( $p = 0,937$ ). Gleichzeitig konnte nach einer *Intermediate dose*- ( $p = 0,001$ ) und *High dose*-Intervention ( $p < 0,001$ ) eine signifikant niedrigere IL-6-Sekretion bei den Meningeomen beobachtet werden.

#### 7.3.1.2.2 INTERLEUKIN-8-SEKRETION NACH BESTRAHLUNG

Durchschnittlich produzierten die Kontrollgruppen 1494,49 pg/ml (SD  $\pm$  3871,05) an IL-8 pro Passage. Die durchschnittliche Sekretionsrate fiel somit um 1160,18 pg/ml niedriger aus als bei der Kontrollgruppe der Dura mater-Zellen (**Abb. 31**).

Im Niedrigdosis-Bereich zeigten die 1 Gy-Kulturen mit 5346,98 pg/ml (SD  $\pm$  15545,80 pg/ml) und 2 Gy-Kulturen mit 7409,36 pg/ml (SD  $\pm$  18393,98 pg/ml) eine merklich höhere mittlere Sekretionsrate. Im Vergleich zu den entsprechenden Dura mater-Kulturen waren die durchschnittlichen Sekretionsraten dabei um 4910,11 pg/ml bei 1 Gy und 6733,05 pg/ml bei 2 Gy erhöht.

Nach einer Bestrahlung mit 4 Gy zeigte sich in der Dosisreihe mit 270,08 pg/ml pro Passage (SD  $\pm$  850,69 pg/ml) erstmals ein Abfall in der mittleren Sekretionsrate für IL-8 in den Meningeom-Kulturen. Tatsächlich war die mittlere Sekretionsrate um 433,72 pg/ml niedriger als in vergleichbaren Kulturen der Dura mater.

Die mittlere IL-8-Sekretionsrate der mit 8 Gy bestrahlten Meningeome war zwar mit 1121,28 pg/ml wieder höher als bei 4 Gy, reichte aber nicht mehr an das Niveau der Niedrigdosis-Gruppe heran. Die mittlere Sekretionsrate war somit um 771,66 pg/ml höher als in den entsprechenden Dura mater-Kulturen. Im Hochdosisbereich zeigt sich zumindest deskriptiv eine Hemmung der IL-8-Produktion: Die durchschnittliche Sekretionsrate liegt nur noch bei 37,10 pg/ml (SD  $\pm$  50,18 pg/ml) für 12 Gy, 67,51 pg/ml (SD  $\pm$  78,97 pg/ml) für 16 Gy und 163,48 pg/ml (SD  $\pm$  247,39 pg/ml) für 20 Gy. Diese Raten fallen dabei um 329,55 pg/ml (12 Gy), 330,78 pg/ml (16 Gy) und 888,99 pg/ml (20 Gy) niedriger aus als in den Pendanten der Dura mater.

Insgesamt sezernierten die Meningeom-Kulturen pro Passage 2492,86 pg/ml (SD  $\pm$  10301,37 pg/ml) IL-8. Bei alleiniger Betrachtung der Interventionsgruppen zeigte sich wiederum eine Zunahme der mittleren Sekretionsrate auf 2694,87 pg/ml (SD  $\pm$  11149,67 pg/ml).

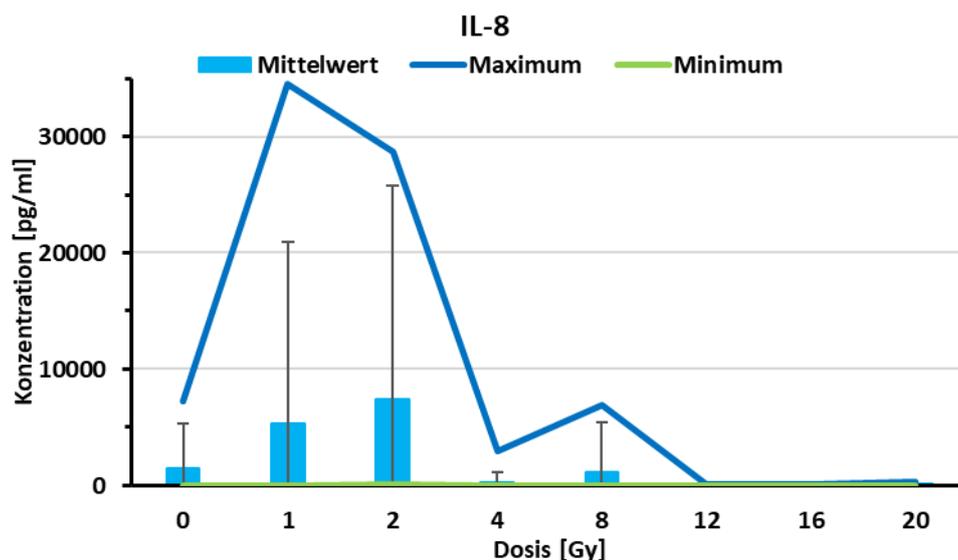
Im MLM zeigte sich lediglich für die Niedrigdosen von 1 Gy ( $p = 0,047$ ) und 2 Gy ( $p = 0,003$ ), dass die Bestrahlung im zeitlichen Verlauf bei den Meningeom-Kulturen zu einer signifikanten Stimulation der IL-8-Sekretion im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Weder in der 4 Gy- ( $p = 0,516$ ), noch in der 8 Gy- ( $p = 0,879$ ), 12 Gy- ( $p = 0,584$ ), 16 Gy- ( $p = 0,590$ ) oder 20 Gy-Behandlungsgruppe ( $p = 0,587$ ) ließen sich dagegen Tendenzen zu einer relevanten Änderung im Sekretionsverhalten statistisch nachweisen. Gleichzeitig präsentierte in den 4 Gy-Kulturen

eine signifikante Hemmung der IL-8-Produktion in Relation zu 1 Gy ( $p = 0,009$ ) und 2 Gy ( $p < 0,001$ ).

Dieses Bild setzte sich auch bei Betrachtung der zusammengefassten Dosisgruppen im Vergleich zu den nicht bestrahlten Kulturen fort: Eine *low dose*-Radiatio (1 Gy, 2 Gy) führte zu einer signifikanten Stimulation ( $p = 0,004$ ) der IL-8-Sekretion über den gesamten postinterventionellen Beobachtungszeitraum (**Abb. 32**).

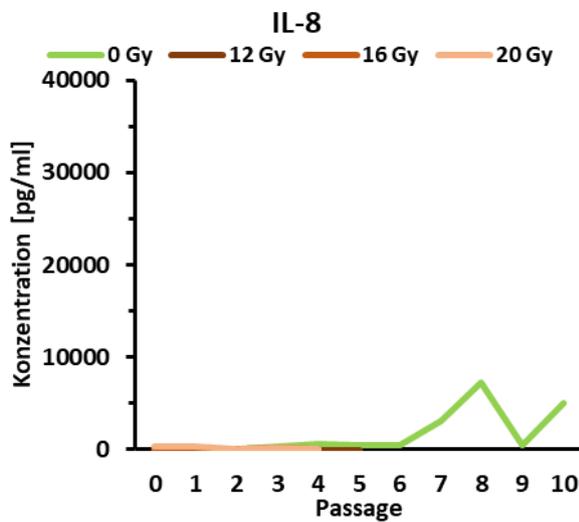
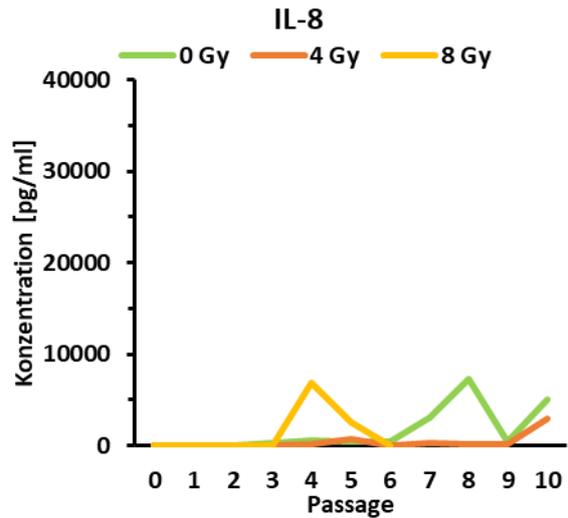
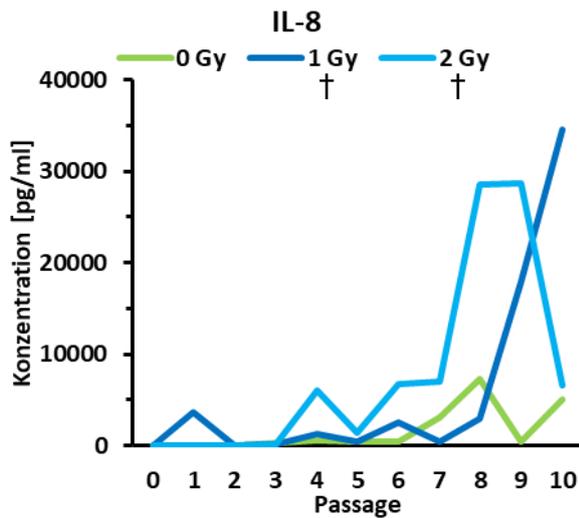
Eine *Intermediate dose*-Bestrahlung (4 Gy, 8 Gy) zeigte dagegen keinen relevanten Effekt ( $p = 0,596$ ) auf das Sekretionsverhalten.

Lediglich eine *High dose*-Intervention (12 Gy, 16 Gy, 20 Gy) induziert tendenziell ( $p = 0,464$ ) eine Hemmung der IL-8-Produktion. Gleichzeitig ließ sich die *Intermediate dose*-Gruppe signifikant von der Low dose-Gruppe signifikant abgrenzen ( $p < 0,001$ ), aber nicht von der Kontrollgruppe ( $p = 0,596$ ) oder der *High dose*-Gruppe ( $p = 0,811$ ).



**Abb. 31 Mittlere, maximale und minimale IL-8-Konzentration der Meningeome pro Passage nach Strahlendosis**

Ähnlich wie bei der IL-6-Sekretion konnte nach einer 4 Gy-Radiatio ein deskriptiver Einbruch der IL-8-Sekretion mit nur einer mäßigen Erholung bei 8 Gy beobachtet werden. Allerdings zeigte sich nach einer Intervention mit 1 Gy und 2 Gy eher eine Zunahme der IL-8-Sekretion.



**Abb. 32 Darstellung der IL-6-Konzentration der Meningeome im zeitlichen Verlauf nach Strahlendosis**

Eine Bestrahlung der Meningeome mit 1 Gy oder 2 Gy führte zu einer Zunahme der Sekretion von IL-8. Im Vergleich zur Kontrollgruppe führte eine Intervention mit 4 Gy oder 8 Gy zu keiner relevanten Alteration der Sekretion. Eine Bestrahlung mit 12 Gy oder höher führte eher zu einer Hemmung der IL-8-Produktion. Markierung von Signifikanzen mittels † unter der Dosis in der Legende des entsprechenden Diagramms. (MLM;  $p \leq 0,050$ )

## 8 DISKUSSION

Meningeome sind eine der häufigsten Tumorentitäten des Zentralen Nervensystems und stellen somit ein omnipräsentes neuroonkologisches Krankheitsbild innerhalb der Neurochirurgie dar. Trotz ihrer hohen klinischen Relevanz ist ihre Tumorgenese auf molekularbiologischer Ebene noch weitestgehend ungeklärt. Aus klinischen Studien konnten bereits einige Risikofaktoren, u.a. die ionisierende Strahlung, abgeleitet werden. Allerdings ist der Mechanismus zwischen Risikoexposition und Entstehung des Meningeoms weiterhin ungeklärt.

Zwischenzeitlich wird auch bei den Meningeomen von einer tragenden Rolle der sog. Tumorstammzellhypothese ausgegangen: Diese Hypothese postuliert die Existenz von Tumorzellen, die stammzellähnliche Eigenschaften in Morphologie und Differenzierung besitzen und so eine Schlüsselposition in Tumorentstehung und -entwicklung einnehmen. Verantwortlich für die Induktion und den Erhalt von stammzellähnlichen Eigenschaften sind verschiedene Gene und deren Produkte, u.a. *NANOG1*, *NANOGP8*, *SOX2*, *OCT4*, etc., und deren Regulatoren, wie z.B. *KLF4* und *MYC*. Aber auch andere Gene und die dazugehörigen Proteine, wie z.B. *CD44*, werden als Stammzell- und Differenzierungsmarker betrachtet.

Ein mögliches Charakteristikum einer Zellkultur oder eines Zellverbandes, dass durch die Tumorgenese der Meningeome beeinflusst wird, ist die Alteration in Proliferation und Zellmorphologie.

Entsprechend den vorhergehenden WHO-Klassifikationen der ZNS-Tumore wiesen höhergradige Meningeome auch einen erhöhten Mitose-Index und somit eine erhöhte Proliferation auf. Aber auch andere Proliferationsindizes, wie z.B. Ki-67, werden regelmäßige zur Beurteilung der Meningeome, z.B. hinsichtlich des Auftretens von Rezidiven, herangezogen (de Carvalho et al. 2020).

Ein weiteres wesentliches Kriterium zur Beurteilung der Entstehung ist die Entwicklung der Morphologie sowohl der Kulturen als auch der Einzelzellen: Zum einen geht die EMT – der Schlüsselmechanismus in der Tumorgenese – mit einer zellulären Wandelung eines kuboiden, epithelialen zu einem elongierten, motilen und spindelförmigen mesenchymalen Phänotyp einher (Leggett et al. 2016). Zum anderen äußert sich das Auftreten der für die Tumorgenese notwendigen Tumorstammzellen – in einem *in-vitro*-Modell – durch das Ablösen von vitalen sphäroiden Zellen aus dem Zellverband (Nath und Devi 2016, Allegra et al. 2014).

All die beschriebenen Kriterien wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels verschiedener Methoden überprüft. Änderungen in der Proliferationskinetik konnten durch die Zeitintervalle zwischen den Passagierungen registriert werden. Morphologische Alterationen sowie das Auftreten von Sphäroiden wurden mikroskopisch nachgewiesen. Aber insbesondere die morphologischen Änderungen in Bezug auf die EMT wurden durch die Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener Targets auf Proteinebene detektiert.

Gegenstand der Untersuchung sollte dabei die ionisierende Strahlung sein: Bisher wird die ionisierende Strahlung in Zusammenhang mit Meningeomen und anderen Tumormanifestationen auch als adjuvantes Therapeutikum eingesetzt, das zur Kontrolle eines verbleibenden Tumorumfanges oder zur Rezidivprophylaxe eingesetzt wird (Hall et al. 2021). Andererseits wurde im Rahmen von einigen retrospektiven, klinischen Studien nachgewiesen, dass ionisierende Strahlung auch im therapeutischen Kontext Neoplasien induzierte (Co et al. 2019). Ionisierende Strahlung als Risikofaktor für die Entwicklung von Meningeomen gilt so als belegt (Umansky et al. 2008). Die molekularbiologischen Mechanismen, die dabei im Hintergrund ablaufen, sind jedoch noch weitestgehend unerforscht.

Ein Teilziel dieser Arbeit ist so auch die Untersuchung des Einflusses der ionisierenden Strahlung auf Proliferation und Morphologie der Zellkulturen in Abhängigkeit von der applizierten Strahlendosis.

### **8.1 DURA MATER-ZELLEN ENTWICKELN NACH BESTRAHLUNG EINE MENINGEOM-ÄHNLICHES EXPRESSIONSPROFIL**

Aus zahlreichen klinischen Berichten gilt die ionisierende Strahlung als gesicherter Risikofaktor für die Entwicklung von Meningeomen (Umansky et al. 2008). So weisen u.a. Menschen, die in ihrer Kindheit eine kranielle Bestrahlung aufgrund einer Leukämie-Erkrankung erhalten haben, ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Meningeomen auf (Co et al. 2019, Grubelnik et al. 2020b).

Auch wenn aufgrund dieser zahlreichen Beobachtungen keinerlei Diskussionsbedarf zur Assoziation zwischen ionisierender Strahlung und der Meningeom-Tumorgenese besteht, so sind dennoch die zellulären und molekularbiologischen Prozesse im Hintergrund weiter unklar.

In den vergangenen Jahren und Jahrzehnten hat, unabhängig von den Meningeomen, ein Paradigmenwechsel eingesetzt: Zwei zunehmend immer enger miteinander verknüpfte Theorien versuchen die Entstehung, Entwicklung, Malignisierung und Metastasierung von kanzerösen Erkrankungen zu ergründen.

Da wäre zum einen die Tumorstammzellhypothese: Diese geht von der Existenz von pluripotenten Tumorstammzellen in einer heterogenen Tumormasse aus. Diese pluripotenten Tumorstammzellen besitzen dabei die typischen Stammzeleigenschaften, u.a. Selbsterneuerung, Ausbildung eines sphäroiden Phänotyps, Differenzierung, und werden für Invasivität und Metastasierung von Tumoren verantwortlich gemacht. Während in gewöhnlichen somatischen Zellen keine relevante NANOG-Expression vorliegt, zeigen die Tumorstammzellen eine Überexpression des Transkriptionsfaktor NANOG und seiner Regulatoren, die wiederum verantwortlich sind für die Induktion und den Erhalt der Stammzeleigenschaften (Plaks et al. 2015, Gong et al.

2015, Vlashi und Pajonk 2015, Bradshaw et al. 2016). Eine verstärkte oder verminderte Ausbildung von Tumorstammzellen geht also mit einer veränderten Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern einher.

Zum anderen spielt auch die *epithelial-to-mesenchymal transition* (EMT) eine gewichtige Rolle bei der Tumorgenese: Die EMT beschreibt den Verlust von Zell-Zellkontakten und eines epithelialen Phänotyps und die Umwandlung des betroffenen Gewebes zu einem mesenchymalen Phänotyp. Dies fördert in einigen, epithelial geprägten Tumorentitäten den Tumorprogress und die Metastasierung. *NANOG* ist auch in der EMT eines der Schlüsselgene und stellt somit ein Bindeglied zwischen Tumorstammzellhypothese und EMT dar (Liu et al. 2016). Charakteristisch für die EMT sind auch Änderungen im zellulären Proteinprofil, die auch das Zytoskelett betreffen und so erst die Zellmigration für die Tumorinvasivität und -metastasierung ermöglichen. Typisch für die EMT und den zunehmend mesenchymalen Gewebecharakter ist so u.a. eine Hochregulierung des Intermediärfilaments Vimentin (Danielsson et al. 2018).

Der Stammzellmarker *NANOG* und seine Regulatoren, u.a. *SOX2* und *OCT4*, werden gewöhnlich in regulären somatischen Zellen in keinem relevanten Ausmaß exprimiert und lassen sich nur an wenigen Gewebetypen des Adulten nachweisen, z.B. Epithel der Mundschleimhaut oder im Testikelparenchym (Swain et al. 2020, Grubelnik et al. 2020b).

Die Analyse der mRNA-Expression zielte letzten Endes auf den Nachweis von strahlen- und dosisabhängigen Alterationen im Expressionsprofil der behandelten Zellen ab. So sollte die Induktion von stammzellähnlichen Zellen bzw. von potentiellen Tumorstammzellen in Kulturen der Dura mater durch ionisierende Strahlung bewiesen werden.

Dabei zeigte sich direkt zu Beginn ein konträres Bild: Während eine Radiatio mit 1 Gy eher zu Steigerung der Expression von *NANOG1* und seiner Regulatoren *SOX2*, *OCT4*, *KLF4* und *MYC* führte, wurde im Falle der 2 Gy-Radiatio eher eine verminderte Expression von *NANOG1*, *SOX2* und *OCT4* nachgewiesen.

Entsprechend der Tumorstammzellhypothese sind die Tumorstammzellen ein Bestandteil der heterogenen Tumormasse und besitzen ähnliche Eigenschaften wie embryonale Stammzellen, wie z.B. Pluripotenz und Selbsterneuerung aber eben auch Resistenzen gegen Chemotherapeutika. Typische Marker für die Tumorstammzellen sind dabei u.a. *KLF4*, *SOX2*, *OCT4*, *NANOG* und – abhängig von der Tumorentität – auch *CD44*. Die Ausbildung der Tumorstammzellen geht in zahlreichen Tumorentitäten mit einer Überexpression einiger Marker, u.a. *NANOG* und *SOX2*, einher. Die Tumorstammzellen sind dabei verantwortlich für die Tumorgenese und spätere Metastasierung (Najafzadeh et al. 2021, Vasefifar et al. 2022). Da die Strahlendosis die einzige Variable in diesem Versuchsaufbau darstellte, kann davon ausgegangen werden, dass die in den Dura mater-Kulturen beobachtete Überexpression von *NANOG1*, *SOX2* und *OCT4* in Folge der 1 Gy-Bestrahlung auftrat. Diese Überexpression spricht

wiederum – zumindest auf mRNA-Ebene – für die Entstehung von potentiell pluripotenten Zellen bzw. Tumorstammzellen. In Konsequenz entsteht also das Bild, dass eine 1 Gy Bestrahlung potentielle Tumorstammzellen induziert und so die Entwicklung von Neoplasien in der Dura mater fördert.

Auffällig ist jedoch die Mindereexpression der Transkriptionsfaktoren NANOG, SOX2 und OCT4 nach einer 2 Gy-Intervention. Diese Ergebnisse sind eher kritisch zu werten, da sowohl die nächst kleinere getestete Dosis (1 Gy) als auch die nächst höhere getestete Dosis (4 Gy) jeweils zu einer verstärkten Expression dieser Transkriptionsfaktoren führt. Es ist auch zweifelhaft, ob die abgeschwächte Genexpression auf eine Hemmung der Proliferation zurückzuführen ist, da die statistische Analyse keinen relevanten Unterschied zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe ergab.

Relativ eindeutig gestaltet sich das Bild im Falle der mit 4 Gy behandelten Kulturen: Auch hier ließ sich durchgehend eine verstärkte Expression von *NANOG1* sowie seiner Regulatoren *SOX2*, *OCT4*, *MYC* und *KLF4* beobachten. Spannend bei den 4 Gy-Kulturen ist auch die verstärkte *CD44*-Expression: *CD44* ist ein Oberflächenprotein, dessen Überexpression in zahlreichen malignen Tumorentitäten bereits nachgewiesen wurde und eng verknüpft ist mit dem Nachweis von Tumorstammzellen und der EMT und den damit assoziierten Prozessen der Migration, Invasion und Metastasierung (Hassn Mesrati et al. 2021). Eine durch 4 Gy induzierte Überexpression von *CD44* ist also durchaus vereinbar mit einem pathologischen Prozess im Sinne einer Meningeomentstehung. In Bezug auf die verbleibenden Transkriptionsfaktoren folgt die Interpretation der gleichen Argumentation der 1 Gy-Kulturen: Eine Überexpression von *NANOG1*, *SOX2*, *OCT4* und *KLF4* spricht für die Entstehung von potentiellen Tumorstammzellen und so für eine pathologische Neoplasie in der Dura mater (Najafzadeh et al. 2021, Vasefifar et al. 2022).

Aufgrund von zahlreichen klinischen Studien gilt die ionisierende Strahlung im klinischen Kontext bereits als gesicherter Risikofaktor für die Entstehung von Meningeomen (Umansky et al. 2008). Wie sich an der qPCR-Analyse zeigte, schaffte eine Bestrahlung mit 1 Gy oder 4 Gy zumindest auf mRNA-Ebene bereits die Grundlagen zur Tumorentstehung in Form einer *NANOG1*-Überexpression und einer Induktion von potentiellen Tumorstammzellen. Es stellt sich somit die Frage, inwiefern sich die Beobachtungen der strahleninduzierten Veränderungen in der Genexpression sich auch in der Proteinsynthese niederschlagen.

Wichtige Antigene bei der Beurteilung einer potentiell strahleninduzierten Tumorgenese von Meningeomen sind natürlich die immunhistochemischen Marker Vimentin, EMA und Nestin. Insbesondere Vimentin und EMA gelten in die Histopathologie als relevante Faktoren in der Meningeomdiagnostik (WHO Classification of Tumours Editorial Board 2021). Dabei ist jedoch zu beachten, dass Vimentin auch der Dura mater exprimiert und wird und so auch bei der *in-vitro*-

Identifizierung derselbigen herangezogen wird (Goldschmidt et al. 2013). Es muss also von einer Basisexpression von Vimentin in der Kontrollgruppe ausgegangen werden. Nestin dagegen wird auch in epithelialen, mesenchymalen und neuroektodermal-neuroepithelialen Tumoren exprimiert und gilt in seiner Ko-Expression als Marker für neuronale Stamm- und Progenitorzellen bzw. Tumorstammzellen (Shivapathasundram et al. 2018, Neradil und Veselska 2015).

Die übrigen getesteten Zielstrukturen sind die Stammzellmarker NANOG, SOX2, OCT4 und CD44, die bereits Zielgruppe in der qPCR-Analyse waren. Im Rahmen der Immunfluoreszenz soll untersucht werden, in welchem Ausmaß die Transkription auf die Translation dieser Targets transferiert wird.

Auffällig in Bezug auf die Tumormarker ist, dass im Bereich von 1 Gy bis 4 Gy keine relevante Abweichung zur Kontrollgruppe in der Vimentin-Expression nachweisbar war. Es zeigte sich lediglich eine Undulation um den Wert der nicht bestrahlten Kulturen: Während sich für 1 Gy und 4 Gy eher eine verminderte Vimentin-Expression nachweisen ließ, stieg diese nach einer 2 Gy-Radiatio. Dies widerspricht den Erkenntnissen aus der qPCR-Analyse: Diese legen nämlich aufgrund der gesteigerten Expression von *NANOG1*, *SOX2* und *OCT4* – insbesondere nach 1 Gy und 4 Gy – die Bildung von Tumorstammzellen und somit die Induktion eines pathologischen Prozesses im Sinne einer meningealen Neoplasie nahe (Najafzadeh et al. 2021, Vasefifar et al. 2022). Folgerichtig sollte aufgrund der Verwebung zwischen EMT und Stammzellmarkern – insbesondere NANOG und SOX2 – mit einer Zunahme der Vimentin-Expression zu rechnen sein (Migita et al. 2017).

Die Bewertung von EMA und Nestin ist schlüssiger: In beiden Fällen zeigte sich eine Zunahme der Expression im Bereich von 1 Gy bis 4 Gy im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für EMA ist dabei beschrieben, dass es ein möglicher Induktor der EMT ist und gleichzeitig in Tumorstammzellen verschiedener Entitäten, u.a. Pankreaskarzinom und akute myeloische Leukämie, überexprimiert wird. Seine Überexpression nach Bestrahlung spricht somit klar für die Entstehung von potentiellen Tumorstammzellen und für eine meningeale Tumorgenese bedingt durch die EMT (Nath und Mukherjee 2014). Gleichzeitig wird EMA in Verbindung mit Vimentin regelhaft in der histopathologischen Diagnostik zur Identifizierung von Meningeomen eingesetzt (WHO Classification of Tumours Editorial Board 2021). Aber auch Nestin konnte anhand verschiedener neurogener, wie z.B. Medulloblastome und Astrozytome, und mesenchymaler Tumore als Marker für Tumorstammzellen bestätigt werden (Neradil und Veselska 2015). Eine übermäßige Expression von Nestin, wie man sie nach der Radiatio beobachten konnte, ist also durchaus vereinbar mit der vermehrten Ausbildung von potentiellen Tumorstammzellen. Auch wenn zusammenfassend die Überexpression von Vimentin als bedeutender Hinweis für eine beginnende EMT und somit für eine strahleninduzierte Meningeomentwicklung aus der Dura mater fehlt, so

ist die postinterventionell verstärkte Ausprägung von EMA und Nestin ein klares Indiz für eine strahlenabhängige meningeale Tumorgenese.

Bei den Stammzellmarkern NANOG, SOX2 und OCT4 ist beachtenswert, dass bereits die Kontrollgruppe eine Basisexpression derselbigen zeigt. Gewöhnlich wird NANOG im adulten Menschen nicht bzw. nur in ausgewählten Gewebetypen exprimiert (Grubelnik et al. 2020b). Allerdings werden die primären Meningen sowohl aus mesodermalen bzw. mesenchymalen als auch aus ektodermalen Zellen gebildet (Adeeb et al. 2012). Somit stehen die Meningen in enger Assoziation zu mesenchymalen Stammzellen bzw. Progenitorzellen, die ebenfalls die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Ausdifferenzierung besitzen und konsekutiv zu mesodermalen bzw. mesenchymalen Zellen differenzieren können (Ding et al. 2011). Gleichzeitig wurde für diese proliferativen mesenchymalen Progenitorzellen bereits eine Expression von Nanog und vom murinen OCT4 (Oct4) bestätigt (Tsai et al. 2012). Zwischenzeitlich konnten mesenchymale Progenitorzellen auch in spinalem epiduralen Fettgewebe und der dazugehörigen Dura mater nachgewiesen werden. Es wird davon ausgegangen, dass diese Progenitorzellen eine tragende Rolle beim Wachstum oder bei der Ausheilung von meningealen Verletzungen spielen (Shah et al. 2022).

In den Interventionsgruppen der Dura mater bis 2 Gy ergibt sich dagegen kein eindeutiges Bild: Auch hier unduliert die Expression von NANOG, SOX2 und OCT4 um das Niveau der Kontrollgruppe, ohne dass sich dabei relevante Expressionsänderungen ergeben. Die Ergebnisse der mRNA-Analyse lassen sich zumindest hier nicht auf Proteinebene bestätigen. Zumindest für CD44 konnte nach einer 1 Gy-Radiatio eine mögliche strahleninduzierte Alteration beobachtet werden: Auch wenn bereits Fibroblasten regulär CD44 exprimieren, zeigte sich nach einer 1 Gy-Radiatio eher eine Zunahme der CD44-Expression. Zellen mit einer solchen CD44-Überexpression sind dabei eng assoziiert mit pathologischen Prozessen, u.a. der EMT, Invasivität und Metastasierung (Hassn Mesrati et al. 2021). Eine verstärkte Expression von CD44 in den bestrahlten Kulturen kann also auch als ein Indiz für eine beginnende Tumorgenese gedeutet werden. Eine Ausnahme bildeten jedoch die mit 4 Gy bestrahlten Kulturen der Dura mater: Hier ließen sich die Ergebnisse der qPCR-Analyse tatsächlich auch auf Proteinebene teils reproduzieren. Wie bei der mRNA-Expression zeigte sich in der Immunfluoreszenz am ehesten (a.e.) eine Zunahme von NANOG und CD44 nach Bestrahlung. Zwar nahmen SOX2 und OCT4 in ihrer Ausprägung deskriptiv eher ab. Einerseits zeigte sich keine relevante Differenz zur Kontrollgruppe. Andererseits blieb eine Basisexpression für beide Transkriptionsmarker vorhanden. Insgesamt kam es also im Rahmen einer 4 Gy-Bestrahlung in den Kulturen der Dura mater zu einer Zunahme von NANOG und CD44 bei erhaltenem Expressionsniveau von SOX2 und OCT4. Wie bereits beschrieben spricht eine verstärkte Expression für eine beginnende Tumorgenese im

Sinne einer EMT und der Ausbildung von Tumorstammzellen (Hassn Mesrati et al. 2021). NANOG ist ein weiterer wichtiger Marker für Tumorstammzellen neben CD44 und ist ebenfalls eng mit dem Prozess der EMT verknüpft. Eine Überexpression von NANOG bei gleichzeitiger Überexpression von CD44 ist so ein gewichtiges Indiz für einen strahleninduzierten pathologischen Prozess, der zur Tumorentwicklung und Ausbildung von Tumorstammzellen führen kann (Vasefifar et al. 2022).

Da bei der Analyse der Strahleneffekte sich zu Beginn die Frage stellt, wie weit sich die Änderungen in der mRNA-Expression sich auf der Proteinebene niederschlagen, so stellt sich konsequent auch die Frage, inwiefern sich die Alterationen in der Proteinexpression sich auch in morphologischen Änderungen widerspiegeln. Dabei müssen insbesondere zwei Aspekte berücksichtigt werden: Zum einen der zelluläre Phänotyp mit Ausbildung von vitalen Sphäroiden. Zum anderen die Proliferationskinetik der Zellkulturen und in diesem Zusammenhang die Ausprägung von Ki-67.

Ki-67 gewinnt in der Meningeomdiagnostik zunehmend an Bedeutung: Entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation kann Ki-67 als Proliferationsindex bei Meningeomen eingesetzt werden und kann sowohl während der Interphase als auch der Mitose zellulär nachgewiesen werden (WHO Classification of Tumours Editorial Board 2021, Sun und Kaufman 2018). Ki-67 wird somit von proliferierenden Zellen exprimiert und kann so auch als Marker für Tumorverhalten bzw. -aggressivität genutzt werden (Mirian et al. 2021). Allerdings liegt mit der Dura mater zunächst noch ein nicht-pathologisches Gewebe vor. Von Relevanz ist daher in diesem Zusammenhang, dass für andere maligne Tumorerkrankungen, u.a. Mammakarzinome und nichtkleinzellige Lungenkarzinome, bereits eine enge Assoziation bzw. positive Korrelation zwischen der Ki-67-Expression und dem Prozess der EMT beschrieben wurde (Lakhtakia et al. 2017, Peng et al. 2020).

Die Ausbildung eines sphäroiden Phänotyps gehört zu den Eigenschaften von Tumorstammzellen und wurde auch für Meningeome beschrieben (Hueng et al. 2011, Nath und Devi 2016, Allegra et al. 2014).

Vor diesem Hintergrund ist zu diskutieren, welchen Einfluss ionisierende Strahlung auf die Ausbildung von Sphäroiden und auf die Ki-67-Expression nimmt. Dabei ist berücksichtigen, dass ionisierende Strahlung bereits als Risikofaktor bei Entwicklung von Tumorstammzellen und bei der Induktion der EMT bekannt ist (Lee et al. 2017b).

In der Proliferationskinetik ließen sich im Bereich von 1 Gy bis 4 Gy statistisch keine relevanten Änderungen in der Kinetik im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Tatsächlich zeigte sich nach einer 4 Gy-Bestrahlung streckenweise sogar a.e. noch ein wachstumshemmender Effekt. Dies steht im Widerspruch zu der Annahme, dass die Tumorgenese mit einer induzierten EMT und so mit einem erhöhten Ki-67-Proliferationsindex einhergehen müsste (Mirian et al. 2021,

Lakhtakia et al. 2017). Allerdings zeigte sich in demselben Dosisbereich – insbesondere für 1 Gy und 4 Gy – tatsächlich eine Steigerung der Ki-67-Expression in den Immunfluoreszenzfärbungen. Zumindest dies spricht also für die Induktion von Tumorstammzellen und der EMT.

Auch die Bewertung der vitalen sphäroiden Zellen ist nicht vollkommen schlüssig. Das Auftreten von Sphäroiden in der unbehandelten Kontrollgruppe kann durchaus durch die Basisexpression von NANOG erklärt werden. Im Widerspruch zu den Ergebnissen der mRNA- und Proteinexpression stehen insbesondere die 1 Gy- und 2 Gy-Kulturen: Für 1 Gy zeigte sich auf mRNA-Ebene eine verstärkte Expression der Stammzellmarker NANOG1, SOX2 und OCT4. Dies ist konträr zum verspäteten Auftreten der Sphäroide bzw. potentiellen Tumorstammzellen in den 1 Gy-Kulturen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings zeigte sich auch auf Proteinebene eine vergleichsweise niedrigere Expression von NANOG und OCT4, was wiederum schlüssig zum zeitlichen Auftreten der potentiellen Tumorstammzellen ist.

Bei den 2 Gy-Kulturen verhält es sich umgekehrt: Hier zeigte sich eher eine Abnahme der Expression der Stammzellmarker *NANOG1* und *CD44*. Im Gegensatz dazu steht das frühere Auftreten der sphäroiden, potentiellen Tumorstammzellen in Relation zur Kontrollgruppe. Aber auch dies ist auf Proteinebene nicht reproduzierbar: Hier wurde keine wirkliche Alteration in der Expression von NANOG und SOX2 nachgewiesen, während sich für CD44 sogar eher eine verminderte Ausprägung zeigte.

Schlüssig war in diesem Kontext lediglich das Verhalten der 4 Gy-Kulturen: Im Vergleich zu den 1 Gy- und 2 Gy-Kulturen bzw. zur Kontrollgruppe traten hier die potentiellen Tumorstammzellen in Form des sphäroiden Phänotyps am frühesten auf. Dies ist ableitbar sowohl durch auf mRNA-Ebene durch die vermehrte Expression von *NANOG1*, *OCT4* und *CD44*, als auch auf Proteinebene durch die verstärkte Synthese von NANOG, CD44 und Ki-67.

Insgesamt liefern die Analysen der Genexpression, Proliferation und des zellulären Phänotyps zahlreiche Indizien zur Bestätigung der Fähigkeit der ionisierenden Strahlung zur dosisabhängigen Tumorgenese in Gewebe der Dura mater, besonders nach Bestrahlung im Niedrigdosisbereich.

## **8.2 STRAHLENINDUZIERTER MALIGNISIERUNG DER MENINGEOME**

Ionisierende Strahlung gilt allein aus dem klinischen Kontext heraus als gesicherter Risikofaktor bei der Entstehung von Meningeomen auch als sekundäre Neoplasie u.a. nach therapeutischer Bestrahlung von Malignomen mit kranialer Manifestation (Morgenstern et al. 2016). Ionisierende Strahlung wird aber auch als adjuvantes Therapeutikum insbesondere bei WHO<sup>°</sup>III-Meningeomen eingesetzt. Dabei wird häufig eine Gesamtdosis von 54 – 60 Gy mit täglichen Fraktionen über einen Zeitraum von 5 – 6 Wochen aufgewandt. Damit kann bei primären Meningeomen eine signifikante Verbesserung des Progress-freien Überlebens erreicht werden (Maggio et al. 2021). Auf zellulärer bzw. molekularer Ebene führt die Bestrahlung über die Ausbildung von

reaktiven Sauerstoff-Radikalen zur Zerstörung des Genoms, wie z.B. durch DNA-Doppelstrang-Brüche (Lee et al. 2017b). Ionisierende Strahlung ist also Risikofaktor und – bei ausreichender Gesamtdosis – adjuvantes Therapeutikum gleichzeitig. Fraglich sind jedoch die Auswirkung von ionisierender Strahlung im diagnostischen oder artifiziellen Kontext auf bereits existierende Meningeome: Kann ionisierende Strahlung im in-vitro-Modell dieser Arbeit eine Malignisierung der Meningeom-Kulturen induzieren?

Die aktuelle WHO-Klassifikation zu Tumoren des Zentralen Nervensystems berücksichtigt bei der histopathologischen Einordnung der Meningeome hinsichtlich ihrer Malignität mehrere Kriterien: Invasivität, morphologische Subtypen, Zelldichte, Genmutationen, etc. Insbesondere der Mitosezahl kommt als Indikator der Gewebeproliferation eine tragende Rolle zu. So spricht eine erhöhte Mitosezahl für eine verstärkte Proliferation und höhere Malignität. Der immunhistochemische Nachweis von Ki-67 kann bei der Beurteilung der Mitosezahl helfen und kann so als Proliferationsindex herangezogen werden (WHO Classification of Tumours Editorial Board 2021). Gleichzeitig wurde bereits eine positive Korrelation zwischen dem WHO-Grad der Meningeome und der Ki-67-Expression beobachtet (Mostafa und Khairy 2017).

Allerdings kann die Dynamik der Malignität von Meningeomen außerhalb der WHO-Klassifikation auch anhand von weiteren immunhistochemischen und molekularbiologischen Markern bestimmt beurteilt werden:

So konnte für die Meningeome bereits eine positive Korrelation zwischen dem WHO-Grad – als Maß für die Malignität – und der Expression von *NANOG* nachgewiesen werden – einem zentralen Marker für potentielle Tumorstammzellen (Freitag et al. 2017). Aber auch für das murine *SOX2* (*Sox2*) als *NANOG*-Regulator und für Nestin wurde bereits jeweils eine positive Korrelation zum WHO-Grad nachgewiesen (Xiao et al. 2018). Für den Stammzell- und Differenzierungsmarker *CD44* wurde ebenso eine positive Korrelation mit dem Proliferationsindex Ki-67 nachgewiesen. Gleichzeitig zeigten WHO<sup>°II</sup>- und WHO<sup>°III</sup>-Meningeome eine signifikant erhöhte Expression von *CD44*, so dass *CD44* als Marker für die Aggressivität von Meningeomen genutzt werden kann (Mostafa und Khairy 2017). Aber anhand der Marker der EMT lässt sich das Verhalten der Meningeome einschätzen: Ein Rückgang der EMA-Expression spricht für einen weiteren Verlust des epithelialen Charakters des Gewebes und ist vereinbar mit einer Zunahme des WHO-Grades und so der Aggressivität der Meningeome (Ikeda und Yoshimoto 2003).

Ausgangspunkt für die Frage, ob ionisierende Strahlung eine Malignisierung von Meningeomen induzieren kann, soll die Untersuchung der Marker, die in Zusammenhang mit dem WHO-Grad stehen, und ihre potentiell strahlenabhängige Expression zunächst auf mRNA-Ebene sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten im Dosisbereich von 1 Gy bis 4 Gy eine verstärkte Expression für *NANOG1* und *SOX2*. Allein diese registrierte Überexpression dieser beiden Stammzellmarker spricht für eine vermehrte Expression von potentiellen Tumorstammzellen und für eine

konsekutive Malignisierung (Freitag et al. 2017, Xiao et al. 2018). Konträr hierzu erscheint allerdings, dass es in Teilen in demselben Dosisbereich eher zu einer Abnahme der *OCT4*-Expression kommt. Zwar kann *OCT4* so als „rheostatischer“ Regulator interpretiert werden, dass der Differenzierungsgrad einer Zelle abhängig vom Expressionslevel von *OCT4* und *SOX2* ist. Allerdings spricht der Verlust von *OCT4* eher für eine Ausdifferenzierung und ebenso für einen Verlust der Pluripotenz (Zeineddine et al. 2014).

In Bezug auf die *CD44*-Expression lässt sich der Dosisbereich von 1 Gy bis 4 Gy nur schwer vereinheitlichen: Während es nach 2 Gy eher zu einer Abnahme kommt, beschreiben die 4 Gy-Kulturen eher eine Zunahme. Eine Dosis von 1 Gy scheint die *CD44*-Expression gänzlich nicht zu beeinflussen.

Diese Beobachtung stützt allerdings auch die Sonderrolle, die die Strahlendosis von 4 Gy einnimmt: Zum einen fehlte hier die widersprechende Position der niedrigeren *OCT4*-Expression. Zum anderen fiel die Expression von *NANOG1* und *SOX2* so hoch aus, dass diese Kulturen sich nicht nur von der Kontrollgruppe, sondern auch von den 1 Gy- und 2 Gy-Kulturen abgrenzen lassen. Gleichzeitig nahm hier auch erstmals die *CD44*-Expression zu. Die vermehrte Ausprägung dieses Stammzell- und Differenzierungsmarkers spricht ebenfalls für eine Malignisierung im Sinne einer Zunahme des WHO-Grades (Mostafa und Khairy 2017).

Widersinnig erscheint nur nochmals die Expression der weiteren an der Regulation von *NANOG* und der Stammzeleigenschaften beteiligten Gene *KLF4* und *MYC*: Im gesamten Dosisbereich von 1 Gy bis 4 Gy ließ sich eher eine vermehrte Ausprägung beider Gene beobachten. Die Rolle von *KLF4* lässt sich dabei verschieden interpretieren: Einerseits wurde *KLF4* in anaplastischen Meningeomen als potentiell Tumorsuppressorgen identifiziert, das die Proliferation und Invasivität dieser Meningeome hemmt (Tang et al. 2017). Andererseits ist *KLF4* auch als bifunktionaler Transkriptionsfaktor bekannt, der – abhängig von Tumorentität und Tumorstammzelle – durchaus auch onkogene Effekte ausüben kann (Yang et al. 2020). *MYC* dagegen ist als ein Onkogen bekannt, das im Falle einer Überexpression zu Krebserkrankungen beiträgt und in Tumorstammzellen das Profil von embryonalen Stammzellen und so auch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung induzieren kann. Es ist also eng assoziiert mit anderen für Stammzeleigenschaften relevanten Genen, u.a. *Nanog*, *Sox2* und *Oct4* (Das et al. 2019). Die in dieser Arbeit beobachtete Überexpression von *MYC* ist also durchaus vereinbar mit der verstärkten Induktion von Stammzellen und so auch mit einer Malignisierung eines Tumors.

Anhand des mRNA-Profiles lässt sich zusammenfassend sagen, dass eine unfractionierte Bestrahlung von 1 Gy bis 4 Gy sehr wohl Einfluss auf die Malignität von Meningeomen hat: Zwar spricht die reduzierte Expression von *OCT4* und *KLF4* eher gegen die vermehrte Induktion von Tumorstammzellen. Andererseits ist die vermehrte Expression der Stammzellmarker *NANOG1*

und SOX2 ein klares Indiz für die verstärkte Ausprägung von Stammzeleigenschaften. Insbesondere die 4 Gy-Dosis scheint zu einer Malignisierung von Meningeomen beizutragen: Die verstärkte Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker ist vereinbar mit einem höheren WHO-Grad und einer verstärkten Expression von Zellen mit Stammzeleigenschaften (Freitag et al. 2017, Mostafa und Khairy 2017). Unter der Voraussetzung, dass Tumorstammzellen für die Malignität und Invasivität und so auch für die Metastasierung von Tumoren verantwortlich sind, spricht diese strahleninduzierte Änderung im mRNA-Profil klar für eine strahlen- und dosisabhängige Malignisierung der Meningeomzellkulturen (Lee et al. 2017b).

Im Vordergrund steht natürlich die Frage, welchen Einfluss die unfraktionierte Bestrahlung auf die Genexpression der Meningeome zunächst auf mRNA-Ebene hat. Diese Frage lässt sich eindeutig beantworten: Im gesamten Dosisbereich von 1 Gy bis 4 Gy konnte nach der Bestrahlung eine verstärkte Expression der Stammzellmarker *NANOG1* und *SOX2*. Auch der andere *NANOG*-Regulator *OCT4* wurde bei 2 Gy vermehrt transkribiert. Auch die weiteren regulierenden Gene *MYC* und *KLF4* zeigten durchgängig nach einer Radiatio mit 1 Gy bis 4 Gy eine verstärkte Expression. *NANOGP8* nahm in seiner Expression nach Bestrahlung dagegen eher ab. Die Kulturen der 4 Gy-Interventionsgruppe nahmen in zweierlei Hinsicht eine Sonderstellung ein: Zum einen zeigte hier der andere Stammzellmarker auch erstmals eine statistisch relative Expressionszunahme. Zum anderen grenzt sich die Dosis von 4 Gy insofern von den niedrigeren Strahlendosen ab, dass nach einer Bestrahlung mit 4 Gy die Transkription der *NANOG1*- und *SOX2*-mRNA nicht nur im Vergleich zur Kontrollgruppe, sondern auch in Relation zu den 1 Gy- und 2 Gy-Kulturen zusätzlich verstärkt ist.

Insgesamt lassen diese deskriptiven und statistischen Ergebnisse nur wenig Spielraum zu Interpretation im Sinne der Arbeitshypothese: Einerseits führt eine unfraktionierte Bestrahlung mit 1 Gy bis 4 Gy zu einer verstärkten Transkription der Stammzellmarker *NANOG1* und *CD44* und der *NANOG*-regulierenden und somit für die Induktion und Erhaltung von Stammzeleigenschaften relevanten Gene. Zum anderen bestätigen die 4 Gy-Meningeome ihre Sonderrolle, dass hier die Expression der Stammzellmarker zusätzlich stimuliert ist.

Ausgehend vom mRNA-Profil der Meningeomzellkulturen stellt sich konsequent die Frage, inwiefern die Proteinexpression eine mögliche Malignisierung widerspiegelt.

Diffizil gestaltet sich die Interpretation der diagnostischen Tumormarker im Dosisbereich von 1 Gy bis 4 Gy: Insbesondere Vimentin und EMA, aber auch Nestin können auch im klinischen Alltag als Marker für die Meningeomdiagnostik herangezogen werden. In diesem Versuchsaufbau lässt sich für die Meningeome *in vitro* tatsächlich eher eine Abnahme für Nestin und EMA nach Bestrahlung beobachten. Vimentin wird dagegen durchgehend bis einschließlich der 12 Gy-Kulturen exprimiert. Problematisch sind hier jedoch die 4 Gy-Kulturen: Hier kommt es

nach der Radiatio zu einer verminderten Abnahme der Vimentin-Expression. Eine Basisexpression bleibt jedoch weiter vorhanden.

Grundsätzlich spricht die nach – oder trotz – Bestrahlung weiterhin bestehende Expression von Vimentin, EMA und Nestin entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation zunächst einmal weiterhin für einen pathologischen Prozess. Entsprechend den diagnostischen Kriterien liegen also weiterhin Meningeome vor (WHO Classification of Tumours Editorial Board 2021). Problematischer ist jedoch die Interpretation der Expressionsdynamik der einzelnen Marker: Deskriptiv zeigt sich für Nestin ausgehend von der Kontrollgruppe mit zunehmender Dosis bis 8 Gy eine Expressionsabnahme. Tatsächlich wurde bereits bei Meningeomen eine positive Korrelation zwischen der Nestin-Expression und dem WHO-Grad beschrieben, so dass die in dieser Arbeit beobachtete Nestin-Suppression eher gegen Malignisierung durch Bestrahlung spricht (Xiao et al. 2018). Andererseits lässt sich parallel auch eine Abnahme der EMA-Expression beobachten: Dies spricht für einen weiteren Verlust des epithelialen Charakters und für eine Zunahme des WHO-Grades der behandelten Meningeome (Ikeda und Yoshimoto 2003). Fraglich ist die Bedeutung des Vimentin-Abfalls nach einer 4 Gy-Bestrahlung: Vimentin ist ein klassischer Marker für den Prozess der EMT – ein Schlüsselmechanismus für die Metastasierung von Karzinomen. Dabei nimmt Vimentin über die Regulation von Keratinen Einfluss auf die Dedifferenzierung von epithelialen Zellen. Eine Zunahme der Vimentin-Expression spricht so für eine verstärkte Dedifferenzierung der Zellen und so über eine induzierte EMT für eine Malignisierung (Danielsson et al. 2018, Dmello et al. 2017). Führt also, wie in dieser Arbeit beobachtet, eine Bestrahlung mit 4 Gy zu einer Abnahme der Vimentin-Expression, so widerspricht dies zunächst der Annahme, dass diese Strahlendosis auch zu einer Malignisierung von Meningeomen führen kann. Andererseits muss berücksichtigt werden, dass Meningeome sowohl epitheliale als auch mesenchymale Eigenschaften in sich vereinen können (Mawrin und Perry 2010). Es besteht also zumindest die theoretische Möglichkeit, dass eine unfraktionierte Dosis von 4 Gy nicht die *epithelial-to-mesenchymal transition*, sondern die *mesenchymal-to-epithelial transition* als entsprechendes Gegenstück anstößt, die ebenfalls dazu befähigt ist pluripotente Stammzellen zu induzieren und mit einer verminderten Vimentin-Expression einhergeht (Hoffding und Hyttel 2015).

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen der Stammzell- und Differenzierungsmarker gestaltet sich eindeutiger: Lediglich nach einer 1 Gy-Bestrahlung konnte eine eher verminderte Expression von CD44 beobachtet werden. Aufgrund der positiven Korrelation zwischen CD44-Expression und WHO-Grad der Meningeome widerspricht dies tatsächlich eher einer Malignisierung der Meningeome (Mostafa und Khairy 2017). Diese Beobachtung wird jedoch durch weitere Aspekte wiederum relativiert: Eine Bestrahlung mit einer ähnlichen Dosis – 2 Gy und 4 Gy – führte zu keiner statistisch relevanten Beeinflussung der CD44-Expression. Dies spiegelt

sich auch darin wider, dass die CD44-Expression auch auf mRNA-Ebene durch eine 1 Gy-Radiation nicht relevant beeinflusst wurde.

In Bezug auf die verbleibenden Stammzellmarker lassen sich die Ergebnisse der mRNA-Analyse uneingeschränkt auf die Immunfluoreszenzfärbungen übertragen: Im gesamten Dosisbereich von 1 Gy bis 4 Gy ließ sich eine Zunahme der Expression von NANOG, SOX2 und OCT4 beobachten. So lässt sich die Argumentation hinsichtlich der mRNA-Analyse relativ simpel auch auf die Proteinexpression transferieren: Diese strahleninduzierten Veränderungen in der Expression der Stammzellmarker spricht für die verstärkte Induktion von Tumorstammzellen und für eine Malignisierung der Meningeome im Sinne einer Zunahme des WHO-Grades (Freitag et al. 2017, Xiao et al. 2018).

Letzten Endes stellt sich natürlich die Frage, ob die zahlreichen Indizien aus qPCR und Immunfluoreszenzfärbung, die für eine strahleninduzierte Malignisierung der Meningeome sprechen, sich auch im Phänotyp durchsetzen.

Zwar lösten sich in den unbestrahlten Kontrollgruppen genauso Zellen aus dem Zellverband wie in den mit 1 Gy bis 4 Gy bestrahlten Meningeomen. Allerdings konnten nur in den bestrahlten Kulturen vitale sphäroide Zellen nachgewiesen werden. Die Ausbildung eines sphäroiden Phänotyps wird zu den Stammzeleigenschaften gezählt und ist auch auf eine verstärkte Expression von Sox2 und Oct3/4 zurückzuführen. An einigen anderen Tumorentitäten wurde dieser Sachverhalt sogar in Folge einer Exposition zu ionisierender Strahlung beobachtet. Die verstärkte Ausbildung von vitalen sphäroiden Zellen in den Meningeomzellkulturen nach einer Intervention mit 1 Gy bis 4 Gy ist ein klares Indiz für die verstärkte Ausbildung von Tumorstammzellen und wird durch die in den mRNA-Analysen und Proteinfärbungen beschriebene Überexpression von NANOG, SOX2 und OCT4 zusätzlich gestützt (Allegra et al. 2014).

Auch die registrierte Proliferationskinetik spricht für das Einsetzen eines pathologischen Prozesses im Sinne eines beschleunigten Tumorwachstums nach Bestrahlung: Zwar ließen sich bei keiner der drei relevanten Dosisgruppen im Gesamtverlauf statistisch relevante Strahleneffekte auf die Proliferation nachweisen. Allerdings zeigten die Wachstumskurven der 1 Gy- und 4 Gy-Kulturen abschließende Intervalle mit der deutlichen Tendenz zur Wachstumsstimulation. Auch die 2 Gy-Kulturen erreichen zumindest deskriptiv ihren Endpunkt früher als die Kontrollgruppe. So liegt natürlich die Schlussfolgerung nahe, dass im mittel- bis langfristigen Verlauf eine unfraktionierte Bestrahlung von maximal 4 Gy zu einem beschleunigten Tumorwachstum führen kann. Diese Konsequenz wird zusätzlich durch die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen gestützt: Auch hier kann in den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbungen parallel zu den Proliferationskurven der 1 Gy- und 4 Gy-Kulturen zumindest eine deskriptive Zunahme des Proliferationsindex Ki-67 beobachtet werden. Diese potentiell beschleunigte Tumorwachstum im

Sinne einer Malignisierung wird zusätzlich durch frühere Beobachtungen einer positiven Korrelation zwischen der Ki-67-Expression und dem WHO-Grad von Meningeomen gestützt (Mostafa und Khairy 2017).

Zusammenfassend muss ionisierende Strahlung – zumindest in unfraktionierter Dosis – als Risikofaktor für die Malignisierung von Meningeomen betrachtet werden. Auch wenn dies hinsichtlich der Meningeommarker in der Immunfluoreszenzfärbung nicht vollständig ohne Widersprüche zu bestätigen ist, so sprechen sowohl die Stammzell- und Differenzierungsmarker auf mRNA- und Proteinebene als auch die Proliferationsanalyse klar für das Malignisierungspotential der ionisierenden Strahlung.

### **8.3 BEDEUTUNG DER INTERLEUKINE FÜR TUMORINDUKTION UND TUMORINDUKTION**

Die Interpretation der Rolle der Interleukine im Versuchsaufbau dieser Arbeit gestaltet sich aufgrund der divergierenden ELISA-Ergebnisse sowie in Folge des aktuellen Stands der Forschung komplex. Dies ist u.a. auch darauf zurückzuführen, dass die Interleukine – teils in Abhängigkeit von der Parenchymalität – ein gegenläufiges Verhalten aufweisen: Im Falle der Dura mater konnte für IL-6 nach einer 1 Gy- oder 2 Gy-Radiatio eher eine Zunahme, nach einer 4 Gy-Radiatio dagegen eher eine Abnahme der Sekretion beobachtet werden. Signifikant war keine dieser Beobachtungen. Bei den Meningeomen fiel diese Divergenz ähnlich aus: Eine Bestrahlung mit 1 Gy oder 2 Gy hatte statistisch keinen relevanten bzw. relativen Effekt auf die Sekretion von IL-6. Gleichzeitig führte eine Bestrahlung mit 4 Gy zu einem signifikanten Einbruch der IL-6-Produktion. Auch für IL-8 führte die Intervention zu konträren Ergebnissen: Eine Radiatio mit 1 Gy und 2 Gy bewirkte bei der Dura mater eine signifikante Hemmung der IL-8-Produktion. Bei den Meningeomen wurde dagegen in demselben Dosisbereich eine signifikante Steigerung der Sekretion von IL-8 registriert. Lediglich die 4 Gy-Intervention zeigte hier einen a.e. gleichsinnigen Strahleneffekt: Bei der Dura mater bzw. den Meningeomen wurde eine tendenzielle bzw. deskriptive Hemmung der IL-8-Synthese beschrieben.

Die Prämisse, die sich aus den bereits beschriebenen Beobachtungen der Morphologie, qPCR-Analyse und Immunfluoreszenzfärbungen ergibt, ist, dass eine Bestrahlung im Dosisbereich von 1 Gy bis 4 Gy prinzipiell denselben pathologischen Prozess im Sinne der EMT und der Ausbildung von Tumorstammzellen bewirkt – unabhängig davon, ob ein Tumor in der Dura mater initiiert oder ein bereits vorhandenes Meningeom malignisiert werden soll. Ausgehend von dieser Grundlage ist es durchaus gerechtfertigt auch bei der Interleukinsekretion bei gleicher Strahledosis auch von Änderungen mit der gleichen Tendenz auszugehen – unabhängig der Gewebsentität. Dies ist bei den vorliegenden ELISA-Ergebnissen offensichtlich nicht der Fall.

Grundsätzlich besteht bereits seit längerem Einigkeit darüber, dass Zyto- und Chemokine, wie IL-6 und IL-8, wichtige Akteure im Zusammenhang mit Tumorstammzellen sind und auch zur Regulation der Stammzellnischen beitragen.

Grundsätzlich finden sich in der Literatur aber teils widersprüchliche Angaben und Erkenntnisse zur Rolle von IL-8 und insbesondere von IL-6: Zwar wurde bereits nachgewiesen, dass Meningeome IL-6 sezernieren. Allerdings zeigte sich in den entsprechenden in-vitro-Modellen eher ein wachstumshemmender Effekt im Rahmen einer autokrinen inhibitorischen Schleifen-Signalkaskade (Todo et al. 1994, Huttner et al. 1996). Auf Grundlage dieser Ergebnisse geht zum Teil auch aktuelle Literatur von einem wachstumshemmenden Effekt auf Meningeome durch IL-6 aus (Borch et al. 2021). Gleichzeitig gibt es aus derselben Forschungsepoche Quellen, die für in-vitro-Meningeomen einen wachstumsfördernden Effekt durch IL-6 nachweisen und einen wachstumshemmenden Effekt durch IL-8 zumindest nahelegen (Boyle-Walsh et al. 1996).

In Bezug auf Tumorprogress ist die bedeutende Position von IL-6 und IL-8 inzwischen jedoch unbestritten: So wurden u.a. bei oralen Krebserkrankungen, wie z.B. Plattenepithelkarzinomen, IL-6 und IL-8 als gewichtige Induktoren der EMT und so von Invasion, Metastasierung und Proliferation identifiziert. Dies äußerte sich auch durch Zunahme des mesenchymalen Markers Vimentin (Hsu et al. 2021).

Für die Interpretation von IL-6 und IL-8 im Zusammenhang mit der Induktion von Tumorstammzellen und EMT empfiehlt sich ein Perspektivenwechsel aus Sicht der entstehenden oder entwickelnden Tumorzellen: Sie allein sind nicht der Effektor der Interleukine. Unter maßgeblichem Einfluss der Interleukine steht eben auch das *tumor microenvironment* samt der tumor-assoziierten Makrophagen und Mikroglia. Diese können wiederum in einen klassischen, proinflammatorischen (M1) und einen alternativen, antiinflammatorischen (M2) Phänotyp differenzieren. Dabei liegt in der Tumormasse nicht ein allein einzelner Phänotyp vor, sondern eine Mischung beider Phänotypen mit einem undulierenden Verhältnis. Dies ist insofern von Relevanz, da das M1:M2-Zellverhältnis in WHO<sup>°</sup>II-Meningeomen signifikant niedriger ist als in WHO<sup>°</sup>I-Meningeomen und die M1:M2-*ratio* so maßgeblich Einfluss auf Tumorstammzellwachstum und -verhalten nimmt. Die Ausdifferenzierung in einen M1- oder M2-Phänotyp ist wiederum abhängig von dem umgebenden Mikromilieu und somit auch von den sezernierten Interleukinen (Borch et al. 2021). Es ist also in Konsequenz naheliegend, dass weniger die absolute Konzentration einzelner Interleukine, sondern eher das Verhältnis verschiedener Interleukine zueinander relevant für die Tumorentwicklung ist.

#### **8.4        *NANOG1* UND *NANOGP8* ALS CSC-INDUKTOREN**

Die fundamentale Rolle der *NANOG*-Genfamilie beim Erhalten der Stammzeleigenschaften ist nach langjähriger Forschung inzwischen unumstritten. Allerdings ist die Rollenverteilung beim Erhalt der Stammzellen und insbesondere der Tumorstammzellen noch umstritten: Für relativ lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass *NANOG1* das Gen ist, dass für den Erhalt der Stammzeleigenschaften, wie z.B. Pluripotenz oder Selbsterneuerung, verantwortlich ist. In den letzten Jahren setzte in der aktuellen Literatur jedoch ein Stück weit ein Paradigmenwechsel ein,

der den Fokus zu Gunsten von *NANOGP8* als für Tumorstammzellen verantwortliches Gen verstellte. Auch in Meningeomen wurde bereits festgestellt, dass die *NANOGP8*-Expression auf mRNA-Ebene höher ausfiel als die *NANOG1*-Expression. Diese Differenz relativierte sich jedoch, da in der *NANOGP8*-Expression im Vergleich zu gesundem Dura mater-Gewebe kein Unterschied registrierbar war (Freitag et al. 2017). Daher wurde auch in dieser Arbeit die Ausprägung von *NANOG1* und *NANOGP8* in primären Kulturen von Meningeomen und Dura mater auf mRNA-Ebene untersucht, um das für die Tumorstammzellen verantwortliche Gen zu diagnostizieren.

Unabhängig von der finalen Funktionalität der beiden Gene ist ihre Gegenläufigkeit in beiden Gewebetypen und im relevanten Dosisbereich von 1 Gy bis 4 Gy unmittelbar auffallend: So konnte in den Kulturen der Dura mater nach einer Bestrahlung von 1 Gy oder 4 Gy im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Zunahme der *NANOG1*-Expression beobachtet werden bei gleichzeitiger Abnahme der *NANOGP8*-Expression. Andererseits wurde bei der Dura mater nach einer 2 Gy-Radiatio ein Abfall der *NANOG1*-Expression parallel zu einer *NANOGP8*-Zunahme festgestellt. Dieses Verhaltensmuster setzt sich auch bei den Meningeomen fort: Sowohl bei 1 Gy als auch bei 2 Gy nahm die *NANOG1*-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe zu, während die *NANOGP8*-Expression abnahm. Nur nach einer 4 Gy-Radiatio der Meningeome konnte eine parallele Zunahme beider Gene festgestellt werden – ohne jegliche statistische Relevanz der *NANOGP8*-Expression.

Fraglich ist nun, inwiefern diese Ergebnisse eingeordnet werden können. Bei Sichtung der Literatur ist die Rollenverteilung zwischen *NANOG1* und *NANOGP8* nur schwer fassbar. Grundsätzlich ist erst einmal anzuerkennen, dass der Transkriptionsfaktor NANOG beteiligt an der Tumorentwicklung ist. So konnte an zahlreichen in-vitro-Modellen nachgewiesen werden, dass die Ausschaltung von NANOG bei Mamma-, Prostata- und Kolonkarzinomen zu einer Hemmung eben dieser Tumorentwicklung führte (Jeter et al. 2009). Allerdings ist die Frage, welches Gen hauptverantwortlich für die Expression des Transkriptionsfaktors ist, auch heute noch schwer zu beantworten. Dies ist auch darauf zurückzuführen, dass in zahlreichen Vorarbeiten die NANOG-Expression lediglich auf Proteinebene mittels Immunhistochemie erfolgte, ohne dass eine Differenzierung zwischen *NANOG1* und *NANOGP8* möglich oder gar gewollt war. Erst in den letzten Jahren setzte hier ein Umdenken ein: So wurde an verschiedenen Zelllinien von Kolonkarzinomen zwar eine erhöhte Expression von Nanog festgestellt. Allerdings unterschied sich je nach Zelllinie das Verhältnis der Expression von *NANOG1* zu *NANOGP8*, so dass eine geteilte Verantwortung für die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften in diesem Fall naheliegend ist (Ishiguro et al. 2012). Andererseits wurde an Zelllinien von gastralen Adenokarzinomen eine verstärkte Überexpression von *NANOGP8* in den potentiell pluripotenten Sphäroiden nachge-

wiesen. Gleichzeitig war diese *NANOGP8*-Expression mit einer verstärkten Stimulation von Genen assoziiert, die wiederum für die Induktion der EMT verantwortlich sind (Ma et al. 2018). Andererseits konnte an verschiedenen Malignomen gezeigt werden, dass in somatischen Tumorzellen bevorzugt *NANOGP8* exprimiert wird, während in embryonalen Tumorzellen die *NANOG1*-Expression überwiegt (Jeter et al. 2009). Auch bei Meningeomen wurde die Frage der Gewichtung von *NANOG1* und *NANOGP8* bereits erörtert: So übertraf die *NANOGP8*-Expression in Tumorproben zwar die von *NANOG1*. Allerdings unterschied sie sich nicht von der in den als Kontrollgruppe dienenden Dura mater-Proben. Für *NANOG1* dagegen wurde eine Überexpression im Tumorgewebe und zugleich eine direkte positive Korrelation zum WHO-Grad festgestellt (Freitag et al. 2017).

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass die Frage nach dem hauptverantwortlichen Gen für die NANOG-Expression in Tumorstammzellen und in der Tumorentwicklung allgemein noch weit davon entfernt ist beantwortet zu sein. Problematisch ist, dass einige Arbeiten, die eine vorherrschende Stellung von *NANOG1* propagierten, im Nachgang eine unsaubere Differenzierung zwischen *NANOG1* und *NANOGP8* hinsichtlich der Primer-Auswahl aufwiesen. Erst in den letzten Jahren setzte so ein allmählicher Paradigmenwechsel zu Gunsten von *NANOGP8* ein. Die abschließende Evidenz ist jedoch noch ausstehend (Sneha et al. 2019).

Für diese Arbeit bedeutet dies, dass auch hier nicht abschließend geklärt werden kann, ob nun *NANOG1* oder *NANOGP8* für die strahlenabhängige Entstehung von Tumorstammzellen verantwortlich ist. Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse sprechen jedoch eher für *NANOG1* als zuständiges Gen.

## **8.5 THERAPEUTISCHER STRAHLENEFFEKT AB 8 GY UND IM HOCHDOSISBEREICH**

Mit einer unfraktionierten Bestrahlung von 8 Gy wird sowohl für die Kulturen der Dura mater als auch der Meningeome die kritische ED50 überschritten. Daher soll dieser Hochdosisbereich in dieser Diskussion gesondert behandelt werden.

Nach einer Bestrahlung mit 8 Gy werden zwar in den Kulturen der Dura mater die Stammzellmarker *NANOG1*, *SOX2*, *OCT4* und *CD44* auf mRNA-Ebene weiterhin exprimiert. Allerdings zeigen alle vier eine Expressionsabnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse lassen sich auf Proteinebene nur teilweise reproduzieren: Die Translation von NANOG nimmt eher ab, während die von *SOX2* und *CD44* sogar eher zunimmt. Andererseits nimmt die Ausprägung der Meningeommarker Vimentin, EMA und Nestin im Vergleich zur Kontrollgruppe zumindest deskriptiv zu. Aber auch hinsichtlich Proliferation und Morphologie nehmen die 8 Gy-Kulturen der Dura mater eine Sonderstellung ein: Zwar zeigt der Proliferationsindex Ki-67 statistisch keine relevante Änderung zur Kontrollgruppe und die 8 Gy-Kulturen erreichen in ihrer Gesamtheit weiterhin den primären Endpunkt. Andererseits führte eine Radiatio mit 8 Gy zu einer signifikanten Wachstumshemmung. Insgesamt zeigen die mit 8 Gy bestrahlten Kulturen der

Dura mater ein Mischbild und bilden wohl einen Brückenkopf zwischen dem potentiell onkogenen Dosisbereich von 1 Gy bis 4 Gy und dem Hochdosisbereich von 12 Gy bis 20 Gy mit dem gewünschten therapeutischen Strahleneffekt des Zelluntergangs: Die 8 Gy zeigen durchaus einen potentiell onkogenen Effekt mit der Zunahme der Meningeommarker. Auch das Stammzellpotential scheint durch die Bestrahlung nicht vollständig supprimiert, was sich in der weiterhin bestehenden NANOG und sogar eher gesteigerten Ausprägung von CD44 und SOX2 auf Proteinebene widerspiegelt. Dies wird auch dadurch bekräftigt, dass mikroskopisch vitale Sphäroide sogar früher auftreten als in der Kontrollgruppe. Gleichzeitig lässt sich ein proliferationshemmender Effekt nicht von der Hand weisen.

Die Ergebnisse der Hochdosisgruppe ab 12 Gy sprechen eine klarere Sprache: Hier steht klar der signifikante, wachstumshemmende Strahleneffekt ohne Erreichen des primären Endpunktes im Vordergrund. Zwar kommt es auch hier zur Ablösung von Zellen aus dem Verbund. Vitale sphäroide Zellen konnten jedoch zu keiner Zeit nachgewiesen werden. Auffällig auf Proteinebene ist allerdings die deskriptive Zunahme der SOX2-Expression sowie die tendenzielle Zunahme des Meningeommarkers EMA: Die SOX2-Expression wird dadurch relativiert, dass die Transkription von SOX2 tendenziell abnimmt. Gleichzeitig nehmen auch andere, für die Stammzelleigenschaften relevanten Targets, wie z.B. NANOG bzw. *NANOG1*, OCT4 und CD44, in ihrer Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eher ab. Es besteht also durchaus die Möglichkeit, dass eine Bestrahlung mit 12 Gy zunächst noch in den frühen Passagen nach Intervention zunächst noch einen onkogenen Effekt erzielt und potentielle Zellen mit Stammzelleigenschaften induziert. Allerdings tritt dieser Strahleneffekt im Verlauf rasch hinter den therapeutischen Effekt des Zelluntergangs zurück. Spätestens ab einer Dosis von 16 Gy überwiegt von Beginn an der strahleninduzierte Zelltod.

Vor dem Hintergrund der strahlenabhängigen Wachstumshemmung und des konsekutiven Zelluntergangs ist es dennoch überraschend, dass die Dura mater nach einer Intervention mit 8 Gy – und fraglich auch nach 12 Gy – weiterhin Stammzellmarker und sogar potentielle Stammzellen exprimiert. Der Schlüssel zu einem möglichen Erklärungsansatz liegt in der ionisierenden Strahlung: Ionisierende Strahlung führt in Zellen zur Bildung von Sauerstoffradikalen, wie z.B. Stickstoffoxide. Die Zelle wird dadurch oxidativem Stress ausgesetzt. Das führt u.a. durch die Ausbildung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  zu einer Umstellung des zellulären Metabolismus im Sinne des Warburg-Effekts, der z.B. mit einer Steigerung der Glykolyse einhergeht. Zusammenfassend kann der durch ionisierende Strahlung provozierte oxidative Stress durchaus zur Ausbildung von Stammzelleigenschaften führen. So wurde die metabolische Anpassung an den oxidativen Stress bereits in sphäroiden Tumorzellen beobachtet (Nath und Devi 2016, Thomas und Wink 2017). Dies bildet durchaus eine Erklärung für das Verhalten der Dura mater bei 8 Gy:

Ausbildung von potentiellen Zellen mit Stammzelleigenschaften durch strahleninduzierten oxidativen Stress bei gleichzeitiger strahleninduzierter Wachstumshemmung. Diese Ausbildung von Stammzelleigenschaften bzw. Stammzellen kann auch als „Notprogramm“ mit dem Ziel des Überlebens von Zellen gewertet werden (Cabarcas et al. 2011). Allerdings erreichen die 8 Gy weiterhin eine verhältnismäßig hohe Passagenzahl, was nicht allein durch den strahlenabhängigen Zelluntergang erklärbar ist. Diese Beobachtungen setzen sich fort, dass nach einer Bestrahlung mit 12 Gy oder höher zwar die Proliferation und Mitose stagniert. Dennoch konnten weiterhin vitale und adhärente Zellen in den Kulturen beobachtet werden. Einen möglichen Klärungsversuch liefert die Literatur: So konnte in Folge von therapeutischen Bestrahlungen von Knochen die Transformation von bestrahlten Zellen in ein seneszenten Stadium mit Übergang in den nicht-proliferativen Zellarrest beobachtet werden (Chandra et al. 2019). Eine Übertragung dieses Mechanismus auf die bestrahlte Dura mater ist durchaus vorstellbar: Aufgrund des massiven Zell- und DNA-Schadens konsekutiv zur Hochdosis-Bestrahlung gehen betroffene Zellen in einen seneszenten Zustand mit Stillstand von Wachstum und Zellzyklus über.

Auch bei den mit 8 Gy bestrahlten Meningeom-Kulturen imponiert bereits auf den Strahleneffekt auf das Wachstumsverhalten: Während bei den mit 4 Gy bestrahlten Kulturen im abschließenden Intervall sogar ein wachstumsstimulierender Effekt nachzuweisen ist, führt eine Bestrahlung mit einer Dosis jenseits der ED<sub>50</sub> so weit zu einer Inhibition der Proliferation, dass bereits bei der 8 Gy-interventionsgruppe keine Kultur den primären Endpunkt erreicht. Tatsächlich spiegelt sich dies auf Proteinebene nur bedingt wider: Die Expression von Ki-67 bleibt im Vergleich zur Kontrollgruppe weitestgehend stabil.

Es können aber auch so manche Parallelen zu den 8 Gy-Gruppen der Dura mater festgehalten werden: Auch bei den Meningeomen kommt es zu einer verstärkten Expression von NANOG und CD44. Anders als bei der Dura mater nehmen jedoch auch die Transkriptionsfaktoren SOX2 und OCT4 zu. Die Meningeommarker zeigen ein divergierendes Bild: Vimentin zeigt keine Veränderung zur Kontrollgruppe. Nestin dagegen zeigt im Bereich von 0 Gy bis 12 Gy die niedrigste Expression. EMA zeigt zwar auch einen Expressionsrückgang, ist aber noch über dem Niveau der 4 Gy-Gruppen. Ähnlich wie bei der Dura mater sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung nur teilweise konkludent zu der qPCR-Analyse: Zwar kann auch auf mRNA-Ebene ein Anstieg von *NANOG1* und *CD44* verzeichnet werden. Allerdings ergab sich für *OCT4* eher eine Abnahme, während *SOX2* in seiner Ausprägung a.e. stabil blieb. Dennoch können auch in den 8 Gy-Kulturen weiterhin vitale Sphäroide als potentielle Tumorstammzellen beobachtet werden. Prinzipiell sind die Schlussfolgerungen dieselben wie bei den 8 Gy-Kulturen der Dura mater: Die Kulturen zeigten weiterhin das typische Profil eines Meningeoms. Durch den EMA-Rückgang kann auch eine Malignisierung nicht ausgeschlossen werden. Gleichzeitig ist eine strahleninduzierte Entwicklung von potentiellen Tumorstammzellen aufgrund der Veränderungen hinsichtlich

Proteinexpression und Phänotyp wahrscheinlich. Letztendlich ergibt sich a.e. ein Mischbild aus Zelluntergang einerseits und einem zellulären Pool aus seneszenten Zellen und stammzellähnlichen Zellen andererseits.

Ab einer Strahlendosis von 12 Gy sind die Verhältnisse auch bei den Meningeomen klarer und ähneln denen der Dura mater: Auch hier überwiegt der therapeutische Effekt mit Zelluntergang und signifikanter Wachstumshemmung der bestrahlten Kulturen. Lediglich die 12 Gy-Kulturen nehmen eine Sonderrolle ein: Eine unfraktionierte Radiatio mit dieser Dosis führt zu einer Steigerung der Expression von *NANOG1*, *SOX2*, *OCT4* und *MYC*, was sich auch einer verstärkten Ausprägung von *NANOG* und *SOX2* äußert. Dennoch konnten zu keiner Zeit vitale Sphäroide nachgewiesen werden. Es ist durchaus möglich, dass es in Folge des strahleninduzierten oxidativen Stresses – wie bei der Dura mater – zu einer zwischenzeitlichen Ausprägung von Stammzeleigenschaften kommt. Allerdings äußert sich dies zum einen nicht im Phänotyp. Zum anderen scheint am Ende der zellschädigende Effekt zu überwiegen, was sich der supprimierten Wachstumskurve und der reduzierten Passagenzahl der Kulturen widerspiegelt.

## **8.6 LIMITIERUNGEN DER ARBEIT**

Die Aussagekraft und damit einhergehend die Interpretation der Immunfluoreszenzfärbungen wird im Wesentlichen durch zwei Faktoren begrenzt: Zum einen ist der Stichprobenumfang mit maximal drei Proben pro Target relativ gering. Dabei stellen diese drei Proben – bedingt durch die drei jeweiligen Kulturen – den Idealfall dar. Sollten die für die Färbungen kultivierten Zellen nicht ausreichend anwachsen, so kann sich der Stichprobenumfang weiter reduzieren. Dies erschwert eine belastbare statistische Analyse.

Zum anderen ist auch die inhaltliche Interpretation bedingt durch den Versuchsaufbau diffizil: Als Target für die Immunfluoreszenzfärbungen dienen lediglich die bei Erreichen des Endpunktes kultivierten Zellen. Im Gegensatz dazu stehen die qPCR-Analysen und die Interleukin-ELISAs: Hier werden bei jeder Passage Proben entnommen, sodass die Dynamik der Strahleneffekte im zeitlichen Verlauf dargestellt werden können. Die Immunfluoreszenzfärbungen liefern dagegen eine Momentaufnahme. Dynamische Veränderungen in der Genexpression werden auf Proteinebene so nicht abgebildet.

## **9 SCHLUSSFOLGERUNG**

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von ionisierender Strahlung auf die Entstehung und Entwicklung von Meningeomen auf molekularbiologischer Ebene.

Die Analysen zeigen zum einen, dass ionisierende Strahlung sowohl in den Zellkulturen der Dura mater als auch der Meningeome deutlichen Veränderungen in Morphologie und Wachstumsverhalten induziert: So führt eine Strahlendosis von 1 Gy bis 4 Gy zumindest bei der Dura

mater zu einer Stimulation der Proliferation. Gleichzeitig bewirkt eine Radiatio desselben Dosispektrums bei der Dura mater ein früheres Auftreten von vitalen sphäroiden Zellen, die als potentielle Tumorstammzellen gewertet werden können, während die Bestrahlung der Meningeome überhaupt erst die Sphäroide herbeiführt.

Eine unfraktionierte Bestrahlung im Bereich von 1 Gy bis 4 Gy führt bei den Kulturen der Dura mater zu einer früheren Ausbildung von vitalen sphäroiden Zellen und somit von Zellen mit potentiell stammzellähnlichen Eigenschaften (**Abb. 33**). Die Radiatio führt zur gesteigerten Expression von Stammzellmarkern sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Die Immunfluoreszenzfärbung der Dura mater belegt ein Zellprofil ähnlich zu dem von Meningeomen. Insgesamt bewirkt eine Radiatio mit 1 Gy bis 4 Gy a.e. eine Stammzell- und Tumorinduktion.

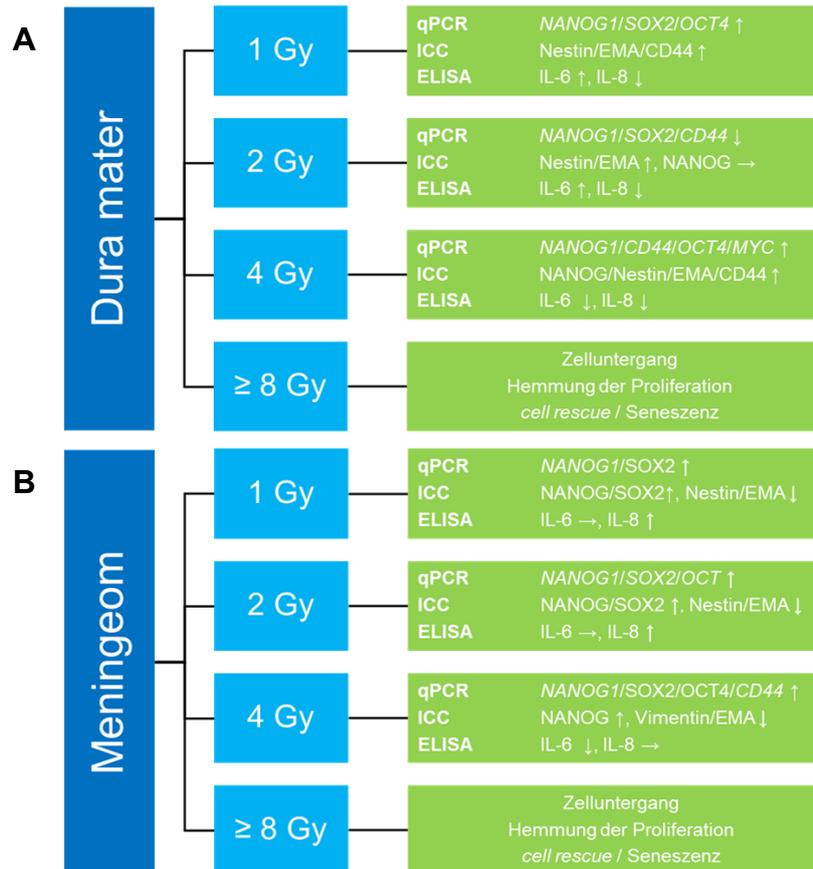
Eine unfraktionierte Bestrahlung im Bereich von 1 Gy bis 4 Gy führt bei den Meningeomzellkulturen zur Ausbildung von vitalen sphäroiden Zellen und somit von potentiellen Tumorstammzellen (**Abb. 33**). Die Radiatio führt zur Expression von Stammzellmarkern sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Die Immunfluoreszenzfärbung belegt ein Zellprofil, welches vereinbar mit einer Malignisierung ist. Insgesamt bewirkt eine Radiatio mit 1 Gy bis 4 Gy a.e. eine Induktion von Tumorstammzellen sowie eine Malignisierung.

Die Dosis von 4 Gy stellt sowohl bei der Dura mater als auch bei den Meningeomen einen kritischen Bereich dar. Hier sind a.e. die stärksten Strahleneffekte hinsichtlich der Induktion von stammzellähnlichen Zellen und Tumorentstehung und Tumorprogress zu verorten.

Ionisierende Strahlung führt zu einer signifikanten Änderung der Sekretion von IL-6 und IL-8 durch Dura mater und Meningeome. Beide Faktoren spielen eine wichtige Rolle beim Aufrechterhalten der Stammzellnische, die die Existenz von Stammzellen ermöglicht. Vermutlich ist hierbei weniger die absolute Konzentrationsänderung als die IL-6 : IL-8-ratio einer der entscheidenden Parameter.

Die qPCR-Analysen der *NANOG1*- und *NANOGP8*-Expression legen nahe, dass *NANOG1* das für den Erhalt potentiell pluripotenten Tumorstammzellen verantwortliche Gen ist.

Eine Bestrahlung mit 8 Gy oder höher führt sowohl bei der Dura mater als auch bei den Meningeomen zu einem therapeutischen Effekt mit Wachstumsinhibition und Zelluntergang. Dennoch ist auch in diesem Bereich ein begrenztes Stammzellpotential zu beobachten.



**Abb. 33 Zusammenfassende und schematische Darstellung der Resultate**

**A** Dura mater: Zusammenfassend führte eine unfraktionierte Radiatio mit 1 Gy oder 4 Gy zu einer vermehrten Transkription von *NANOG1* und weiterer Stammzell- und Differenzierungsmarker. Für 2 Gy wurde dagegen eher eine verminderte Transkription dieser Targets beobachtet. Allerdings führt eine Radiatio mit 1 Gy bis 4 Gy einheitlich zu einer verstärkten Expression der Meningeommarker in der Immunfluoreszenzfärbung. Die Sekretion der Interleukine variiert abhängig von der Strahlendosis.

**B** Meningeome: Zusammenfassend führte eine unfraktionierte Radiatio mit 1 Gy bis 4 Gy zu einer verstärkten Transkription von *NANOG1* und je nach Strahlendosis von weiteren Stammzell- und Differenzierungsmarkern. Hervorzuheben ist, dass die Transkriptionen dieser Targets und Transkriptionsfaktoren nach einer 4 Gy-Radiatio auch im Vergleich zu den 1 Gy- und 2 Gy-Kulturen höher ausfiel. Auf Proteinebene zeigte sich eine Abnahme von Nestin und EMA. Die Zunahme von *NANOG* und *SOX2* war auch in der Translation reproduzierbar. Die Sekretion der Interleukine variierte je nach Strahlendosis.

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

- Adeeb N, Mortazavi MM, Tubbs RS, Cohen-Gadol AA. 2012. The cranial dura mater: a review of its history, embryology, and anatomy. *Childs Nerv Syst*, 28 (6):827-837.
- Alemohammad H, Asadzadeh Z, Motafakker Azad R, Hemmat N, Najafzadeh B, Vasefifar P, Najafi S, Baradaran B. 2020. Signaling pathways and microRNAs, the orchestrators of NANOG activity during cancer induction. *Life Sci*, 260:118337.
- Allegra A, Alonci A, Penna G, Innao V, Gerace D, Rotondo F, Musolino C. 2014. The cancer stem cell hypothesis: a guide to potential molecular targets. *Cancer Invest*, 32 (9):470-495.
- Apra C, Peyre M, Kalamarides M. 2018. Current treatment options for meningioma. *Expert Rev Neurother*, 18 (3):241-249.
- Barresi V, Caffo M, Branca G, Caltabiano R, Tuccari G. 2012. Meningeal tumors histologically mimicking meningioma. *Pathol Res Pract*, 208 (10):567-577.
- Booth HA, Holland PW. 2004. Eleven daughters of NANOG. *Genomics*, 84 (2):229-238.
- Borch JS, Haslund-Vinding J, Vilhardt F, Maier AD, Mathiesen T. 2021. Meningioma-Brain Crosstalk: A Scoping Review. *Cancers (Basel)*, 13 (17).
- Bouamrani A, Ramus C, Gay E, Pelletier L, Cubizolles M, Brugiere S, Wion D, Berger F, Issartel JP. 2010. Increased Phosphorylation of Vimentin in Noninfiltrative Meningiomas. *Plos One*, 5 (2).
- Boyle-Walsh E, Birch M, Gallagher JA, Speirs V, White MC, Shenkin A, Fraser WD. 1996. RT-PCR detection of cytokine transcripts in a series of cultured human meningiomas. *J Pathol*, 178 (4):442-446.
- Bradshaw A, Wickremsekera A, Tan ST, Peng L, Davis PF, Itinteang T. 2016. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Front Surg*, 3:21.
- Buerki RA, Horbinski CM, Kruser T, Horowitz PM, James CD, Lukas RV. 2018. An overview of meningiomas. *Future Oncol*, 14 (21):2161-2177.
- Cabarcas SM, Mathews LA, Farrar WL. 2011. The cancer stem cell niche-where goes the neighborhood? *International Journal of Cancer*, 129 (10):2315-2327.
- Chan HSC, Ng HK, Chan AK, Cheng SH, Chow C, Wong N, Wong GKC. 2021. Establishment and characterization of meningioma patient-derived organoid. *J Clin Neurosci*, 94:192-199.
- Chandra A, Park SS, Pignolo RJ. 2019. Potential role of senescence in radiation-induced damage of the aged skeleton. *Bone*, 120:423-431.
- Chen L, Fan J, Chen H, Meng Z, Chen Z, Wang P, Liu L. 2014. The IL-8/CXCR1 axis is associated with cancer stem cell-like properties and correlates with clinical prognosis in human pancreatic cancer cases. *Sci Rep*, 4:5911.
- Co JL, Swain M, Murray LJ, Ahmed S, Laperriere NJ, Tsang DS, Yu E, Pintilie M, Weiss J, Hodgson DC. 2019. Meningioma Screening With MRI in Childhood Leukemia Survivors Treated With Cranial Radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 104 (3):640-643.
- Danielsson F, Peterson MK, Caldeira Araujo H, Lautenschlager F, Gad AKB. 2018. Vimentin Diversity in Health and Disease. *Cells*, 7 (10).
- Das B, Pal B, Bhuyan R, Li H, Sarma A, Gayan S, Talukdar J, Sandhya S, Bhuyan S, Gogoi G, Gouw AM, Baishya D, Gotlib JR, Katakaki AC, Felsher DW. 2019. MYC Regulates the HIF2 $\alpha$  Stemness Pathway via Nanog and Sox2 to Maintain Self-Renewal in Cancer Stem Cells versus Non-Stem Cancer Cells. *Cancer Res*, 79 (16):4015-4025.
- David JM, Dominguez C, Hamilton DH, Palena C. 2016. The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance. *Vaccines (Basel)*, 4 (3).
- de Carvalho GTC, da Silva-Martins WC, de Magalhaes KCSF, Nunes CB, Soares AN, Tafuri LSDEA, Simoes RT. 2020. Recurrence/Regrowth in Grade I Meningioma: How to Predict? *Frontiers in Oncology*, 10.

- Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. 2011. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 20 (1):5-14.
- Dmello C, Sawant S, Alam H, Gangadaran P, Mogre S, Tiwari R, D'Souza Z, Narkar M, Thorat R, Patil K, Chaukar D, Kane S, Vaidya M. 2017. Vimentin regulates differentiation switch via modulation of keratin 14 levels and their expression together correlates with poor prognosis in oral cancer patients. *Plos One*, 12 (2).
- Durand A, Labrousse F, Jouvot A, Bauchet L, Kalamarides M, Menei P, Deruty R, Moreau JJ, Fevre-Montange M, Guyotat J. 2009. WHO grade II and III meningiomas: a study of prognostic factors. *J Neurooncol*, 95 (3):367-375.
- Dziuk TW, Woo S, Butler EB, Thornby J, Grossman R, Dennis WS, Lu H, Carpenter LS, Chiu JK. 1998. Malignant meningioma: an indication for initial aggressive surgery and adjuvant radiotherapy. *J Neurooncol*, 37 (2):177-188.
- Freitag D, Koch A, Lawson McLean A, Kalff R, Walter J. 2018. Validation of Reference Genes for Expression Studies in Human Meningiomas under Different Experimental Settings. *Mol Neurobiol*, 55 (7):5787-5797.
- Freitag D, McLean AL, Simon M, Koch A, Grube S, Walter J, Kalff R, Ewald C. 2017. NANOG overexpression and its correlation with stem cell and differentiation markers in meningiomas of different WHO grades. *Mol Carcinog*, 56 (8):1953-1964.
- Gawlik-Rzemieniewska N, Bednarek I. 2016. The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 17 (1):1-10.
- Goldschmidt E, Hem S, Ajler P, Ielpi M, Loresi M, Giunta D, Carrizo A, Yampolsky C, Argibay P. 2013. A new model for dura mater healing: human dural fibroblast culture. *Neurol Res*, 35 (3):300-307.
- Goldstein S. 1990. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*, 249 (4973):1129-1133.
- Gong S, Li Q, Jeter CR, Fan Q, Tang DG, Liu B. 2015. Regulation of NANOG in cancer cells. *Mol Carcinog*, 54 (9):679-687.
- Goutagny S, Kalamarides M. 2010. Meningiomas and neurofibromatosis. *J Neurooncol*, 99 (3):341-347.
- Gritsch S, Batchelor TT, Gonzalez Castro LN. 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.
- Grubelnik G, Bostjancic E, Groselj A, Zidar N. 2020a. Expression of NANOG and Its Regulation in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int*, 2020:8573793.
- Grubelnik G, Bostjancic E, Pavlic A, Kos M, Zidar N. 2020b. NANOG expression in human development and cancerogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 245 (5):456-464.
- Gurcay AG, Bozkurt I, Senturk S, Kazanci A, Gurcan O, Turkoglu OF, Beskonakli E. 2018. Diagnosis, Treatment, and Management Strategy of Meningioma during Pregnancy. *Asian J Neurosurg*, 13 (1):86-89.
- Hall JT, Opalak CF, Carr MT, Harris TJ, Broaddus WC. 2021. The Effect of Radiation on Meningioma Volume Change. *World Neurosurg*, 153:e141-e146.
- Harter PN, Braun Y, Plate KH. 2017. Classification of meningiomas-advances and controversies. *Chin Clin Oncol*, 6 (Suppl 1):S2.
- Hassn Mesrati M, Syafruddin SE, Mohtar MA, Syahir A. 2021. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. *Biomolecules*, 11 (12).
- Hoffding MK, Hyttel P. 2015. Ultrastructural visualization of the Mesenchymal-to-Epithelial Transition during reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, 14 (1):39-53.
- Hsu PC, Chen YH, Cheng CF, Kuo CY, Sytwu HK. 2021. Interleukin-6 and Interleukin-8 Regulate STAT3 Activation Migration/Invasion and EMT in Chrysophanol-Treated Oral Cancer Cell Lines. *Life (Basel)*, 11 (5).

- Hueng DY, Sytwu HK, Huang SM, Chang C, Ma HI. 2011. Isolation and characterization of tumor stem-like cells from human meningiomas. *J Neurooncol*, 104 (1):45-53.
- Huttner A, Lei T, Fahlbusch R, Schrell U, Adams EF. 1996. Relationship between cAMP induced inhibition of human meningioma cell proliferation and autocrine secretion of interleukin-6. *Life Sciences*, 58 (16):1323-1329.
- Ikeda H, Yoshimoto T. 2003. Immunohistochemical study of anaplastic meningioma with special reference to the phenotypic change of intermediate filament protein. *Ann Diagn Pathol*, 7 (4):214-222.
- Ishiguro T, Sato A, Ohata H, Sakai H, Nakagama H, Okamoto K. 2012. Differential expression of nanog1 and nanogp8 in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 418 (2):199-204.
- Jeter CR, Badeaux M, Choy G, Chandra D, Patrawala L, Liu C, Calhoun-Davis T, Zaehres H, Daley GQ, Tang DG. 2009. Functional Evidence that the Self-Renewal Gene NANOG Regulates Human Tumor Development. *Stem Cells*, 27 (5):993-1005.
- Jin F, Miao Y, Xu P, Qiu X. 2018. IL-8 regulates the stemness properties of cancer stem cells in the small-cell lung cancer cell line H446. *Onco Targets Ther*, 11:5723-5731.
- Johnson DR, Olson JE, Vierkant RA, Hammack JE, Wang AH, Folsom AR, Virnig BA, Cerhan JR. 2011. Risk factors for meningioma in postmenopausal women: results from the Iowa Women's Health Study. *Neuro Oncol*, 13 (9):1011-1019.
- Krishnamurthy S, Warner KA, Dong Z, Imai A, Nor C, Ward BB, Helman JI, Taichman RS, Bellile EL, McCauley LK, Polverini PJ, Prince ME, Wicha MS, Nor JE. 2014. Endothelial interleukin-6 defines the tumorigenic potential of primary human cancer stem cells. *Stem Cells*, 32 (11):2845-2857.
- Kumari N, Dwarkanath BS, Das A, Bhatt AN. 2016. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol*, 37 (9):11553-11572.
- Lakhtakia R, Aljarrah A, Furrakh M, Ganguly SS. 2017. Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) in Metastatic Breast Cancer in Omani Women. *Cancer Microenviron*, 10 (1-3):25-37.
- Lee EJ, Park JH, Park ES, Kim JH. 2017a. "Wait-and-See" Strategies for Newly Diagnosed Intracranial Meningiomas Based on the Risk of Future Observation Failure. *World Neurosurg*, 107:604-611.
- Lee SY, Jeong EK, Ju MK, Jeon HM, Kim MY, Kim CH, Park HG, Han SI, Kang HS. 2017b. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Mol Cancer*, 16 (1):10.
- Leggett SE, Sim JY, Rubins JE, Neronha ZJ, Williams EK, Wong IY. 2016. Morphological single cell profiling of the epithelial-mesenchymal transition. *Integr Biol (Camb)*, 8 (11):1133-1144.
- Liu SQ, Sun J, Cai B, Xi XW, Yang L, Zhang ZB, Feng YJ, Sun YY. 2016. NANOG regulates epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance through activation of the STAT3 pathway in epithelial ovarian cancer. *Tumor Biology*, 37 (7):9671-9680.
- Ma X, Wang B, Wang X, Luo Y, Fan W. 2018. NANOGP8 is the key regulator of stemness, EMT, Wnt pathway, chemoresistance, and other malignant phenotypes in gastric cancer cells. *PLoS One*, 13 (4):e0192436.
- Maggio I, Franceschi E, Tosoni A, Nunno VD, Gatto L, Lodi R, Brandes AA. 2021. Meningioma: not always a benign tumor. A review of advances in the treatment of meningiomas. *CNS Oncol*, 10 (2):CNS72.
- Mandara MT, Foiani G, Silvestri S, Chiaradia E. 2021. Immunoexpression of epithelial membrane antigen in canine meningioma: Novel results for perspective considerations. *Vet Comp Oncol*, 19 (1):115-122.
- Marosi C, Hassler M, Roessler K, Reni M, Sant M, Mazza E, Vecht C. 2008. Meningioma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 67 (2):153-171.

- Matias JG, Jusue-Torres I, Martin B, Bajaj A, Borys E, Melian E, Barton K, Anderson DE, Prabhu VC. 2019. Value of Ki-67 Labeling Index in Predicting Recurrence of WHO Grade I Cranial Base Meningiomas. *J Neurol Surg B Skull Base*, 80 (3):287-294.
- Mato Prado M, Frampton AE, Stebbing J, Krell J. 2015. Gene of the month: NANOG. *J Clin Pathol*, 68 (10):763-765.
- Mawrin C, Perry A. 2010. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol*, 99 (3):379-391.
- Memon A, Rogers I, Paudyal P, Sundin J. 2019. Dental X-Rays and the Risk of Thyroid Cancer and Meningioma: A Systematic Review and Meta-Analysis of Current Epidemiological Evidence. *Thyroid*, 29 (11):1572-1593.
- Migita T, Ueda A, Ohishi T, Hatano M, Seimiya H, Horiguchi SI, Koga F, Shibasaki F. 2017. Epithelial-mesenchymal transition promotes SOX2 and NANOG expression in bladder cancer. *Lab Invest*.
- Minniti G, Clarke E, Cavallo L, Osti MF, Esposito V, Cantore G, Cappabianca P, Enrici RM. 2011. Fractionated stereotactic conformal radiotherapy for large benign skull base meningiomas. *Radiat Oncol*, 6:36.
- Mirian C, Skyрман S, Bartek J, Jensen LR, Kihlstrom L, Forander P, Orrego A, Mathiesen T. 2021. The Ki-67 Proliferation Index as a Marker of Time to Recurrence in Intracranial Meningioma. *Neurosurgery*, 89:S58-S58.
- Morgenstern PF, Shah K, Dunkel IJ, Reiner AS, Khakoo Y, Rosenblum MK, Gutin P. 2016. Meningioma after radiotherapy for malignancy. *J Clin Neurosci*, 30:93-97.
- Mostafa RR, Khairy RA. 2017. CD44 Expression in Meningioma and its Correlation with Proliferation Indices. *J Clin Diagn Res*, 11 (8):EC12-EC15.
- Mupparapu M, Baddam VRR, Lingamaneni KP, Singer SR. 2019. Dental x-ray exposure is not associated with risk of meningioma: a 2019 meta-analysis. *Quintessence Int*, 50 (10):822-829.
- Najafzadeh B, Asadzadeh Z, Motafakker Azad R, Mokhtarzadeh A, Baghbanzadeh A, Alemohammad H, Abdoli Shadbad M, Vasefifar P, Najafi S, Baradaran B. 2021. The oncogenic potential of NANOG: An important cancer induction mediator. *J Cell Physiol*, 236 (4):2443-2458.
- Nath S, Mukherjee P. 2014. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in Molecular Medicine*, 20 (6):332-342.
- Nath S, Devi GR. 2016. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther*, 163:94-108.
- Neradil J, Veselska R. 2015. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Science*, 106 (7):803-811.
- Pecina-Slaus N, Cicvara-Pecina T, Kafka A. 2012. Epithelial-to-mesenchymal transition: possible role in meningiomas *Frontiers in Bioscience*.
- Peng H, Tan X, Wang Y, Dai L, Liang G, Guo J, Chen M. 2020. Clinical significance of Ki67 and circulating tumor cells with an epithelial-mesenchymal transition phenotype in non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res*, 12 (6):2916-2928.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Plaks V, Kong NW, Werb Z. 2015. The Cancer Stem Cell Niche: How Essential Is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? *Cell Stem Cell*, 16 (3):225-238.
- Prabhu VC, Melian E, Germanwala AV, Solanki AA, Borys E, Barton K, Anderson DE. 2018. Cranial Base Meningiomas. *World Neurosurg*, 109:258-262.
- Preston DL, Ron E, Yonehara S, Kobuke T, Fujii H, Kishikawa M, Tokunaga M, Tokuoka S, Mabuchi K. 2002. Tumors of the nervous system and pituitary gland associated with atomic bomb radiation exposure. *J Natl Cancer Inst*, 94 (20):1555-1563.

- Rajabi H, Kufe D. 2017. MUC1-C Oncoprotein Integrates a Program of EMT, Epigenetic Reprogramming and Immune Evasion in Human Carcinomas. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1868 (1):117-122.
- Rath P, Miller DC, Litofsky NS, Anthony DC, Feng Q, Franklin C, Pei LR, Free A, Liu JM, Ren MQ, Kirk MD, Shi HS. 2011. Isolation and characterization of a population of stem-like progenitor cells from an atypical meningioma. *Experimental and Molecular Pathology*, 90 (2):179-188.
- Riemenschneider M, Perry A, Reifenberger G. 2007. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. (vol 5, pg 1045, 2006). *Lancet Neurology*, 6 (2):105-105.
- Rogers L, Barani I, Chamberlain M, Kaley TJ, McDermott M, Raizer J, Schiff D, Weber DC, Wen PY, Vogelbaum MA. 2015. Meningiomas: knowledge base, treatment outcomes, and uncertainties. A RANO review. *J Neurosurg*, 122 (1):4-23.
- Sadetzki S, Flint-Richter P, Ben-Tal T, Nass D. 2002. Radiation-induced meningioma: a descriptive study of 253 cases. *J Neurosurg*, 97 (5):1078-1082.
- Satelli A, Li SL. 2011. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68 (18):3033-3046.
- Shah S, Mudigonda S, Underhill TM, Salo PT, Mitha AP, Krawetz RJ. 2022. Prx1 + and Hic1+ Mesenchymal Progenitors Are Present Within the Epidural Fat and Dura Mater and Participate in Dural Injury Repair. *Stem Cells Transl Med*, 11 (2):200-212.
- Shimizu M, Tanaka N. 2019. IL-8-induced O-GlcNAc modification via GLUT3 and GFAT regulates cancer stem cell-like properties in colon and lung cancer cells. *Oncogene*, 38 (9):1520-1533.
- Shivapathasundram G, Wickremesekera AC, Tan ST, Itinteang T. 2018. Tumour stem cells in meningioma: A review. *J Clin Neurosci*, 47:66-71.
- Sneha S, Nagare RP, Manasa P, Vasudevan S, Shabna A, Ganesan TS. 2019. Analysis of Human Stem Cell Transcription Factors. *Cell Reprogram*, 21 (4):171-180.
- Solomon DA, Pekmezci M. 2020. Pathology of meningiomas. *Handb Clin Neurol*, 169:87-99.
- Sun XM, Kaufman PD. 2018. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127 (2):175-186.
- Swain N, Thakur M, Pathak J, Swain B. 2020. SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis. *J Oral Maxillofac Pathol*, 24 (2):368-373.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126 (4):663-676.
- Tang H, Zhu H, Wang X, Hua L, Li J, Xie Q, Chen X, Zhang T, Gong Y. 2017. KLF4 is a tumor suppressor in anaplastic meningioma stem-like cells and human meningiomas. *J Mol Cell Biol*, 9 (4):315-324.
- Thomas DD, Wink DA. 2017. NOS2 as an Emergent Player in Progression of Cancer. *Antioxidants & Redox Signaling*, 26 (17):963-965.
- Todo T, Adams EF, Rafferty B, Fahlbusch R, Dingermann T, Werner H. 1994. Secretion of interleukin-6 by human meningioma cells: possible autocrine inhibitory regulation of neoplastic cell growth. *J Neurosurg*, 81 (3):394-401.
- Tsai CC, Su PF, Huang YF, Yew TL, Hung SC. 2012. Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell*, 47 (2):169-182.
- Umansky F, Shoshan Y, Rosenthal G, Fraifeld S, Spektor S. 2008. Radiation-induced meningioma. *Neurosurg Focus*, 24 (5):E7.
- van Schaijik B, Davis PF, Wickremesekera AC, Tan ST, Itinteang T. 2018. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review. *J Clin Pathol*, 71 (1):88-91.

- Vasefifar P, Motafakkerazad R, Maleki LA, Najafi S, Ghrobaninezhad F, Najafzadeh B, Alemohammad H, Amini M, Baghbanzadeh A, Baradaran B. 2022. Nanog, as a key cancer stem cell marker in tumor progression. *Gene*, 827:146448.
- Vlashi E, Pajonk F. 2015. Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy. *Semin Cancer Biol*, 31:28-35.
- Wang R, Bhattacharya R, Ye X, Fan F, Boulbes DR, Xia L, Ellis LM. 2017. Endothelial cells activate the cancer stem cell-associated NANOGP8 pathway in colorectal cancer cells in a paracrine fashion. *Mol Oncol*, 11 (8):1023-1034.
- Wei SJ, Nguyen TH, Mook DG, Makena MR, Verlekar D, Hindle A, Martinez G, Yang SP, Shimada H, Reynolds CP, Kang MH. 2020. MYC transcription activation mediated by OCT4 as a mechanism of resistance to 13-cisRA-mediated differentiation in neuroblastoma. *Cancer Research*, 80 (16).
- West AJ, Tsui V, Stylli SS, Nguyen HPT, Morokoff AP, Kaye AH, Luwor RB. 2018. The role of interleukin-6-STAT3 signalling in glioblastoma. *Oncol Lett*, 16 (4):4095-4104.
- WHO Classification of Tumours Editorial Board. 2021. Central Nervous System Tumours. 5 Aufl.: International Agency for Research on Cancer
- Wiemels J, Wrensch M, Claus EB. 2010. Epidemiology and etiology of meningioma. *J Neurooncol*, 99 (3):307-314.
- Wu CT, Chen MF, Chen WC, Hsieh CC. 2013. The role of IL-6 in the radiation response of prostate cancer. *Radiat Oncol*, 8:159.
- Xiao ZY, Chen XJ, Pan Q, Yang QZ, Li KZ. 2018. Expression of Nestin, CD133 and Sox2 in Meningiomas. *Turk Neurosurg*, 28 (6):910-914.
- Yang L, Shi P, Zhao G, Xu J, Peng W, Zhang J, Zhang G, Wang X, Dong Z, Chen F, Cui H. 2020. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*, 5 (1):8.
- Zeineddine D, Hammoud AA, Mortada M, Boeuf H. 2014. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells*, 3 (2):74-82.
- Zhang C, Ma K, Li WY. 2019. IL-6 Promotes Cancer Stemness and Oncogenicity in U2OS and MG-63 Osteosarcoma Cells by Upregulating the OPN-STAT3 Pathway. *J Cancer*, 10 (26):6511-6525.
- Zhang W, Sui Y, Ni J, Yang T. 2016. Insights into the Nanog gene: A propeller for stemness in primitive stem cells. *International Journal of Biological Sciences*, 12 (11):1372-1381.

## 11 ANHANG

### 11.1 TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1</b> Auflistung der eingesetzten primären Zellkulturen und Einordnung nach Entität....	18
<b>Tabelle 2</b> Auflistung der eingesetzten Chemikalien samt Hersteller .....	18
<b>Tabelle 3</b> Auflistung der für die mRNA-Isolation eingesetzten Reaktionslösungen samt Inhaltsstoffe .....	20
<b>Tabelle 4</b> Auflistung der eingesetzten Verbrauchsmaterialien samt Hersteller .....	20
<b>Tabelle 5</b> Auflistung der eingesetzten Geräte samt Typ und Hersteller .....	21
<b>Tabelle 6</b> Auflistung der eingesetzten Kits samt Inhalt und Hersteller .....	22
<b>Tabelle 7</b> Auflistung der für die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion eingesetzten Primer für .....	23
<b>Tabelle 8</b> Auflistung der für die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzten primären Antikörper	24
<b>Tabelle 9</b> Auflistung der für die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzten sekundären Antikörper .....	25
<b>Tabelle 10</b> Auflistung der eingesetzten Programme und Software .....	25

### 11.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Vergleichende Darstellung zwischen dem Modell der klonalen Evolution und Tumorstammzellhypothese.....	8
Abb. 2 Vereinfachte Darstellung der NANOG-Regulation.....	12
Abb. 3 Einbindung von NANOG in EMT-Regulation .....	15
Abb. 4 Lagerung der Zellkulturen. ....	26
Abb. 5 Vereinfachte und schematische Darstellung des Versuchsaufbaus .....	28
Abb. 6 Exemplarische Darstellung der zellulären Morphologie.....	36
Abb. 7 Abgelöste und sphäroide Zellen in der Dura mater .....	37
Abb. 8 Abgelöste und sphäroide Zellen in den Meningeom-Kulturen .....	38
Abb. 9 Proliferationskinetik der Dura mater von 1 Gy bis 8 Gy.....	40
Abb. 10 Proliferationskinetik der Dura mater von 12 Gy bis 20 Gy.....	41
Abb. 11 Proliferationskinetik der Meningeome von 1 Gy bis 8 Gy .....	42
Abb. 12 Proliferationskinetik der Meningeome von 12 Gy bis 20 Gy .....	43
Abb. 13 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen der Dura mater .....	45
Abb. 14 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen der Meningeome .....	47
Abb. 15 Darstellung der gemittelten, maximalen und minimalen Genexpression der Dura mater bis 8 Gy .....	50
Abb. 16 .....	51

Abb. 17 Darstellung der Genexpression der Dura mater im zeitlichen Verlauf für 1 Gy und 2 Gy .....	52
Abb. 18 Darstellung der Genexpression der Dura mater im zeitlichen Verlauf für 4 Gy und 8 Gy .....	53
Abb. 19 Darstellung der Genexpression der Dura mater im zeitlichen Verlauf für 12 Gy bis 20 Gy .....	54
Abb. 20 Darstellung der gemittelten, maximalen und minimalen Genexpression der Meningeome bis 8 Gy.....	55
Abb. 21 Darstellung der gemittelten, maximalen und minimalen Genexpression der Meningeome von 12 Gy bis 20 Gy .....	56
Abb. 22 Darstellung der Genexpression der Meningeome im zeitlichen Verlauf im für 1 Gy und 2 Gy .....	57
Abb. 23 Darstellung der Genexpression der Meningeome im zeitlichen Verlauf für 4 Gy und 8 Gy .....	58
Abb. 24 Darstellung der Genexpression der Meningeome im zeitlichen Verlauf für 12 Gy bis 20 Gy.....	59
Abb. 25 Mittlere, maximale und minimale IL-6-Konzentration der Dura mater pro Passage nach Strahlendosis .....	60
Abb. 26 Darstellung der IL-6-Konzentration der Dura mater im zeitlichen Verlauf nach Strahlendosis.....	61
Abb. 27 Mittlere, maximale und minimale IL-8-Konzentration der Dura mater pro Passage nach Strahlendosis .....	62
Abb. 28 Darstellung der IL-8-Konzentration der Dura mater im zeitlichen Verlauf nach Strahlendosis.....	63
Abb. 29 Mittlere, maximale und minimale IL-6-Konzentration der Meningeome pro Passage nach Strahlendosis .....	64
Abb. 30 Darstellung der IL-6-Konzentration der Meningeome im zeitlichen Verlauf nach Strahlendosis.....	65
Abb. 31 Mittlere, maximale und minimale IL-8-Konzentration der Meningeome pro Passage nach Strahlendosis .....	67
Abb. 32 Darstellung der IL-6-Konzentration der Meningeome im zeitlichen Verlauf nach Strahlendosis.....	68
Abb. 33 Zusammenfassende und schematische Darstellung der Resultate .....	90

### 11.3 DANKSAGUNG

Die letzten Seiten dieser Arbeit möchte ich noch nutzen, um mich bei den Menschen zu bedanken, die durch ihr Zutun meinen beruflichen und akademischen Werdegang und so auch diese Promotion überhaupt erst ermöglicht haben.

Mein erster Dank gilt den Vertreterinnen und Vertretern des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung des Universitätsklinikums Jena, die mir durch die Erteilung des Promotionsstipendiums den Freiraum gegeben haben die teils aufwändigen und zeitintensiven Experimente auch selbstständig und eigenhändig umzusetzen.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Senft, der auch in der Endphase der Dissertation stets verständnisvoll die „Finalisierung“ dieser Arbeit ermöglicht hat.

Mein Dank richtet sich auch an Frau Prof. Dr. Andrea Wittig, Frau Dr. Nasrin Abbasi-Senger und Herrn PD Dr. Tilo Wiezorek, die durch ihre Expertise und die Ressourcen dieses Projekt maßgeblich gefördert und ermöglicht haben

Mein ausdrücklicher Dank geht auch an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jan Walter, der als Arzt und Dozent nicht nur meine Begeisterung und Leidenschaft für die Neurochirurgie wecken konnte, sondern auch in all den Jahren aus der Nähe und der Ferne immer beratend zur Seite stand und stets eine Lösung für jedes Problem fand.

Zuletzt möchte ich mich zu tiefst bei Frau Dr. Diana Freitag bedanken: Sie war ständige Wegbegleiterin und Mentorin dieses Projekts. Ohne ihren Beitrag wäre diese Arbeit in dieser Form nicht realisierbar gewesen.

#### 11.4 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. Jan Walter

Dr. rer. Nat. Diana Freitag

Dr. rer. Pol. Thomas Lehmann (Statistik)

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Die Erstellung dieser Dissertation wurde durch ein Promotionsstipendium des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung des Universitätsklinikums Jena gefördert.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

## **11.5 CURRICULUM VITAE**

Zum Schutz von personenbezogenen Daten wird auf eine Veröffentlichung des Lebenslaufs an dieser Stelle verzichtet.