

Automatisierte Algorithmen zur Analyse der Migration und der
strahleninduzierten DNA-Schäden humaner Glioblastomzellen nach
kombinierter PI3K/mTOR/Hsp90-Inhibierung
(Titel der Dissertation)

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Simon Memmel
(Vor- und Familienname)

Mainz
(Geburtsort)

Würzburg, 2019
(Erscheinungsjahr der Dissertation)



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Professor Dr. C. S. Djuzenova

Gutachter: Professor Dr. M. Sauer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis	V
II. Tabellenverzeichnis	VI
III. Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	i
Zusammenfassung in Deutsch	i
Zusammenfassung in Englisch	iii
1 Einleitung	1
1.1 Glioblastoma Multiforme.....	3
1.2 Behandlung von Krebserkrankungen.....	4
1.2.1 Die Radiotherapie	5
1.2.1 Die zielgerichtete Therapie von Tumorzellen	8
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	11
2 Material	14
2.1 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.2 Zelllinien	16
2.3 Medien und Lösungen.....	16
2.3.1 Zellkultur	16
2.3.2 Fixierlösungen	18
2.3.3 Verwendete primäre und farbstoffgekoppelte sekundäre Antikörper	19
2.3.4 Inhibitoren.....	19
2.4 Verwendete Software.....	20
3 Methoden	22
3.1 Zellkultur.....	22
3.2 Röntgenbestrahlung der Zellen	22
3.3 Zeitrafferaufnahmen mit der Nikon BioStation IM.....	22
3.3.1 Einzelzellverfolgungsassay	23
3.3.2 Wundheilungsassay	23
3.4 Zellfixierung und -färbung	24

3.4.1 Zellfixierung und -färbung für Immunfluoreszenzaufnahmen.....	24
3.4.2 Zellfixierung und Phalloidin-F-Aktinfärbung	24
3.5 <i>d</i> STORM Messungen.....	25
3.6 Kolokalisationsmessungen F-Aktin vs. FAK.....	26
4 Ergebnisse	27
4.1 Untersuchung des Migrationsverhaltens von GBM-Zellen und Effekte der PI3K-, mTOR- und Hsp90-Inhibition.....	27
4.1.1 Etablierung eines modifizierten Einzelzellverfolgungssystems	27
4.1.2 Anwendung der automatischen Einzelzellverfolgung zur Untersuchung der Migration von DK-MG- und SNB19-Zellen unter PI3K/mTOR und Hsp90 Inhibition.....	37
4.1.3 Ausarbeitung einer neuen automatischen Methode zur Zellflächenlokalisierung im Wundheilungsassay	43
4.1.4 Anwendung des automatischen Algorithmus zur Untersuchung des Einflusses von PI3K /mTOR- und Hsp90-Inhibition auf die Migration von DK MG- und SNB19-Zellen im Wundheilungsassay	48
4.1.5 Effekte von PI3K/mTOR- und Hsp90-Inhibierung auf das F-Aktin- Zytoskelett und die FAK-Verteilung der Zellen.....	53
4.2 Untersuchung der Nanometer-Struktur und der zeitlichen Dynamik der DNA- Reparaturfoci	56
4.2.1 Quantitative Untersuchung von γ H2AX-Foci mit automatisierten Methoden	57
4.2.2 Auflösung der dreidimensionalen Struktur der γ H2AX Foci.....	60
4.2.3 FocAn-3D – Etablierung eines neuen Algorithmus für die dreidimensionale γ H2AX Analyse.....	63
4.2.4 Automatische Hochdurchsatz- γ H2AX-Focizählung in DK-MG- und SNB19-Zelllinien.....	75
4.2.5 γ H2AX- und DNA-PK-Foci in cLSM-Immunfluoreszenzaufnahmen.....	76
4.2.6 Auflösung der Nanometerstruktur von γ H2AX- und pDNA-PKcs- in DK- MG- und SNB19-Zellen mittels der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopiemethode <i>d</i> STORM	78
4.2.7 Nanofocicounter – Quantifizierung der hochaufgelösten γ H2AX-Nanofoci ...	79

5 Diskussion	83
5.1 Untersuchung des Migrationsverhaltens und der F-Aktinstruktur der DK-MG- und SNB19-Zellen mittels modifizierter und neuer Methoden	83
5.2 Nanometer-Struktur und zeitliche Dynamik der Doppelstrangbruchreparatur-Foci	86
6 Schlussfolgerung	92
Literatur	95
Abschlussarbeiten	105
Eigene Publikationen	106
Aus dieser Doktorarbeit hervorgegangen:	106
Nicht aus dieser Arbeit hervorgegangen:.....	106
Appendix	i
I TLA Wundheilungsassay Arbeitsablauf.....	i
II TLA Einzelzellverfolgung Arbeitsablauf	ii
II.2 Kalman Filter	iii
III Excelmakro für die Transformation der Daten vom TLA-Format zum Chemotaxis and Migration Tool Format	iv
IV Excelmakro für die zeitaufgelöste Verarbeitung der Daten.....	v
V Sourcecode für Focan-3D	viii
VI Sourcecode für den Nanofocicounter (basiert auf FocAn-3D).....	xiii
VII Repräsentative Westernblotts von verschiedenen Marker Proteinen	xiv
Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie	a
Danksagungen	b

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die sechs charakteristischen Merkmale von Krebszellen	1
Abbildung 2:	Nicht-homologe- und homologe-Rekombination während der DNA-Doppelstrangbruchreparatur	6
Abbildung 3:	Struktur, Aufbau und Mechanismen der Kraftgewinnung in der Lamella einer Zelle	10
Abbildung 4:	Kolokalisationsschema	26
Abbildung 5:	Schema der wichtigsten Schritte des TLA-Arbeitsablaufes bei der Einzelzellverfolgung	29
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Lokalisatorenverknüpfung über die Zeit	32
Abbildung 7:	Zellspuren von DK-MG-Zellen	35
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der Gesamtstrecke gegen die Nettostrecke	36
Abbildung 9:	Richtungspersistenz bei DK-MG- und SNB19-Zellen	37
Abbildung 10:	Effekte der PI3K/mTOR- und Hsp90-Inhibition auf die Motilität von DK-MG- und SNB19-Zellen gemessen durch die automatische Einzelzellverfolgung bei bestrahlten und unbestrahlten Proben	38
Abbildung 11:	Zeitabhängiger Einfluss der PI3K/mTOR- und Hsp90-Inhibition auf die Motilität von DK-MG- und SNB19-Zellen ermittelt durch Aufarbeitung der Einzelzellverfolgungsdaten	41
Abbildung 12:	Vergleich des Signalverlaufes zwischen Zellen in der Lauffront eines Wundheilungsassays	43
Abbildung 13:	Schema der wichtigsten Schritte des TLA-Arbeitsablaufes bei dem Wundheilungsassay	45
Abbildung 14:	Effekte der PI3K/mTOR- und Hsp90-Inhibition auf die Migration von bestrahlten (2 Gy) und unbestrahlten DK-MG- und SNB19-Zellen im manuell und automatisch ausgewertetem Wundheilungsassay	48
Abbildung 15:	Zeitlicher Verlauf der Wundheilung bei DK-MG- und SNB19-Zellen unter PI3K/mTOR- und Hsp90-Inhibition ermittelt durch die TLA basierte automatische Auswertung	51
Abbildung 16:	Effekte von PI-103 und AUY922 auf die F-Aktinstruktur und p-FAK-Verteilung in DK-MG- und SNB19-Zellen	54
Abbildung 17:	Schematische Darstellung einer Nukleusaufnahme mit gefärbtem γ H2AX ..	58
Abbildung 18:	Grauwert-Z-Projektion einer rausch-unterdrückten 2D- γ H2AX-Foci-Aufnahme	59
Abbildung 19:	3D-Rekonstruktion von cLSM-Aufnahmen von γ H2AX-Foci in DK-MG-Zellen nach 0° und 90° gekippter Probenkammer	61
Abbildung 20:	FocAn-3D Benutzerinterface	64
Abbildung 21:	Schematische Ablauf der in FocAn-3D verwendeten Methodik für die Erkennung von Nuklei und Foci	65

Abbildung 22: Binäre Signalartefakte in FocAn-3D.....	68
Abbildung 23: Beispiel der 3D-Wasserscheidentransformation bei einem überlappenden γ H2AX-Foci	69
Abbildung 24: Vergleich von der Fociauszahlung mittels FocAn-3D gegen eine händische point&click-Zählung in 2D und 3D sowie dem 2D-Zählprogramm FoCo	72
Abbildung 25: Automatische Fociauszahlung von DK-MG- und SNB19-Zellen	76
Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbungen von γ H2AX, DNA-PKcs und pDNA-PKcs in DK-MG- und SNB19-Zellen.....	77
Abbildung 27: Repräsentative <i>d</i> STORM-Rekonstruktionen von γ H2AX-, pDNA-PKcs-, in DK-MG- und SNB19-Zellen.....	78
Abbildung 28: Schema der wichtigsten Schritte im Nanofocicounter für die Analyse von Nanofoci am Beispiel von γ H2AX.....	80
Abbildung 29: Verteilung der Nanofoci-Durchmesser von DK-MG- und SNB19-Zellen 30 min und 6 h nach Bestrahlung mi 2 Gy.....	81
Abbildung 30: Auszahlung der γ H2AX-Nanofoci pro Foci.....	82
Abbildung 31: Repräsentative Westernblotts von verschiedenen Markerproteinen in DK-MG- und SNB19-Zellen.....	xiv

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hersteller der zur Zellkultur verwendeten Lösungen.....	16
Tabelle 2: Zellkulturmedien	17
Tabelle 3: Fixierlösungen	18
Tabelle 4: Schaltpuffer für <i>d</i> STORM Aufnahmen.....	18
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Antikörper und Farbstoffe	19
Tabelle 6: Verwendete Inhibitoren.....	19
Tabelle 7: Verwendete Computerprogramme	20
Tabelle 8: Eigenentwickelte Skripte und Plugins.....	21

III. Abkürzungsverzeichnis

γ H2AX	An Serin 139 phosphorylierte Form der Histonvariante H2AX
a-NHEJ	Alternative nicht homologe Endverknüpfung
c-NHEJ	Klassische nicht homologe Endverknüpfung
cLSM	Konfokale Laserscanningmikroskopie
DNA-PK	DNA abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	Katalytische Untereinheit der DNA abhängigen Proteinkinase
pDNA-PKcs	phosphorylierte Forme der Katalytische Untereinheit der DNA abhängigen Proteinkinase
DSB	Doppelstrangbruch
dSTORM	direkte stochastische Rekonstruktionsmikroskopie
EZM	Extrazelluläre Matrix
FA	Fokale Adhäsion
FAK	Fokale Adhäsionskinase
H2AX	Histonvariante H2AX
HR	Homologe Rekombination
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IR	Ionisierende (Be)strahlung
mut	funktionelle Mutation
Mre11	Doppelstrangbruchreparaturprotein Mre11
MRN	Proteinkomplex aus Mre11, Rad50 und Nbs1
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier (Proteinkomplex u. Masterregulator)
Nbs1	Nibrin
p53	Tumorsuppressorprotein
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PTEN	Phosphatase- und Tensin-homolog

Rad50	DNA Reparaturprotein
Rad51	DNA Reparaturprotein
ROI	Region des Interesses (Region of interest), ein ausgewählter Bereich in einem Bild
RPA	Replikationsprotein A
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
WST	Wasserscheidentransformation
wt	Wildtypisch
ZP	Zytoskelettpuffer

Zusammenfassung

Zusammenfassung in Deutsch

Das hohe invasive Potential und die starke Resistenz gegen Radio-/Chemotherapie von Glioblastoma multiforme (GBM) Zellen machen sie zu dem tödlichsten Tumor ihrer Art. Es ist deshalb von großem Interesse die Grundlagen, welche der Migrationsfähigkeit und DNA Reparatur zu Grunde liegen, besser zu verstehen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zwei Algorithmen zur automatischen Analyse der Migration in der Einzelzellverfolgung und im Wundheilungsassay modifiziert. Die Auswertung der Daten konnte automatisch und somit schnell, effektiv und mit geringerem Arbeitsaufwand durchgeführt werden. Mit Hilfe dieser automatischen Algorithmen wurde die Migrationsfähigkeit von zwei GBM-Zelllinien (DK-MG und SNB19) untersucht. Zusätzlich wurde die konfokale Laserscanning- sowie die hochauflösende *d*STORM-Fluoreszenzmikroskopie verwendet um die, der Zellbewegung zu Grunde liegende, Struktur des F-Aktin und der fokalen Adhäsionskinase (FAK) aufzulösen und darzustellen. Unter Anwendung dieser genannten Methoden sind die Effekte des dualen PI3K/mTOR Inhibitors PI-103 alleine und in Kombination mit dem Hsp90 Inhibitor NVP-AUY922 mit und ohne Bestrahlung auf die Bewegung untersucht worden. Es konnte festgestellt werden, dass sich beide Zelllinien deutlich in ihrem migratorischem Potential *in vitro* unterscheiden und zudem auch markante Unterschiede in ihrer Morphologie aufweisen. Die weniger invasiven DK-MG-Zellen besitzen eine polarisierte Zellstruktur, wohingegen SNB19-Zellen sich durch multipolare ungerichtete Bewegung auszeichneten. Zudem wurde die Migration, durch PI3K/mTOR Inhibition mit PI-103 bei den DK-MG-Zellen (*p53* wt, *PTEN* wt), sehr effektiv unterdrückt. Wohingegen sich die SNB19-Zellen (*p53* mut, *PTEN* mut) resistent gegen diesen Inhibitor zeigten. Hsp90-Inhibition offenbarte in beiden Zelllinien einen starken inhibitorischen Effekt auf die Migration der Zellen sowie die Reorganisierung des F-Aktinskelettes.

In der zweiten Hälfte dieser Arbeit wurde ein Augenmerk auf die DNA-DSB-Reparatur der GBM Zellen nach ionisierender Strahlung gelegt. Zunächst wurde eine automatische Analysesoftware „*FocAn-3D*“ entwickelt, mit dessen Hilfe die DNA Doppelstrangbruchreparaturkinetik untersucht werden sollte. Diese Software ermöglicht es die gesamten Zellkerne mit ihren γ H2AX-Foci in 3D-cLSM-Aufnahmen zu untersuchen. Es konnte somit eine Verbesserung der Genauigkeit in der Auszählung der γ H2AX-Foci erreicht werden, welche 2D beschränkter Software verwehrt bleibt. Mit *FocAn-3D* konnte der gesamte Verlauf der Induktions- und Abbauphase der γ H2AX-Foci in DK-MG- und SNB19-Zellen mit einem mathematischen Modell ausgewertet und dargestellt werden. Des Weiteren wurde die Nanometerstruktur von γ H2AX- und pDNA-PKcs-Foci mittels hochauflösender *d*STORM-Mikroskopie untersucht. Konventionelle Mikroskopiemethoden, begrenzt durch das Beugungslimit und einer Auflösung von ~ 200 nm, konnten die Nanometerstruktur (<100 nm)

der Reparaturfoci bisher nicht darstellen. Mit Hilfe der beugungsunbegrenzten *d*STORM-Mikroskopie war es möglich in DK-MG- und SNB19-Zellen die Nanometerstruktur genannten Reparaturproteine in den Foci mit einer Auflösung von bis zu ~20 nm darzustellen. γ H2AX-Foci zeigten sich als eine Verteilung aus einzelnen Untereinheiten („Nanofoci“) mit einem Durchmesser von ~45 nm. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich hier um die elementare Substruktur der Foci und somit der γ H2AX enthaltenen Nukleosome handelt. DNA-PK-Foci wiesen hingegen eine diffusere Verteilung auf.

Die in dieser Arbeit ermittelten Unterschiede im Migrationsverhalten der Zellen rechtfertigen eine weitere präklinische Untersuchung der verwendeten Inhibitoren als potentielle Zelltherapeutika für die Behandlung von GBM. Zudem konnte sich *d*STORM als machtvolles Hilfsmittel, sowohl zur Analyse der Migration zugrundeliegenden Zytoskelettstruktur und der Effekte der Hsp90 Inhibierung, als auch, der Nanostruktur der DNA-DSB-Reparaturfoci herausstellen. Es ist anzunehmen, dass beugungsunbegrenzte Mikroskopiemethoden sich als bedeutende Werkzeuge in der medizinischen und biologischen Erforschung der DNA-Reparaturmechanismen herausstellen werden. Das in dieser Arbeit entwickelte ImageJ Plugin „*FocAn-3D*“ bewies sich ebenfalls als vielversprechendes Werkzeug für die Analyse der Reparaturkinetik. Mit Hilfe von „*FocAn-3D*“ sollte es somit möglich sein u.a. den Einfluss gezielter Inhibition auf den zeitlichen Verlauf der Induktion und des Abbaus der DNA-Reparaturmaschinerie genauer zu studieren.

Zusammenfassung in Englisch

The high invasive Potential and increased resistance to radio- and chemotherapy of glioblastoma multiforme (GBM) tumor cells make it the most lethal of all primary brain tumors. It is therefore of great interest to gain a better understanding of the mechanisms facilitating the migration and DNA repair.

In the first part of this study, two algorithms for single cell tracking and wound healing assays were modified to increase effectiveness and speed of the automatic data analysis. The migratory capacity of the two GBM cell lines, DK-MG and SNB19, were analyzed using these automatic algorithms. In addition, employing confocal microscopy and high resolution *d*STORM imaging, the underlying F-actin/FAK structure was resolved and studied. Together, these automatic algorithms enabled me to elucidate the effects of the dual PI3K/mTOR inhibitor PI-103 alone and in combination with the Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 and/or irradiation on the migration, focal adhesions and F-actin cytoskeleton of DK-MG and SNB19 cells. Both cell lines differ markedly in their migratory capacity *in vitro* and display distinctive differences in their morphology. The less invasive DK-MG cells retained their polarized structure, while SNB19 cells demonstrate multipolar morphology with random migration. The PI3K/mTOR Inhibition using PI-103 suppressed migration of the *PTEN* wt and *p53* wt DK-MG cells but not of the *PTEN* mut and *p53* mut SNB19 cells. In contrast, Hsp90 inhibition using NVP-AUY922 exerted a strong inhibitory effect on the migration in both cell lines as well as massive morphological changes and reorganization of the F-actin cytoskeleton.

The second part of this study was designed to gain further insights in the DNA double strand break (DSB) repair of both GBM cell lines. The DNA DSB repair kinetics were analyzed using the novel software “*FocAn-3D*”. The software enables the 3D analysis of foci in entire nuclei using cLSM-imaging. This in turn results in increased accuracy of the foci counts, compared to approaches restricted to 2D. Using the new software approach, I was able to determine the whole γ H2AX-foci induction and decay process and apply a well described mathematical model for the γ H2AX-foci repair kinetics. Additionally, diffraction unlimited microscopy (*d*STORM) was applied to resolve the nanometer scale of the foci forming repair proteins γ H2AX and DNA-PK. Although conventional microscopy is able to reveal the repair foci as diffuse spots, the underlying protein distribution is well beyond the diffraction limit of ~ 200 nm. In this study, using the diffraction unlimited *d*STORM microscopy with a lateral resolution of ~ 20 nm, it was possible to resolve the nanometer scale of both γ H2AX and DNA-PK. γ H2AX foci appeared not as diffuse spots, but rather as a distribution of distinct subunits (“nanofoci”). In contrast DNA-PK mostly showed a more diffuse distribution. The nanofoci diameter was about ~ 45 nm and it can be concluded that these clusters represent the elementary structural subunits of repair foci, the γ H2AX-containing nucleosomes.

Using the newly developed or modified algorithms for the analysis of cell migration, I was able to show a cell line specific response of the PI3K/mTOR inhibition on the cell migration. This warrants further preclinical trials for its potential as an anti-migratory agent in the treatment of GBM. In addition, *d*STORM emerged as a powerful tool for the analysis of the cytoskeletal structure, underlying the cells migration capacity and the effects of Hsp90 inhibition. Also, *d*STORM was able to unravel the elementary nanostructure of the DSB repair foci. This means diffraction unlimited single-molecule localization nanoscopy methods will likely emerge as powerful tools for the analysis of targeted inhibition on the DSB repair mechanisms. In addition, the newly developed software “*FocAn-3D*” showed promising results in the analysis of Foci kinetics. Consequently, it should enable the future study of targeted inhibition and its effects on foci induction and decay processes of the DNA repair.

1) Einleitung

Nichtübertragbare Krankheiten sind mit ca. 86% der Todesfälle in Europa für die Mehrzahl der natürlichen Tode verantwortlich [1,2]. Krebserkrankungen nehmen hierbei einen immer größeren Anteil ein und es wird erwartet, dass sie als die führende Todesursache und wichtigste Barriere in der Erhöhung der Lebenserwartung im 21. Jahrhundert zählen werden [3]. Laut den Krebsstatistiken des Krebsinformationsdienstes des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) erkrankten im Jahr 2014 in Deutschland ca. 476120 Menschen an Krebs. Im Jahr 2018 ist ein Anstieg auf etwa 493600 Krebsneuerkrankungen zu erwarten. Bei weiblichen Patientinnen zählt Brustkrebs zu der führenden letale Krebserkrankung wohingegen bei männlichen Patienten Tracheal-, Bronchial- und Lungenkrebs die Spitze anführen [4].



Abbildung 1: Die sechs charakteristischen Merkmale von Krebszellen

Dieses Schema umfasst die sechs charakteristischen Merkmale, welche normale Zellen von Krebszellen unterscheiden. Die beschriebenen Fähigkeiten stellen ein Ordnungsprinzip dar, um die hochkomplexen Prozesse in neoplastischen Krankheiten zusammenzufassen. Rot umrandet sind die Charakteristika krebsartiger Zellen welche in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

Modifiziert nach Figure 1, D. Hanahan, R.A. Weinberg, Cell. 144 (2011).

Tumorzellen im Allgemeinen unterscheiden sich, wie vereinfacht in Abb. 1 dargestellt, durch sechs charakteristische Merkmale welche eine Tumorzelle von einer nicht-malignen Zelle unterscheiden [5]. Das wohl grundlegendste Merkmal von Krebszellen ist die Aufrechterhaltung der proliferativen Signalwege aufgrund dessen die Zellen unabhängig von Wachstumssignalen des umliegenden Gewebes werden und sich folglich mit hoher Rate teilen können.

Zusätzlich zur Aufrechterhaltung der proliferativen Signalwege ist die Suppression von den vielen wachstumshemmenden Signalwegen von Nöten, um ihre hochgefahrenen Proliferationsrate aufrecht zu erhalten [5]. Eines der bekanntesten und in diese Kategorie passenden Proteine ist p53. Dieses Protein ist das Haupttumorsuppressorprotein des menschlichen Körpers und wurde ursprünglich fälschlicherweise den Onkogenen zugewiesen. Es stellte sich allerdings heraus, dass das natürliche p53 tatsächlich eine Tumorsuppressorfunktion besitzt und inaktives p53 für die onkogenen Effekte verantwortlich war [6]. Genauer betrachtet ist p53 ein Transkriptionsfaktor, welcher sowohl in der Regulierung des Zellzyklus als auch in der Einleitung des apoptotischen Zelltodes nach erkannten DNA-Schäden verantwortlich ist.

Die Beteiligung von p53 an der Auslösung des Apoptose-Apparates bedeutet, dass dem Funktionsverlust von p53 hier ebenso eine Rolle in der Apoptose-Resistenz der Tumorzellen zugeordnet werden kann. In nicht-malignen Zellen gibt es einen extrinsischen- und intrinsischen Apoptose-Signalweg, welche den kontrollierten Zelltod als Antwort auf externe oder interne Prozesse, wie z.B. DNA-Schäden, initiieren können. Beide sind für Tumorzellen in der Regel unterbrochen oder gestört [7] und stellen ein großes Problem in der Chemo- und Radiotherapie dar. In beiden Therapien wird in der Regel versucht, gezielt die Tumorzellen mit ihrer hohen Teilungsrate gezielt zu schädigen, dass eben diese apoptotischen oder andernfalls nekrotischen Prozesse im Tumorgewebe ausgelöst werden.

Ein weiteres Kennzeichen von Tumorzellen ist die Angiogenese, welche für die optimale Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff verantwortlich ist. Die Angiogenese wird sowohl durch Aktivator- als auch Inhibitor-Moleküle gesteuert und die Expressionslevel dieser Moleküle kann direkt mit der Aggressivität des jeweiligen Krebstyps in Verbindung gebracht werden [8].

Ein weiteres charakteristisches Merkmal von Tumorzellen ist die Aktivierung invasiver und metastatischer Prozesse. Man spricht hier von Invasion, wenn die Tumorzellen einzeln in das direkte umliegende Gewebe auswandern und von Metastasierung, wenn die Zellen über z.B. das Lymphsystem oder das vaskuläre System andere entfernte Organe und Gewebe befallen. Die Metastasierung und Invasion ist eine der Haupttodesursachen bei krebsartigen Erkrankungen [9]. Somit ist die Inhibierung der invasiven/metastatischen Prozesse oder direkte Behandlung der Metastasen logischerweise eines der primären Ziele bei der Behandlung von Krebserkrankungen.

1.1 Glioblastoma Multiforme

Gliomas stellen die häufigste Form (ca. 80%) der Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) dar, wovon die Hälfte dem extrem aggressiven Subtyp Glioblastoma Multiforme (GBM) entsprechen [10,11]. GBM sind verbunden mit einer durchschnittlichen mittleren Überlebenszeit von 15 Monaten, selbst nach subtotaler Resektion sowie Chemo- und Radiotherapie [12–14]. GBM zeichnen sich besonders durch erhöhte Radioresistenz verglichen mit dem umliegendem Gewebe [15] und ihre hohen Invasivität aus [16]. Obwohl GBM nahezu nie Metastasen außerhalb des ZNS bilden (~0.44% aller GBM) [17] zählt ihre hohe Invasivität zu ihren zerstörerischsten Eigenschaften. Aufgrund ihrer diffusen Infiltration in das umliegende Hirngewebe ist es nahezu unmöglich alle entarteten Zellen chirurgisch zu entfernen. Dies trifft zu, selbst wenn der Tumor in Bereichen des ZNS auftritt in der eine umfangreiche Resektion möglich ist [18]. Des Weiteren ist aufgrund der besonderen Lage im ZNS die Radiotherapie bedingt durch die geringen Regenerationsfähigkeit des Nervengewebes nur begrenzt einsetzbar und mit starken Nebenwirkungen verbunden [15,19]. Die Kombination dieser beiden Eigenschaften erklärt warum eine Behandlung zwar die durchschnittliche Überlebenszeit erhöht, allerdings nur in seltenen Fällen eine Heilung verspricht.

Die Mechanismen welche der Radioresistenz und der hohen Invasivität der GBM Zellen zugrunde liegen sind bisher noch nicht genau geklärt [18]. Aufgrund ihrer genetischen Instabilität besitzen GBM Zellen häufig mehr als 60 genetische Veränderungen, was eine Zuordnung von Ursache und Wirkung erschwert [20]. Betroffene Proteininteraktionswege dieser Mutationen beinhalten eine Fehlregulierung der Rezeptortyrosinkinase (RTK), der phosphatase- und tensin-homologe PTEN und PI3K sowie inaktiviertes p53.

Der Tumorsuppressor *PTEN* liegt in mehr als 30% aller GBM deletiert oder mutiert vor. Wildtypisches *PTEN* wird mit einer Unterdrückung der Zellmigration, Spreitung und der Bildung von fokalen Adhäsionen assoziiert [21]. Seine Rolle in der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen ist hingegen bisher noch nicht genau geklärt [22]. PTEN spielt auch eine Rolle in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), insbesondere bei der NHEJ. Es konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von *PTEN* auch mit einer Defizienz der NHEJ einhergeht [23]. Eine erhöhte Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR Signalweges durch PTEN Verlust kann nachweislich mit einer erhöhten Migrationsfähigkeit durch Verlust des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 4E Bindungsproteins (4E-BP1) oder Aktivierung der p70 ribosomalen S6 Proteinkinase 1 (S6K1) in Verbindung gebracht werden [24]. 4E-BP1 besitzt eine negativ Regulierende und S6K1 eine positiv regulierende Funktion auf die Migration der Zellen [24].

p53 entspricht dem am zweithäufigsten mutierten Gen in GBM-Zellen [12]. p53 besitzt zum einen eine Tumorsuppressorfunktion indem es die Apoptose als Antwort auf DNA-Schäden oder Stress einleiten kann. Zum anderen besitzt p53 eine Rolle als Transkriptionsfaktor welcher

eine große Anzahl von Genen und microRNAs aktivieren oder deaktivieren kann [25]. Es bestehen in der Literatur allerdings widersprüchliche Aussagen über den Effekt des p53-Funktionsverlustes in Bezug auf die Behandlung der GBM Zellen [26]. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass einige der am häufigsten auftretenden Mutationen in *p53* zwar den Effekt von p53 auf die Transkription zerstörten allerdings einen aktivierenden Effekt auf die Migration und Metastasierung der Zellen hinzufügten [27,28]. Der Effekt von p53 auf die Bewegung wird primär durch die Rho-Signalkaskade vermittelt und weist zudem einen Effekt auf die F-Aktinzytoskelettorganisation auf [29]. p53 verhindert somit die Bildung von Filopodien, Zellspreitung, Migration und Invasion. Der Verlust von p53-Funktion führt ferner zu einer erhöhten RhoA- und Rac-Aktivität durch die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR Signalweges und führt auch zu einem Überschuss von Cdc42 abhängigen Filopodien [30].

1.2 Behandlung von Krebserkrankungen

Das größte Problem in der Behandlung von Krebserkrankungen, wie z.B. GBM, ist es gezielt die malignen Zellen zu erreichen, ohne dabei die normalen Körperzellen zu schädigen. Es werden daher Ansätze entwickelt und angewendet, um besonders die sechs charakteristischen Merkmale der Tumorzellen (siehe Abb. 1) auszunutzen [31]. Da die Tumorzellen sich durch diese Merkmale von nicht-malignen Zellen unterscheiden, können sie gezielter behandelt werden. Dies setzt eine personalisierte Diagnose voraus, welche die genaue Lokalisierung des Tumors und Bestimmung der Tumorgöße, so wie die frühe Erkennung von Invasion/Metastasierungen, als auch die molekularbiologische Charakterisierung der Tumorzellen beinhaltet [32]. Aufbauend auf dieser Diagnose kann dann die erfolgversprechendste Art der Behandlung gewählt werden.

Die chirurgische Resektion des Krebsgeschwürs ist je nach Art und Position des Tumors immer noch in Kombination mit der Radio-/Chemotherapie die Behandlungsmethode der ersten Wahl [33]. Hierbei wird der Tumor je nach Möglichkeit vollständig entfernt und die Resektionsstelle fraktioniert bestrahlt. In der Radiotherapie wird der Tumor ionisierender Strahlung ausgesetzt, um DNA-Schäden zu erzeugen, welche im optimalen Fall den Zelltod einleiten [34]. Die Chemotherapie richtet sich gegen die spezifischen Charakteristika der Tumorzellen mit dem Ziel deren Wachstum zu inhibieren, sie abzutöten oder den Patienten symptomatisch zu behandeln. Im Gegensatz zur Radiotherapie, welche gezielt eingesetzt werden kann, ist der Effekt der Chemotherapie immer systemisch und mit entsprechenden off-target Effekten und Nebenwirkungen verbunden.

Eine neuere Behandlungsmethode ist die zielgerichtete Therapie mit kleinen molekularen Inhibitoren oder Antikörpern [31,35]. Hierbei werden Aberrationen der Tumorzellen, wie fehlgesteuerte Proteinsignalwege, gezielt behandelt um deren charakteristische Merkmale zu unterdrücken. Dies zielt darauf ab die Tumorzellen empfänglicher für andere Behandlungsmethoden, wie z.B. die Radio-/Chemotherapie, zu machen oder sie direkt

abzutöten [31,35]. Hierfür ist es allerdings von besonderer Bedeutung die in den Tumorzellen fehlgesteuerten Signalprozesse genau zu verstehen um sie mit den Inhibitoren gezielt steuern zu können [31,32,35].

1.2.1 Die Radiotherapie

Die klinische Radiotherapie zielt darauf ab die erhöhte Teilungsrates der Zellen, aufgrund der überaktiven proliferativen Signalwege (Abb. 1), auszunutzen um die Zellen möglichst systematisch abzutöten. Hierbei können verschiedene ionisierende Strahlungen, von Gammastrahlung über Röntgenstrahlung bis hin zu Protonen und Schwerionen, eingesetzt werden, um möglichst gezielt eine Anhäufung von DNA-Schäden in den Tumorzellen zu erzeugen [36–38]. Nachteilig für die Behandlung betreffen diese DNA-Schäden alle Zellen im bestrahlten Bereich und führen daher auch in gesundem Gewebe zu einer Anhäufung von DNA-Schäden. Dies kann im schlimmsten Fall zur Entartung der Zellen führen. Daher ist es in der Radiotherapie besonders wichtig, die Bestrahlungsplanung entsprechend aufzubauen, um eine Maximierung der DNA-Schäden im Tumorgewebe und gleichzeitig eine Minimierung im gesunden Gewebe zu erreichen [39]. DNA-DSB gehören hierbei zu den schwerwiegendsten Veränderungen der DNA in Folge von Bestrahlung. Ohne präzise und schnelle Reparaturmechanismen führen sie zu genomischer Instabilität und somit unter anderem zu chromosomalen Translokationen [40,41] und resultieren meist im Zelltod der betroffenen Zelle [42].

Aufgrund der erhöhten Teilungsrates stehen Tumorzellen jedoch, verglichen mit normalen Zellen, unter einem erhöhten Druck die DNA Schäden schnell und effektiv zu reparieren [43]. Zum einen kann es in Folge der Bestrahlung zu einer Reduzierung der Teilungsrates kommen, was ebenfalls gewissermaßen einem Behandlungsteilerfolg gleichkommt [42,43]. Zum anderen führen diese Formen von DNA Schäden bei Krebszellen, verglichen mit normalen Zellen, vermehrt zum Zelltod [43]. Normale Zellen besitzen aufgrund ihrer niedrigeren Teilungsrates mehr Zeit für die Reparatur und sind verglichen mit Tumorzellen einem geringeren Stresslevel ausgesetzt. Beides ist förderlich für einen erfolgreichen Abschluss der DNA-Reparatur und erklärt zudem warum nicht-maligne Zellen in der Regel weniger auf die Bestrahlung reagieren [43]. Für die gezielte Schädigung und Tötung der Tumorzellen wird deren geringere Strahlenresistenz verglichen zu normalen Zellen in Kombination mit einer präzisen Bestrahlungsplanung zur Reduzierung der Strahlungslast auf das umliegende Gewebe ausgenutzt [43].

Dennoch ist es von großem Interesse die zugrundeliegenden DNA-Reparaturmechanismen besser zu verstehen, um Wege zu finden diese in Krebszellen gezielt inhibieren zu können. Dies würde es ermöglichen, die nötige Gesamtdosis in der Radiotherapie auf das minimal nötige zu verringern.

Reparaturmechanismen der DNA Doppelstrangbrüche

Menschliche Zellen sind täglich einer großen Zahl von DNA Schäden ausgesetzt. Sie besitzen aufgrund der katastrophalen Folgen dieser Schäden eine Reihe von ineinander verzahnten, hoch effizienten DNA-Reparaturmechanismen. Diese sind notwendig um die genomische Stabilität aufrechtzuerhalten [46]. DNA-DSB stellen hierbei die schädlichste Form der DNA-Läsionen und werden durch die nicht-homologe-Rekombination (NHEJ) und homologe-Rekombination (HR) (Abb. 2) schnell und effizient repariert.

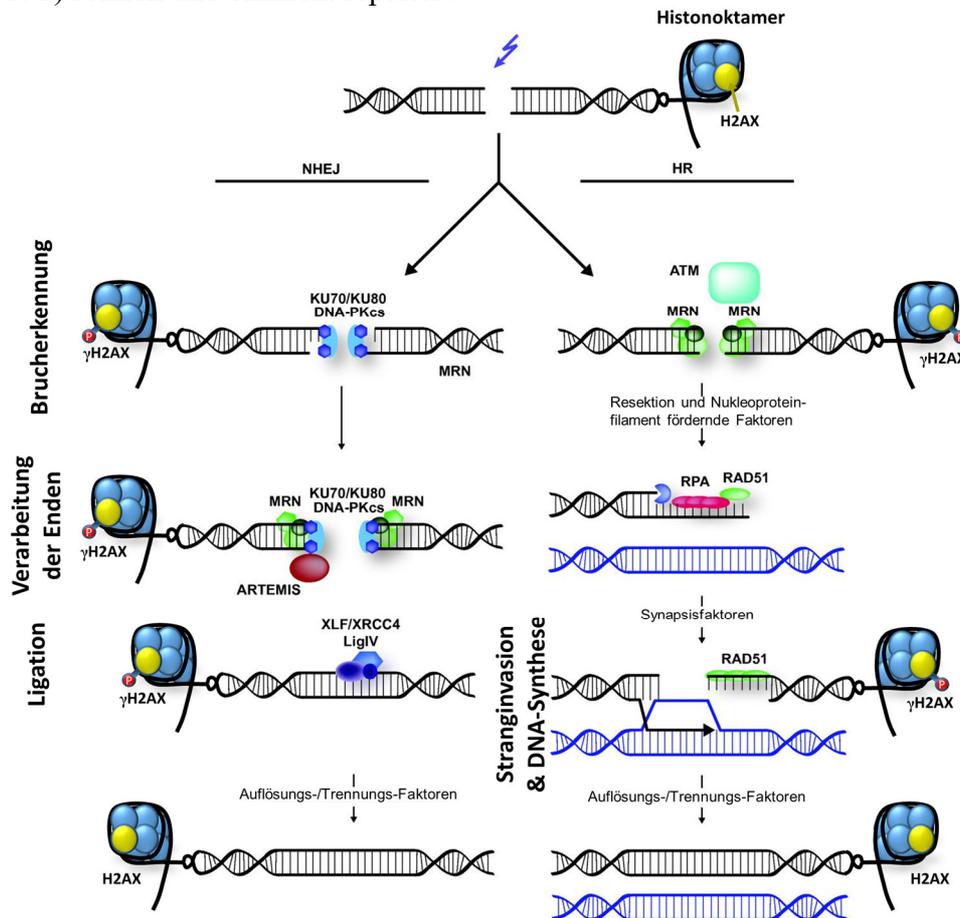


Abbildung 2: Nicht-homologe- und homologe-Rekombination während der DNA-Doppelstrangbruchreparatur

DNA-Doppelstrangbrüche werden überwiegend durch zwei miteinander konkurrierende Reparaturmechanismen repariert. In Folge des DNA Bruches kommt es im Bereich von 2 Mbp bis 30 Mbp [44] Strang auf und abwärts zur Phosphorylierung der Histone H2AX an Serin 139 (γ H2AX – gelb hervorgehoben). Zum einen wird die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) zur Reparatur verwendet in der die Bruchenden direkt miteinander Verknüpft werden. Dies benötigt häufig einen Trimmungsschritt vor der Ligation was zum Verlust genetischer Information führen kann. Bei der NHEJ binden KU70/80 an die Bruchenden und steuern Reparaturfaktoren wie DNA-PKcs und Artemis. Der MRN-Komplex, bestehend aus Mre11-Rad50-NBN1, bindet ebenfalls und dient als stabilisierendes Gerüst zwischen den Bruchenden, γ H2AX und umgebender DNA. Die HR beginnt mit einer Resektion an den Bruchenden um den Austausch der Schwesterchromatid-DNA vorzubereiten. Der MRN-Komplex spielt auch hier eine wichtige stabilisierende Rolle. Aufgrund des DNA-Austausches ist die HR ein nahezu fehlerfreier Mechanismus welcher allerdings nur in der späten S und G₂ Phase stattfinden kann. Rad51 fördert hierbei die Stranginvasion welche zur Synapsis und DNA-Synthese führt. Modifiziert nach Figure 3 [45]; Lans et al., Epigenetics & Chromatin (2012) [CC BY 4.0].

Bei Eukaryoten in direkter Konkurrenz stehend und signifikant häufiger verwendet ist jedoch die NHEJ. Grund hierfür mag wohl die erhöhte Reparaturgeschwindigkeit und Anwendbarkeit über den gesamten Zellzyklus sein [47–49]. NHEJ unterteilt sich zudem noch in den „klassischen“ Ablauf (c-NHEJ), welche den Hauptreparaturmechanismus in allen Vertebraten stellt, und den alternativen Ablauf (a-NHEJ) welcher langsamer und fehleranfälliger ist [47]. Somatische Zellen investieren somit eine große Menge an Ressourcen für zum Teil redundante Reparaturmechanismen um dem meist letalen Ausgang unreparierter DSB entgegenzuwirken.

Die HR, im Gegensatz zur NHEJ, benötigt die Anwesenheit des Schwesterchromatides (Abb. 2, HR, blauer Strang) als Vorlage für die fehlerfreie Reparatur. Folglich ist diese Art der DSB-Reparatur nur in der späten S und G₂-Phase des Zellzyklus, in der die Chromosomen dekondensiert vorliegen, möglich und verglichen mit der NHEJ relativ langsam [47]. Die HR beginnt mit einer Resektion der Bruchenden, in welcher der MRN Komplex (Mre11, Rad50 und Nbs1) stabilisierende und rekrutierende Funktionen übernimmt [50]. Nach der Resektion wird die einzelsträngige DNA durch das Replikationsprotein A (RPA) gebunden. RPA wird im Folgenden mit Rad51 ausgetauscht was zu der Bildung der Synapsis zwischen den beiden Schwesterchromatiden führt und die Invasion des homogen DNA-Stranges durch Rad51 vorantreibt gefolgt von der Neusynthese der DNA [45].

Im Zentrum dieser genannten Reparaturmechanismen stehen u.a. das Histon H2AX und das Reparaturprotein DNA-PK [51–53]. H2AX ist eine seltene Form des Histons H2A und macht etwa ~10%, abhängig vom Zelltyp, des gesamten H2A-Gehalts der Zelle aus [51]. H2AX wird als Antwort auf einen DSB an Serin 139 phosphoryliert [41]. Dies geschieht im Minutenbereich, in einer Region von 2 Megabasenpaaren (Mbp) bis zu ~30 Mbp vor und hinter der Bruchstelle [44,54]. Phosphoryliertes H2AX wird im Folgenden als γ H2AX bezeichnet. Phosphorylierung des Histon H2AX ist die Voraussetzung für die Anreicherung vieler weiterer DNA-Reparaturproteine um die Bruchstelle und nimmt somit eine wichtige Rolle in der Reparatur ein [51]. Wird das γ H2AX immunfluoreszent markiert und mikroskopisch untersucht, sind die γ H2AX-Moleküle als Cluster, so genannte γ H2AX-Foci, zu erkennen. Es ist bereits beschrieben, dass jeder dieser sichtbaren Foci genau einem DSB entspricht [55]. γ H2AX kann somit sowohl korrelativ, durch die Bestimmung des gesamten γ H2AX-Gehaltes in Durchflusszytometrie- oder Westernblott-Versuchen, als auch direkt, durch Auszählung der einzelnen γ H2AX-Foci in Immunfluoreszenzbildern, zur Bestimmung der DSB-Menge verwendet werden.

DNA-PK ist ein Reparaturprotein welches speziell im Reparaturproteinkomplex des NHEJ eine wichtige Stellung einnimmt [47,49]. Neuere Untersuchungen zeigen allerdings auch, dass DNA-PK, mit seinen über 40 Phosphorylierungsstellen, eine regulatorische Rolle für die selektive Aktivierung und Inhibierung des NHEJ als auch der HR spielt [56]. Im NHEJ füllt DNA-PK eine wichtige Position im DSB-Reparaturmultiproteinkomplex in dem es die Bruchstelle beschützt und für die Reparatur ausrichtet [47,57–59]. Zudem orchestriert die

Phosphorylierung von DNA-PK den Zugang für andere Reparaturproteine zur Bruchstelle [47] indem es eine Stützfunktion für die Rekrutierung und Lokalisierung anderer Reparaturproteine zur Bruchstelle liefert [60].

Die beschriebene effektive Reparatur von DSBs stellt ein großes Problem in der Radiotherapie dar. Einige Tumorentitäten, wie zum Beispiel Gliomas, sind bekannt für ihre hohe Radioresistenz und damit verbundenen schlechteren Erfolg der Strahlentherapie [10]. Die genauen Hintergründe warum einige Krebstypen resistenter gegen ionisierende Strahlung sind bleibt bis heute Schleierhaft [15]. Es weist allerdings einiges daraufhin dass Proteininteraktionswege wie der PI3K/AKT/mTOR oder ATM/Chk2/p53 eine wichtige Rolle spielen [10]. Es ist daher von großem Interesse die genauen Hintergründe der DNA Reparaturmechanismen und deren Verknüpfung mit den Proteininteraktionswegen genauer zu verstehen, um die Radioresistenz von Krebszellen gezielt reduzieren zu können.

1.2.2 Die zielgerichtete Therapie von Tumorzellen

Das wachsende Verständnis der komplexen Netzwerke aus Proteininteraktionen und regulierenden Faktoren, welche im Zentrum der Krebsentstehung stehen, öffnen neue Möglichkeiten in der Behandlung von Krebserkrankungen [31]. Hierbei werden neue Medikamente eingesetzt die darauf ausgelegt sind gezielt in die spezifischen Proteininteraktionen einzugreifen welche für die charakteristischen Merkmale (Abb. 1) der Tumorbildung verantwortlich sind. Die Identifizierung eines zur Behandlung geeigneten Proteins erfordert ein genaues Verständnis des jeweils zugrundeliegenden Krebstyps und dessen fehlgesteuerten Signalwege. Häufig werden hierbei Signalkaskaden als Ziel ausgewählt [31]. Dies beinhaltet den PI3K-/AKT-/mTOR-Signalweg, Proteine der Stressantwort wie Hsp90, Wachstumsfaktoren wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGFR) oder Zellzyklusregulatoren wie die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK [31]. Sowohl eine Inhibierung von mTOR sowie Hsp90 sind in diesem Zusammenhang besonders vielversprechend. mTOR ist das Schlüsselglied bzw. der Masterregulator vieler verschiedener Signalwege beteiligt wohingegen Hsp90 als Chaperon in der Stressantwort als Hilfe und Puffer für die Faltung vieler verschiedener Proteine bereit steht [61,62]. Allerdings kann die Inhibierung eines Proteins in einer Signalkaskade durch Rückkopplungsschleifen im Signalpfad ausgeglichen werden. Aus diesem Grund hat sich besonders die Kombination mit zwei oder mehr Inhibitoren, um mehrere Signalkaskaden parallel inhibieren zu können, als erfolgreich erwiesen [63,64]

Migration und Invasion von Tumorzellen

Neben der Inhibierung der effektiven DNA Reparaturmechanismen strahlenresistenter Tumorzellen stellen auch die der Zellmigration und –invasion zugrunde liegenden Signalkaskaden ein prominentes Ziel für die zielgerichtete Therapie dar [65,66]. Metastasierung und Invasion von Tumorzellen ist eine der Haupttodesursachen bei krebsartigen Erkrankungen [9].

Zellmigration im Allgemeinen ist ein komplexer, heterogener Prozess welcher von allen Zelltypen in ihrem Lebenszyklus angewandt wird. Migration wird durch eine Reihe von Proteingradienten und Signalwegen gesteuert und lässt sich grundlegend in fünf Gruppen aufteilen [67]. Die amöboide blebbige Bewegung beschreibt eine Bewegung der Zellen welche die Bildung von Membranblebs zur propulsiven, schiebenden Bewegung in 3D-Matrizes einsetzen [68,69]. Die amöboide pseudopodal-filopodale Bewegungsform beschreibt einen Bewegungstyp bei der Zellen Pseudopodien ausbilden. Nach deren Verankerung kann die Zelle sich mit Hilfe von Fokalen Adhäsionen (FA) in die Bewegungsrichtung „schieben“ [70]. Die Kraft wird hierbei durch die Aktomyosin-Kontraktion generiert. Die mesenchymale Bewegung von Zellen baut ebenfalls auf der Verankerung der Zelle durch FA's auf. Sie besteht aus einem Zyklus aus ziehenden und schiebenden Bewegungen, mit deren Hilfe sich die Zelle fortbewegt. Die Kraft wird hier ebenfalls durch Aktomyosinkontraktionen generiert. Die beiden letzten Bewegungsmodi beschreiben die Bewegung von Zellgruppen entweder im multizellulären Streaming [71] oder als Kollektiv im Zellverband [72].

Der Migrationstyp in welcher sich die Zellen fortbewegen hängt im Wesentlichen vom Zelltyp und der jeweiligen extrazellulären Umgebung ab. Die Übergänge zwischen den bereits beschriebenen Migrationsformen sind fließend. Tumorzellen verwenden in ihren metastatischen und invasiven Prozessen meist die amoeboide-pseudopodale und mesenchymale Bewegungsform um aus dem Tumor auszuwandern und umliegendes oder entferntes Gewebe zu befallen [67]. Auf einem 2D Substrat, wie zum Beispiel bei der Reepithelialisierung im Wundschluss oder der Bewegung entlang innerer Epithelien, kommt es zu einer Lamellipodien/Filopodien getriebenen Bewegung der gespreiteten Zellen [67,73–75]. Diese Lamellipodien getriebene Bewegung nimmt eine Zwischenform der pseudopodal-filopodalen und der mesenchymalen Bewegung ein.

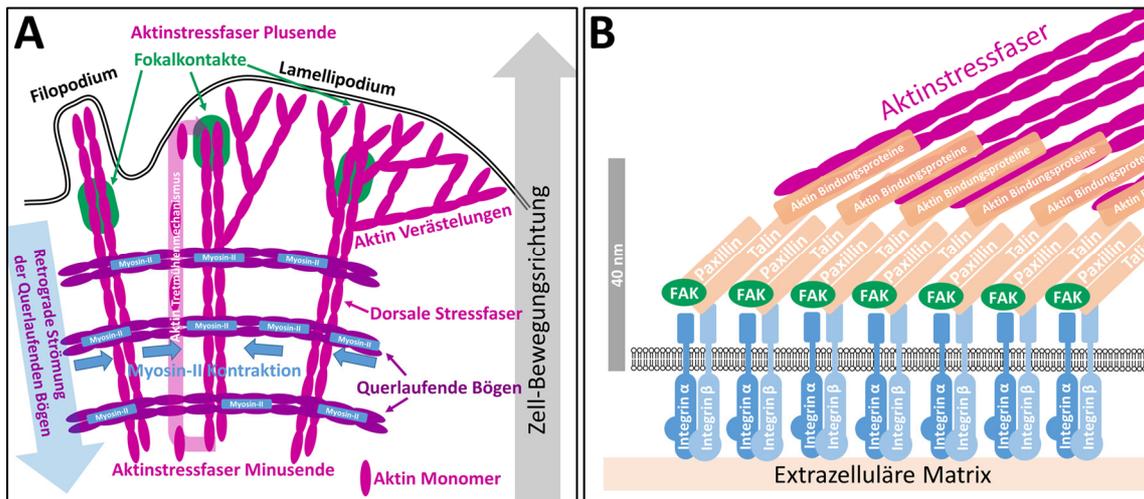


Abbildung 3: Struktur, Aufbau und Mechanismen der Kraftgewinnung in der Lamella einer Zelle

Bildabschnitt A zeigt ein vereinfachtes Schema der F-Aktin- und Aktomyosin-Struktur in der Lamella und der Lauffront einer Zelle. F-Aktinstressfasern und filamentösen Verästelungen sind magenta dargestellt. Die Aktomyosinfasern der querverlaufenden Bögen sind lila und blau hervorgehoben. Im linken Bildabschnitt ist ein Filopodium gezeigt und Mitte/Rechts stellt ein Lamellipodium dar. Zwei separate Mechanismen zur Kraftgewinnung sind zudem ebenfalls in Bildabschnitt A dargestellt. Zum einen die retrograde Strömung der querverlaufenden Bögen, welche die dorsalen Aktinstressfasern in die Bewegungsrichtung drücken. Zum anderen ist der Aktintretmühlenmechanismus dargestellt, bei dem Aktin am minus (pointed) Ende der Aktinfasern vermehrt abgebaut und am Plus (barbed) Ende der Aktinstressfasern und -verästelungen wieder angebaut wird.

Bildabschnitt B zeigt eine vereinfachte Darstellung des Multiproteinkomplexes der fokalen Adhäsionen (FA). Die Aktinfasern sind hierbei über F-Aktinbindungsproteine (Vinculin, Zyxin, Vasp und α-Aktinin) mit den linker-Proteinen Talin und Paxillin sowie der fokalen Adhäsionskinase FAK zu den Transmembranen α- und β-Integrinen verbunden. Die Integrinen stellen hierbei die Verankerung zur extrazellulären Matrix her.

Schema A nach Toijkander et al. [76,77] & La Clairche et al. [78]

Schema B nach Lindsay et al. [79] & Schwartz et al. [80]

Das Lamellipodium (Abb. 3A) bildet die breite Lauffront migrierender Zellen. Es besteht aus einem verästelten Netzwerk aus Aktinfilamenten und aus einer geordneten Struktur von F-Aktinbündeln (Bündelung aus mehreren Aktinfilamenten, auch Stressfasern genannt). Die F-Aktinbündel unterscheiden sich je nach Ausrichtung in ihrer Funktion. Zum einen die dorsalen Stressfasern welche in der Migrationsfront in fokalen Adhäsionen (FA) enden und somit in der extrazellulären Matrix (EZM) verankert sind. Diese dorsalen Stressfasern bilden das radiale Gerüst auf dem die querverlaufenden Bögen angebracht sind. Bei den querverlaufenden Bögen handelt es sich um Aktomyosinfasern welche durch ihre Kontraktionsfähigkeit und die Interaktion mit den in der EZM verankerten radialen dorsalen Stressfasern nach gängigen Modellen einen Teil der Antriebskraft für den retrograden Fluss im Lamellum bilden [74–77]. Der retrograde Fluss beschreibt die beobachtbare Bewegung des F-Aktin-Netzwerkes von der führenden Kante des Lamellums zum Zentrum der Zelle. Es wird vermutet, dass dies die dorsalen Stressfasern und die F-Aktinverästelungen in Richtung der Zellbewegung schiebt und somit ein Teil der Migration zugrunde liegenden Kraftentwicklung spielt [81–83].

Die verästelten F-Aktinstrukturen in der führenden Kante des Lamellipodiums bilden ebenfalls einen Kraftgeber für die Fortbewegung der Zelle [71,84,85]. Hierbei wird der Aktin-Tretmühlenmechanismus für die Kraftentwicklung verantwortlich gemacht. In Abb. 3A, an der mittleren dorsalen Stressfaser dargestellt, handelt es sich bei dem Tretmühlenmechanismus um die Netto-Polimerisation und -Depolimerisation der Aktinfilamente. Es wird am Minusende (Richtung Zellinneres) eines Aktinfilamentes vermehrt F-Aktin abgebaut und am Plusende (Richtung der Migrationskante) wieder angebaut. Das Minusende eines Aktinfilamentes beschreibt die Seite an welcher die ATP Bindungsstelle freiliegt. Am Plusende des Aktinfilamentes liegt die Bindungsspalte des Aktinproteins (Aktin-Monomer) offen, an welcher neue Aktin-Monomere binden können [86]. Dies trifft auch auf das verästelte F-Aktin im Lamellum zu (Abb. 3A) und führt dort zu einer Anreicherung des F-Aktins entlang der führenden Kante. Diese Polarisation drückt somit die führende Kante in Bewegungsrichtung nach vorne.

Die FA-Proteinkomplexe bestehen im Wesentlichen aus den transmembranen α und β Integrinen mit Kontakt zur EZM, der fokalen Adhäsionskinase (FAK), und den Proteinen Paxilin und Talin. Paxilin und Talin dienen als Linkerproteine zu dem F-Aktinbindungsprotein Vinculin und vollende somit die Verbindung der EZM verankerten FA's zum F-Aktinskelett (Abb. 3) [79,80]. Die FA dienen grundsätzlich als Kontaktpunkte und Verankerungen zur Kraftübertragung zwischen dem intrazellulären Zytoskelett und der extrazellulären Matrix (EZM) [76,87]. FAK ist wie erwähnt ein wichtiger Baustein der FA's und an deren Umsatz und Reifung zentral beteiligt [88].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte das charakteristische Merkmal der Apoptoseresistenz durch Untersuchung der DNA-DSB-Reparatur nach ionisierender Bestrahlung sowie das Merkmal der erhöhten Migrationsfähigkeit genauer untersucht werden (Abb. 1). Bei GBM-Zellen werden diesen beiden Merkmalen die Hauptschuld an dem schlechten klinischen Ausgang der Erkrankung zugewiesen [15,16]. Es wurden zwei GBM Zelllinien, DK-MG und SNB19, gewählt. Diese unterscheiden sich in der Mutation von zwei charakteristischen Tumorsuppressorgenen. SNB19 ist sowohl in *PTEN* als auch *p53* mutiert wohingegen in DK-MG beide Gene widtypisch vorliegen [89].

Für die Untersuchung der Zellbewegung werden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit zwei Hochdurchsatzmethoden zur Einzelzellverfolgung und Wundheilungsassay weiterentwickelt. Der TimelapseAnalyzer (TLA) von Huth et al. [90], welcher als Basis verwendet wurde, ermöglicht eine automatische und schnelle Auswertung der Zellbewegung. Für die stark gespreiteten GBM-Zellen [91,92] erwiesen sich die implementierten TLA-Algorithmen allerdings als zu ungenau [90]. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit verwendeten TLA-Algorithmen speziell auf die sehr kontrastarmen Phasenkontrastvideos der getesteten

GBM-Zellen optimiert oder neu entwickelt. Dies sollte eine präzise Analyse der Zellen über den gesamten Verlauf der Aufnahmen erlauben.

Die modifizierten TLA-Algorithmen sollten im ersten Teil der vorliegenden Arbeit zur Analyse der Migrationsfähigkeit von DK-MG- und SNB19-Linien unter Einfluss von zwei kleinmolekularen Inhibitoren, NVP-AUY922 und PI-103, angewendet werden. PI-103 ist ein neues synthetisches Molekül der Pyridofuopyrimidineklasse welches ein wirksamer Inhibitor der PI3K, sowie mTOR und DNA-PK Proteine ist [93]. Für diesen Inhibitor konnte bereits eine therapeutische Anwendung in verschiedenen Xenograftmodellen gezeigt werden [94]. NVP-AUY922 ist ein Isoxazole-Resorcinol Derivat mit einer hohen Bioverfügbarkeit, niedrigen Toxizität und hohen Affinität für die NH₂-terminale Nukleotidbindungsstelle von Hsp90 [95]. Für diesen Inhibitor konnten bereits antiproliferative Effekte in gut tolerierbaren Dosen gegen Tumorzelllinien und primäre Tumorzellen *in vitro* sowie *in vivo* gezeigt werden [96]. Ziel war es durch Einflussnahme auf den PI3K-Signalweg und der Hsp90-Klientenproteine die Migrationsfähigkeit der Glioblastomzelllinien DK-MG und SNB19 zu unterdrücken.

Zusätzlich sollte der aktinbasierte Bewegungsapparat der Zellen unter dem Einfluss von ionisierender Strahlung sowie der genannten Inhibitoren mit Hilfe der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopiemethode „*direct stochastic optical reconstruction microscopy*“ (*dSTORM*) und der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (cLSM) untersucht werden. Hierfür wurde ein besonderes Augenmerk auf die Lamella und die fokalen Adhäsionen (FA) der Zellen gelegt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Änderungen der zugrundeliegenden F-Aktinstruktur und der Veränderungen in der Bewegung der Zellen feststellen zu können.

Zusammengefasst sind die Zielsetzung und Fragestellung des ersten Abschnittes:

Zielsetzungen:

- Modifizierung bereits etablierter automatischer TLA-Algorithmen für Einzelzellverfolgung und Wundheilungsassays, um diese mit den kontrastarmen Phasenkontrastvideos der GBM kompatibel zu machen.
- Vergleich der entwickelten TLA-Algorithmen mit manuellen Auswertungen.

Fragestellungen:

- Gibt es Unterschiede im Bewegungsverhalten der DK-MG- und SNB19-Zellen?
- Gibt es Unterschiede im Aufbau des Bewegungsapparates anhand von F-Aktin/FAK zwischen beiden Zelllinien?
- Lässt sich das Bewegungsverhalten in der Einzelzellumgebung sowie im Zellmonolayer durch PI3K/mTOR- oder Hsp90-Inhibierung beeinflussen?

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die DNA-DSB-Reparatur anhand von zwei ausgewählten Reparaturproteinen (γ H2AX und DNA-PK) genauer untersucht werden. Für diesen Zweck wurde ein Algorithmus „*FocAn-3D*“ für die automatische 3D-Analyse der γ H2AX-Foci in cLSM-Aufnahmen entwickelt. Mit von „*FocAn-3D*“ wurde die zeitliche Dynamik im Auf- und Abbau der γ H2AX-Foci untersucht. Bereits beschriebene Methoden [40,97–104] erlauben eine schnelle und effektive Auszählung der γ H2AX-Foci eines 2D Schnittes des Zellkerns. Dies vermeidet den bei manuellen Auszählungen entstehenden Benutzer-Bias. Ziel war es hier jedoch durch den neu entwickelten Algorithmus „*FocAn-3D*“ die automatisierte Auszählung ganzer Zellkerne in 3D zu ermöglichen. Dies sollte die Genauigkeit der Auszählung noch weiter steigern. Zusätzlich sollte eine separate Färbung für die Lokalisierung der Zellkerne, wie in den bereits veröffentlichten Algorithmen vorgesehen [40,97–104], durch „*FocAn-3D*“ umgangen werden.

Des Weiteren sollte die Nanometerstruktur, von γ H2AX und des DNA-Reparaturproteins DNA-PK im Foci, mit Hilfe der hochaufgelösten Fluoreszenzmikroskopiemethode *d*STORM genauer untersucht werden. Beugungsbegrenzte konventionelle Mikroskopiemethoden (Auflösung \sim 200 nm) stellen Foci als gleichmäßig verteiltes Signal dar [105]. Das Ziel war es daher die Verteilung der Reparaturproteine mit einer lateralen Auflösung kleiner als 100 nm darzustellen. Eine Verbesserung der Auflösung in diesem Maßstab scheint entscheidend um die tatsächliche Verteilung der γ H2AX-Histone und von DNA-PK im Foci darzustellen zu können [105].

Zusammengefasst sind die Zielsetzung und Fragestellung des zweiten Abschnittes:

Zielsetzungen:

- Die Entwicklung eines automatischen Algorithmus zur Detektion und Auszählung von DNA-DSB-Reparaturfoci in 3D-Aufnahmen am Beispiel von γ H2AX-Foci.
- Vergleich des entwickelten Algorithmus mit manuellen und dem bereits etablierten Algorithmus für 2D-Aufnahmen „*FoCo*“ [40].

Fragestellungen:

- Gibt es Unterschiede in der γ H2AX-Fociinduktion und -abbau zwischen DK-MG- und SNB19-Zellen?
- Wie stellt sich die Nanometerstruktur der Reparaturproteine γ H2AX und DNA-PK um die DNA-DSB-Bruchstelle dar?

2) Material

2.1 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Zellkultivierung:

Brutschrank; DH Autoflow	NUAIRE, Plymouth, Vereinigte Staaten
Brutschrank; NU 58006	NUAIRE, Plymouth, Vereinigte Staaten
Brutschrank; CB 150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Brutschrank; Heracell	Kendro Laboratory Products
Sterilbench; BSB3A	Steril-Antares
Zellkulturflaschen 25 cm ² ; CAT 659170	Greiner Bio one, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen 75 cm ² ; CAT 658 175	Greiner Bio one, Kremsmünster, Österreich
Kulturschalen; CAT 627160 35/20 mm	Greiner Bio one, Kremsmünster, Österreich
Hemocytometer Neubauer improved	Brandt, Wertheim, Germany
Mikroskop CKX31	Olympus, Hamburg, Deutschland
Wasserbad; WNB Basic 12876-3	Memmert, Schwabach, Deutschland
Tischzentrifuge; Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Standzentrifuge; 3-15	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Bestrahlung:

6 MV Siemens Linearbeschleuniger	Siemens, Concord, Vereinigte Staaten
----------------------------------	--------------------------------------

Probenvorbereitung:

Steriplan Glas petri dish Ø 30 mm	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim, Deutschland
Cellstar, Zellkulturschalen 35x10 mm 627-160	Greiner Bio one, Kremsmünster, Österreich
8-well auf Deckglas II	Sarstaedt, Nümbrecht, Deutschland
µ-Slide 8 well, glass bottom	Ibidi, Martinsried, Deutschland
µ-Dish 35 mm, low Grid-500	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Helmanex® II	Hellma, Müllheim, Germany
Ultrasonol 11	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

dSTORM Setup:

Olympus Ix71 inverted microscope	Olympus, Düsseldorf, Deutschland
APON 60XOTIRF, NA 1.49	Olympus, Düsseldorf, Deutschland
IX2-NPS, nosepiece stage	Olympus, Düsseldorf, Deutschland
Genesis MX 639 and MX 561	Coherent, Santa Clara, Vereinigte Staaten
HC 410/504/582/669, Polychromatische Spiegel	Semrock, New York, Vereinigte Staaten
HC 679/41, Bandpassfilter für Alexa 647	Semrock, New York, Vereinigte Staaten
HC 582/75, Bandpassfilter für Alexa 532	Semrock, New York, Vereinigte Staaten
635 LP, Strahlteiler	Semrock, New York, Vereinigte Staaten
iXon Ultra 897, CCD Kamera	Andor Technology, Belfast, Vereinigtes Königreich

cLSM Setup:

LSM 710	Zeiss, Jena, Deutschland
63x/1.40 Öl-Immersionsobjektiv	Zeiss, Jena, Deutschland

BioStation IM

Nikon BioStation IM	Nikon GmbH, Minato, Japan
---------------------	---------------------------

2.2 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden DK-MG- und SNB19- Zellen verwendet. Beide wurden von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Es handelt sich hierbei um humane adherente GBM Zelllinien, welche sich in ihrem *PTEN* und *p53* Mutationsstatus unterscheiden [89]. DK-MG besitzt beide Gene wildtypisch wohingegen SNB19 in beiden Genen eine funktionelle Mutation besitzt.

2.3 Medien und Lösungen

Alle verwendeten wässrigen Lösungen wurden mit deionisiertem und steril filtriertem Wasser (ddH₂O) entweder aus einer Milliporewasseraufbereitungsanlage (Milli-Q Millipore, Schwalbach, Deutschland) oder käuflich erworbenem sterilem Wasser (Aqua b. Braun Ecotainer) hergestellt.

2.3.1 Zellkultur

Folgende Lösungen wurden als fertige sterile Gebrauchslösungen bezogen:

Tabelle 1: Hersteller der zur Zellkultur verwendeten Lösungen

<i>Hersteller</i>	<i>Medium</i>
<i>Sigma aldrich (Steinheim, Deutschland)</i>	
<i>D-8537</i>	Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (ohne Kalziumchlorid oder Magnesium, sterilfiltriert)
<i>D-6046</i>	Dulbecco's MEM (DMEM) low glucose
<i>G-7513</i>	L-Glutamin, 200 mM
<i>P-4333</i>	Penicillin, 10000 U/ml / Streptomycin, 10 mg/ml
<i>T-3924</i>	Trypsin/EDTA (0,5 g Trypsin und 0,2 g EDTAx4Na pro Liter Hanks' Balanced Salt Solution mit Phenolrot)
<i>Biochrom (Berlin, Deutschland)</i>	
<i>S0615</i>	Fötale Kälberserum (FBS Superior)

Folgende Grundmedien wurden als fertige sterile Lösungen bezogen und mit den angegebenen Zusätzen versehen:

Tabelle 2: Zellkulturmedien

<i>Zelllinie</i>	<i>Medium Zusammensetzung</i>
<i>DK-MG, SNB19</i>	Dulbecco's MEM (DMEM) Low Glucose <i>10% Fötales Kälberserum (FCS)</i> <i>1% L-Glutamin; 2 mM</i> <i>1% Penicillin (100 U/ml)/ Streptomycin (0,1 mg/ml)</i>

2.3.2 Fixierlösungen

Alle verwendeten Fixierlösungen wurden mit steril filtriertem 1x PBS hergestellt.

Tabelle 3: Fixierlösungen

<i>Zusammensetzung</i>	<i>ID, Hersteller</i>
Standard Fixierlösung:	
4% Paraformaldehyde	28906, Thermo Fischer Scientific
Zytoskelettpuffer Grundmedium:	
10 mM MES, pH 6.1	M-8250, Sigma Aldrich
150 mM NaCl	13426, Sigma Aldrich
5 mM EGTA	E-3889, Sigma Aldrich
5 mM Glukose	8342, Merck
5 mM MgCl ₂	AA-4425, Applichem
Zytoskelettpuffer 1 (ZP-1):	
0,3% Glutaraldehyde (25% stock in ddH ₂ O)	G-5882, Sigma Aldrich
0,25% Triton X-100 (10% stock in ddH ₂ O)	X100, Sigma Aldrich
Zytoskelettpuffer 2 (ZP-2):	
2% Glutaraldehyde (25% stock in ddH ₂ O)	G-5882, Sigma Aldrich
Hintergrundreduzierung:	
0.1% Natriumborhydrid	71320, Sigma Aldrich

Tabelle 4: Schaltpuffer für dSTORM Aufnahmen

<i>Zusammensetzung</i>	<i>Hersteller</i>
100 mM MEA (β -Mercaptoethylamin)	A-1546, Applichem
Kaliumhydroxid	1.05012, Sigma Aldrich

2.3.3 *Verwendete primäre und farbstoffgekoppelte sekundäre Antikörper*

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Antikörper und Farbstoffe

<i>Antikörper</i>	<i>ID, Hersteller</i>
<i>Anti-pH2A.X(Ser910), Monoclonal, Mouse</i>	#44596-G, Invitrogen
<i>Anti-pFAK(Tyr397), Polyclonal, Rabbit</i>	#sc-11756-R, Santa Cruz
<i>Anti-DNA-PKcs (2790-3065), Polyclonal, Rabbit</i>	#ab230, Abcam
<i>Anti-pDNA-PKcs(S2056), Polyclonal, Mouse</i>	#ab198391, Abcam
<i>Alexa 647 Goat-anti-Rabbit F(ab)2</i>	#Q11421MP, Life Technologies
<i>Alexa 647 Goat-anti-Mouse F(ab)2</i>	#Q11021MP, Life Technologies
<i>Alexa 532 Goat-anti-Rabbit IgG(H+L)</i>	#A11009, Life Technologies
<i>Alexa 532 Goat-anti-Mouse IgG(H+L)</i>	#A11002, Life Technologies
<i>DY-647P1-Phalloidin</i>	#647P1-33, Dyomics

2.3.4 *Inhibitoren*

Folgende Inhibitoren wurden mit DMSO verdünnt und bei -20°C gelagert. PI-103 (2 µM) und NVP-AUY922 (50 nM) wurden 3 h vor der Bestrahlung dem Zellkulturmedium zugesetzt. Die Zellen der Kontrollversuche wurden parallel mit der entsprechenden Menge DMSO behandelt.

Tabelle 6: Verwendete Inhibitoren

<i>Inhibitor</i>	<i>ID, Hersteller</i>
<i>PI-103</i>	S1038, Selleckchem, Houston, Vereinigte Staaten
<i>NVP-AUY922</i>	S1069, Selleckchem, Houston, Vereinigte Staaten

2.4 Verwendete Software

Die folgenden Computerprogramme sind in alphabetischer Ordnung gelistet:

Tabelle 7: Verwendete Computerprogramme

<i>Software</i>	<i>Version</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Chemotaxis and Migration tool</i>	2.0	Ibidi, Martinsried, Germany,
<i>ImageJ</i>	1.49	Wayne Rasband, National Institute of
<i>ImageJ/FIJI</i>	1.51n	Health, Vereinigte Staaten, http://imagej.nih.gov/ij/
<i>Origin Lab Pro</i>	9.0G bis 2016G	OriginLab Corporation, Northampton, Vereinigte Staaten
<i>rapidSTORM</i>	3.2	Steve Wolter, GPL, www.superresolution.de
<i>Time Lapse Analyzer</i>	v01.34	http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/HKestler/tla/
<i>ZEN2012SP1 (black edition)</i>	v8.1	Zeiss, Jena, Deutschland

Tabelle 8: Eigenentwickelte Skripte und Plugins

<i>Softwareumgebung</i>	<i>Name/Version des Skriptes/Plugins</i>	<i>Verwendung</i>
<i>ImageJ/FIJI</i>	FocAn-3D v1.8.1	3D Analyse von γ H2AX-Foci in LSM Aufnahmen
	Nanofocicounter v.1.1	Analyse von γ H2AX Nanofoci in dSTORM Aufnahmen basierend auf Focan-3D
	Blebkinetics v1.0	Analyse von Membranblebs in Phasenkontrastvideoaufnahmen
<i>Time Lapse Analyzer</i>	STLab 1.4/1.5	Einzelzelllokalisierung und -verfolgung in Phasenkontrastvideoaufnahmen
	Scratch 2.1m	Flächenermittlung im Wundheilungsassay für Phasenkontrastvideoaufnahmen
<i>Microsoft Excel</i>	TLAzuCAMT	Umwandlung der TLA-Daten zu einem „Chemotaxis and Migration tool“ kompatiblen Format
	TLAdirect	Umwandlung der TLA-Daten für die zeitaufgelöste Einzelzelllokalisierung

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die Zellen wurden standardisiert bei 37°C, 5% CO₂ und bei einer relativen Feuchtigkeit von 95% inkubiert. Falls nicht anders angegeben wurden alle Zentrifugationsschritte bei 300 g und 21°C (RT) für 5 Minuten durchgeführt.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² kultiviert und unter sterilen Bedingungen alle 2-3 Tage passagiert. Die Zellen wurden mit einer temperierten PBS Lösung (~37°C) gewaschen und zum Ablösen mit ~1-2 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Unter mikroskopischer Begutachtung wurde auf eine möglichst kurze Inkubationszeit für das Ablösen der Zellen geachtet. Diese lag bei 2-10 min und ist abhängig von der Adhärenz der Zelllinie. Die enzymatische Reaktion wurde unter Zugabe von ~9 ml Zellkulturmedium abgesättigt und die Zellsuspension wurde in neue Kulturflaschen verteilt. Hierbei ist eine Verdünnung gewählt worden welche für den Versuchstag eine möglichst optimale, sich im logarithmischen Wachstum befindende, Zellkultur gewährleistete. Die Verteilungsraten waren für DK-MG ca. 1:3 bis 1:5 und für SNB19 1:4 bis 1:8 Zellsuspension zu frischem Medium.

3.2 Röntgenbestrahlung der Zellen

Die Röntgenbestrahlungen wurden an einem 6 MV Linearbeschleuniger bei RT mit durchgeführt 2 Gy/Minute durchgeführt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen im Brutschrank bis zur Fixation gemäß dem entsprechenden Versuchsschema weiter kultiviert.

3.3 Zeitrafferaufnahmen mit der Nikon BioStation IM

Für die Durchführung der Einzelzellverfolgung und Wundheilungsassays wurden Zeitrafferaufnahmen der Zellen angefertigt. Diese wurden durch die BioStation IM der Firma Nikon aufgenommen. Dieses Mikroskopie-System enthält ein inverses Mikroskop sowie eine Inkubationskammer, welche auf 37°C erwärmbar ist und mit gesättigter, ebenfalls auf 37°C erwärmter Gasmischung (6% CO₂, 20% O₂ in N₂), geflutet wird. Somit sind in diesem System die Bedingungen mit denen eines Brutschrankes vergleichbar und Aufnahmen lebender Zellen über längere Zeiträume möglich. Des Weiteren ist die Position des Objektivrevolvers elektronisch steuerbar, was die automatische Aufnahme mehrere Punkte in Reihe ermöglicht. Standardmäßig wurden die Videos mit einer 10x Vergrößerung aufgenommen, was bei 1600x1200 Pixeln eine Pixelgröße von 0,44125 µm pro Pixel ergibt. Die zeitliche Auflösung lag bei einem Bild alle 10 Minuten.

3.3.1 Einzelzellverfolgungsassay

Für die Aufnahmen des Einzelzellverfolgungsassays wurden Mehrweg-Greiner-Kulturschalen aus Glas verwendet. Die Musterung im Kunststoff von Einweg-Kulturschalen,

welche durch die physikalische Oberflächenbehandlung des Kunststoffes erzeugt wird, hätte sich negativ auf die Analyse ausgewirkt. Die Glasschälchen wurden nach jeder Verwendung zuerst in einer alkalischen Reinigungslösung mit Ultrasonol 11 mit 1-10 Vol.% im Ultraschallbad für 15 Minuten bei 60°C gesäubert. Anschließend wurde die Reinigungslösung durch eine Lösung mit Helmanex mit 1-10 Vol.% ersetzt und der Vorgang für 15 Minuten bei 60°C wiederholt. Im letzten Schritt wurden die Schälchen verpackt und im Autoklav sterilisiert. Die Zellen wurden wie in 3.1 beschrieben abgelöst und in einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ – $3,5 \times 10^5$ Zellen/ml bei 2 ml Gesamtvolumen pro Schälchen ausgesät. Hierbei wurde darauf geachtet die Suspension gut zu resuspendieren, um die Zellen möglichst gleichmäßig zu verteilen und Aggregationen von Zellen zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Zellen für ~20 h mit 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Für die Aufnahmen wurde das Schälchen mit der optimalen Zellverteilung ausgewählt und in der BioStation IM platziert. Es wurde darauf geachtet, möglichst viele vereinzelte Zellen pro Aufnahme-Punkt in Kombination mit genügend Freiraum für die erwartete Bewegung zu erhalten. Die Aufnahmen wurden mit 10x Vergrößerung bei 1600×1200 Pixeln und einem Bildaufnahme pro Punkt alle 10 Minuten bei ~9 Punkten pro Durchlauf für ~24 h gestartet.

3.3.2 Wundheilungsassay

Als zweiter Test zur Ermittlung der Migrationsgeschwindigkeit wurde der Wundheilungsassay gewählt, welcher mit leichten Modifikationen, nach dem Protokoll von Liang et al. durchgeführt wurde [106]. Die Zellen wurden in Greiner Cellstar Zellkulturschalen 35x10 mm aus Kunststoff mit physikalischer Oberflächenbehandlung für die Gewebekultur ausgesät. Zu Beginn mussten hierfür die Zellen enzymatisch durch Trypsin/EDTA von den Zellkulturflaschen abgelöst werden. Durch Zugabe von frischem Zellmedium wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 4×10^5 , 5×10^5 und 6×10^5 Zellen pro Schälchen mit 3 ml Gesamtmedium ausgesät. Die Zellen wurden im Anschluss für mindestens ~20 h mit 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Zu Beginn der Messung wurde von den drei unterschiedlichen Zelldichten das optimal, leicht konfluent bewachsene ausgewählt. Hierbei wurde auf möglichst gleichmäßig und ohne Zellverklumpung oder offene Höfe gewachsenen Zellrasen geachtet. In den einschichtigen Zellrasen wurde ein Gitter mit Linienabstand von 2×2 mm gekratzt, indem eine Plastibrand® Nanocap 10 µl Pipettenspitze angewinkelt über die Wachstumsfläche der Zellkulturschale gezogen wurde. Zur Orientierung beim Kratzen wurde hierfür ein mehrfarbiges Raster unter das Zellkulturschälchen gelegt. Im Anschluss wurde das Zellmedium entfernt und gegen frisches Medium ersetzt. Das Schälchen wurde sanft gegen den Boden der sterilen Werkbank gestoßen. Der Stoß befreit die nahezu abgelösten Zellen, insbesondere im oder an den Kanten der Kratzer im Zellrasen. Das Medium wurde daraufhin abgesaugt und gegen frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die präparierten Zellkulturschalen wurden daraufhin in der BioStation IM platziert und bis zu 9 Aufnahmepunkte pro Durchlauf ausgewählt. Es wurde noch einmal darauf geachtet, dass in

jedem Aufnahmepunkt ein möglichst gleichmäßiger horizontaler Kratzer im Zellrasen sichtbar ist, welcher frei von Zellaggregationen oder zellfreier Höfe sein sollte. Die gesamte Aufnahmezeit betrug im Schnitt 18 h, wobei kürzere oder längere Aufnahmen, je nach Versuchsplanung, ebenfalls durchgeführt werden konnten. Diese Variation fiel nicht ins Gewicht, da die Migrationsfronten in den Kontrollversuchen in der Regel bereits nach ~6-8 h in Kontakt waren.

3.4 Zellfixierung und -färbung

Die Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in 8 Well auf Deckglas II-Objektträger ausgesät. Für vereinzelte Zellen wurde je nach Versuchsaufbau für SNB19-Zellen eine Zellkonzentration von $\sim 1,5 \times 10^4$ oder 3×10^4 Zellen pro Well ausgesät. Bei den langsam wachsenden DK-MG-Zellen wurden entsprechend $2,5 \times 10^4$ oder 5×10^4 Zellen ausgesät. Die optimale Zelldichte wurde der genauen Dauer (16-24 h) zwischen Aussaat und Verwendung allerdings leicht variiert. Alle Versuche wurden mit drei Wiederholungen durchgeführt.

3.4.1 Zellfixierung und -färbung für Immunfluoreszenzaufnahmen

Für die Zellfixierung der Immunfluoreszenzversuche wurde zu Beginn das Zellkulturmedium vorsichtig durch warmes (37°C) PBS ersetzt. Unmittelbar danach wurde das PBS durch 4% Paraformaldehyde ausgetauscht und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die folgenden Waschschriffe (vorsichtiges absaugen und füllen mit PBS oder 0.1% Tween 20 (v/v) in PBS bei 5 Minuten Inkubationszeit) wurden jeweils 3x wiederholt. Nach der Inkubation mit Paraformaldehyde wurden die Kammern mit PBS gewaschen und mit 0.5% Triton-X100 (v/v) in PBS für 10 Minuten bei RT inkubiert um die Zellmembran zu permeabilisieren. Hiernach wurden die Kammern wieder gewaschen (PBS) und mit 5% BSA in PBS für 30 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die BSA-Lösung durch die Primärantikörperlösung, mit der in Tabelle 5 angegebenen Verdünnung, ausgetauscht und für mindestens 1 Stunde bei RT inkubiert. Danach wurde mit 0.1% Tween 20 (v/v) in PBS gewaschen und die sekundäre Antikörperlösung aufgegeben und wieder für eine Stunde inkubiert. Zum Abschluss wurde mit 0.1% Tween 20 (v/v) in PBS gewaschen und die Proben in PBS bei 4°C bis zur Vermessung aufbewahrt (in der Regel maximal 2 Tage).

3.4.2 Zellfixierung und Phalloidin-F-Aktinfärbung

Für die Fixierung und Färbung mit DY-647P1-Phalloidin wurde das Protokoll von Small J. et al. [107] verwendet. Die verwendeten Pufferzusammensetzungen sind in Tabelle 3 beschrieben. Zu Beginn wurde das Medium in allen Kammern durch vorgewärmtes PBS ausgetauscht. Im Anschluss werden die Proben 1-2 Minuten mit vorgewärmtem ZP-1 inkubiert welches danach durch ZP-2 ausgetauscht wurde. Die Proben wurden für 10 Minuten mit ZP-2 bei RT inkubiert. Die Zusammensetzung des ZP hilft hierbei der Stabilisierung fragiler und sehr feiner F-Aktinstrukturen welche andernfalls zerfallen würden. Im Anschluss wurden die Proben

7 Minuten mit 0.1% Natriumborhydrid in PBS inkubiert. Dies dient der selektiven Reduzierung reaktiver Aldehyde- und Keton-Gruppen in deren korrespondierenden Alkoholgruppen ohne andere funktionelle Gruppen wie z.B. Ester, Amid, Laktone, oder Nitril zu reduzieren. Zusammengefasst wird somit eine Verbesserung der Signalspezifität erreicht. Im nächsten Schritt wurde 3x mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt der F-Aktinfärbung wurde mit 165 nM DY-647P1-Phalloidin in PBS (~100 μ l pro Well) für ~24 h bei 4°C inkubiert. Im Anschluss werden die Proben mit PBS Lösung gewaschen und möglichst zeitnah vermessen.

Falls zusätzlich eine antikörperbasierte Färbung nötig war wurden die Proben nachträglich mit 5% BSA für 30 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die BSA-Lösung durch die Primärantikörperlösung, mit der in Tabelle 5 angegebenen Verdünnung, ausgetauscht und für mindestens 1 Stunde bei RT inkubiert. Danach wurde mit der Tween-Lösung gewaschen und die sekundäre Antikörperlösung aufgegeben und wieder für 1 Stunde inkubiert. Zum Abschluss wurde mit der Tween-Lösung gewaschen und die Proben im Anschluss vermessen.

3.5 *d*STORM Messungen

Für die *d*STORM-Aufnahmen wurde das Medium in den Probenkammern durch den Schaltpuffer mit 100 mM β -Mercaptoethylamin (MEA) in PBS ausgetauscht. Die Thiolgruppe dient hierbei der pH-abhängigen Reduzierung des Farbstoffes. Der pH des Schaltpuffers wurde vorher mit Kaliumhydroxid (KOH) eingestellt. Für Aufnahmen mit Alexa 647 lag der pH bei 7-8.5, abhängig von der Labelingdichte der aufgenommenen Strukturen. Aufnahmen mit Alexa 532 erfolgten im pH ~8.5. Die Proben wurden für die Aufnahme auf den entkoppelten Probenhalter des Mikroskops platziert und mit einer Laserleistung von ~3-7 kW/cm² belichtet. Es wurden typischerweise 30.000 Frames für die F-Aktin und 15.000 Frames für alle anderen Proben bei einer Expositionszeit von 10 ms aufgenommen.

Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der frei erhältlichen und in Wolter et al. [108] beschriebenen Software *rapidSTORM* 3.3. Hierbei wird aus dem aufgenommenen Bildstapel eine Tabelle, mit allen ermittelten Lokalisationen, sowie ein rekonstruiertes Bild erstellt. Die Lokalisationen werden anhand einer 2D Gauß-Funktion, welche an die Punktspreizfunktion der aufgenommenen Einzelmolekül-Emission modelliert wird, berechnet. Mit Hilfe dieser Technik können alle im Bildstapel ermittelten Lokalisationen aufsummiert werden, um ein einzelnes Bild zu rekonstruieren. Lokalisationen, welche weniger als ~500-3000 Photonen (abhängig von der Probenqualität) enthalten, wurden verworfen. Lokalisationen unter verwendeten Schwellenwert enthalten typischerweise störenden Bildhintergrund oder falsch positive Lokalisationen.

3.6 Kolokalisationsmessungen F-Aktin vs. FAK

DK-MG- und SNB19-Zellen wurden wie bereits beschrieben ausgesät, fixiert und gefärbt. Es wurde jeweils eine Doppelfärbung mit pFAK(Tyr397) und Alexa532 (Goat-anti-Rabbit) sowie DY-647P1-Phalloidin (siehe Tabelle 5) pro Bedingung durchgeführt. Zusätzlich wurden Einzelfärbungen (jeweils 4 Wells) für FAK oder F-Aktin angefertigt. Die Kolokalisationsmessungen wurden am Zeiss LSM-700 durchgeführt und mit der Kolokalisationsfunktion der Zen Software ausgewertet. Die Grenzwerte für Region 1 (für F-Aktin – Abb. 4A) und Region 2 (für FAK – Abb. 4B) wurden Anhand von mindestens 10 Messungen der Einzelfärbungen in unterschiedlichen Wells ermittelt.

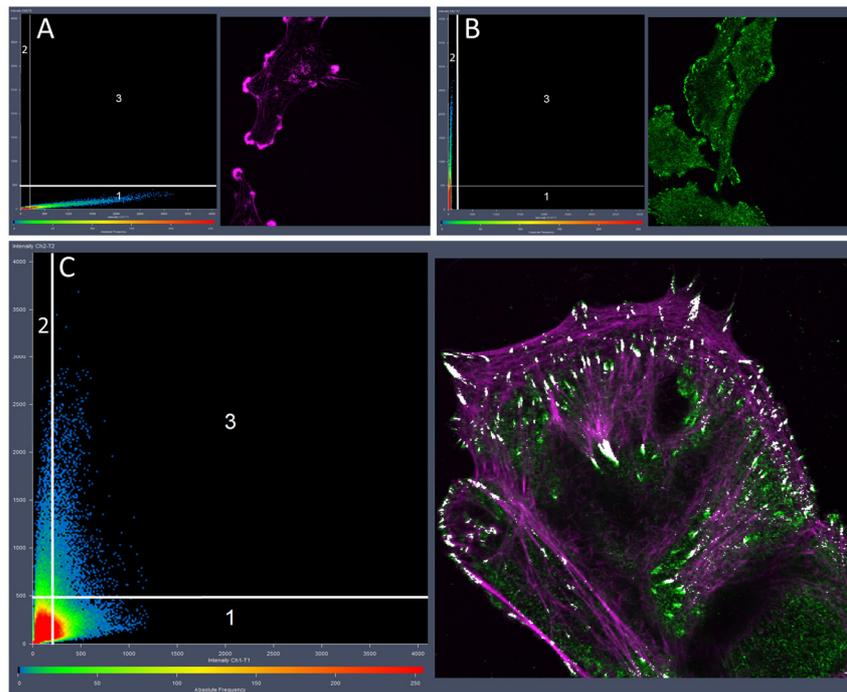


Abbildung 4: Kolokalisationsschema

Panel A zeigt eine F-Aktin-Kontrollfärbung mit dem Streudiagramm für das Signal pro Pixel im 647 Detektionsarm (x) und dem 532 Detektionsarm (y). Panel B stellt eine FAK Kontrollfärbung dar mit dem gleichen Streudiagramm. In Panel C sind die beiden ermittelten Schwellenwerte auf eine Doppelfärbung angewendet worden. Signal in Region 1 ist somit das reine 532 Signal (Grün) und in Region 2 das reine 647 Signal (Magenta). Region 3 gibt die Kolokalisation von FAK und F-Aktin wieder und ist im Bild weiß dargestellt.

Es wurde jeweils das höchste ermittelte Signal aller Einzelfärbungen im gegensinnigen Detektionsarm als Schwellenwert festgelegt. Die Eichung fand für jeden Durchlauf der Messreihe separat statt und die Messungen eines Durchlaufs wurden an einem Tag vollständig durchgeführt. Durch diese Vorgehensweise wird ein Durchbluten des Signals, was zu falsch positiven Kolokalisation führen würde, ausgeschlossen. Signal, welches im Streudiagramm in Region 3 liegt, wird als positives Kolokalisationssignal gewertet und in Abb. 4C weiß dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung des Migrationsverhaltens von GBM-Zellen und Effekte der PI3K-, mTOR- und Hsp90-Inhibition

Die Migration der DK-MG- und SNB19-GBM-Zelllinien wurde mit Hilfe von Zeitraffervideoaufnahmen und zwei modifizierten Algorithmen zur Zelllokalisierung untersucht. Es handelt sich hierbei um einen Algorithmus zur Einzelzellverfolgung und einen für Wundheilungsassays, welche im Folgenden genauer beschrieben werden.

4.1.1 Etablierung eines modifizierten Einzelzellverfolgungssystems

Für die Untersuchung der freien Bewegung von einzelnen DK-MG- und SNB19-Zellen ohne Zell-zu-Zell Kontakt, wurden Zeitraffer-Mikroskopieaufnahmen mit der BioStation IM durchgeführt. Einzelzellverfolgung in 2D Assays ist besonders gut geeignet die grundlegenden biologischen Mechanismen zu untersuchen, welche für die Migration der Zellen von Bedeutung sind. Dies beinhalten zum Beispiel die Tumorausbreitung von Zellen, inflammatorische Prozesse oder Immunreaktionen [109]. Die Tumorausbreitung beinhaltet hier sowohl die Metastasierung von Tumorzellen als auch die bei Glioblastomen vorherrschende Zellinvasion. Für Glioblastomzellen typisch ist die Invasion in das umliegende Gewebe, was zu ihrer verheerendsten und der Therapie entgegenstehenden Eigenschaft gehört [110]. Einzelzellverfolgung kann zum einen manuell oder interaktiv computerunterstützt (point&click) durchgeführt werden [109,111–114]. Dies wird allerdings sehr aufwendig und vor allem zeitintensiv. Besonders wenn sich die Probenbedingungen (z.B. bestrahlt/unbestrahlt + Inhibitorbehandlung etc.) vervielfachen wird es schwer >100 Zellen pro Bedingung und pro Durchlauf in einem zeitlich akzeptablen Rahmen zu vermessen [109]. Eine andere Möglichkeit ist die automatische Lokalisation der Zellen in den aufgenommenen Videos. Neuere Methoden verwenden entweder fluoreszente Marker [115,116] oder die grauwertbasierten Kontrastunterschiede [90,117], um die Zellen vollautomatisch im Video zu lokalisieren und deren Migrationsverhalten zu untersuchen. Fluoreszente Marker besitzen den Nachteil die Migration der Zellen negativ zu beeinflussen [91,118]. Dies liegt in der, im Vergleich zu Durchlichtaufnahmen hohen, Strahlenintensität und den damit einhergehenden phototoxischen Effekten begründet. Besonders bei der für die Einzelzellverfolgung benötigten langen Gesamtzeiten (~18 h) der Aufnahmen ist dies von Bedeutung. Kontrastbasierte Zelllokalisationsmethoden bei durchlichtbasierten Mikroskopie-Aufnahmen, leiden hingegen bis heute an Problemen in der präzisen Lokalisierung der Zellen. Dies trifft besonders auf kontrastarme und flache Zellmorphologien zu [90].

In dieser Arbeit wurde die Analyse der Videos mit einer vollautomatischen kontrastbasierten Lokalisierungsmethode durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden modifizierten Arbeitsabläufe (Abb. 5 und Appendix 1) in der von Huth et al. [90] entwickelten Softwareumgebung TLA etabliert. TLA ist eine open-source Software zur Hochdurchsatzanalyse bei Zellzählungen,

Bildverarbeitung, und Zellbewegungen in Phasenkontrast-, Differenzialinterferenzkontrast-, Fluoreszenz- oder Durchlicht-Mikroskopieaufnahmen. Die Modifikationen an dem für Phasenkontrastaufnahmen vorgeschlagenen Arbeitsablauf waren nötig, da die hier untersuchten Zellen sich morphologisch stark von den bei Huth et al. [11] verwendeten HeLa-Zellen unterscheiden.

In der Einzelzellumgebung besitzen die Glioblastomzellen hingegen einen schwachen Kontrast. Dies begründet sich in ihrer sehr flachen und gespreiteten Zellmorphologie. Bei den von Huth et al. [90] verwendeten HeLa Zellen war dies nicht der Fall, da sie einen vergleichsweise guten Kontrast besitzen. Zudem gab es markante Unterschiede in der Bildqualität zwischen den Aufnahmen von Huth et al. und den hier mit der BioStation IM erstellten Aufnahmen. Aus diesem Grund war der original vorgeschlagene Arbeitsablauf von Huth et al. [90], für die hier untersuchten Glioblastomzellen nicht einsetzbar. Allgemein sind Probleme in der Erkennung durch den geringen Kontrast gespreiteter Zellen in Phasenkontrast- und Differential-interferenzkontrastaufnahmen bereits in der Literatur beschrieben [90,119,120]. Die hier verwendete und nachfolgend beschriebene Methode ermöglichte die detaillierte Analyse von einzelnen Zellspuren, selbst mit den kontrastarmen Glioblastomzellen und lieferte somit Informationen zur Bewegungsgeschwindigkeit und Direktionalität der Zellen.

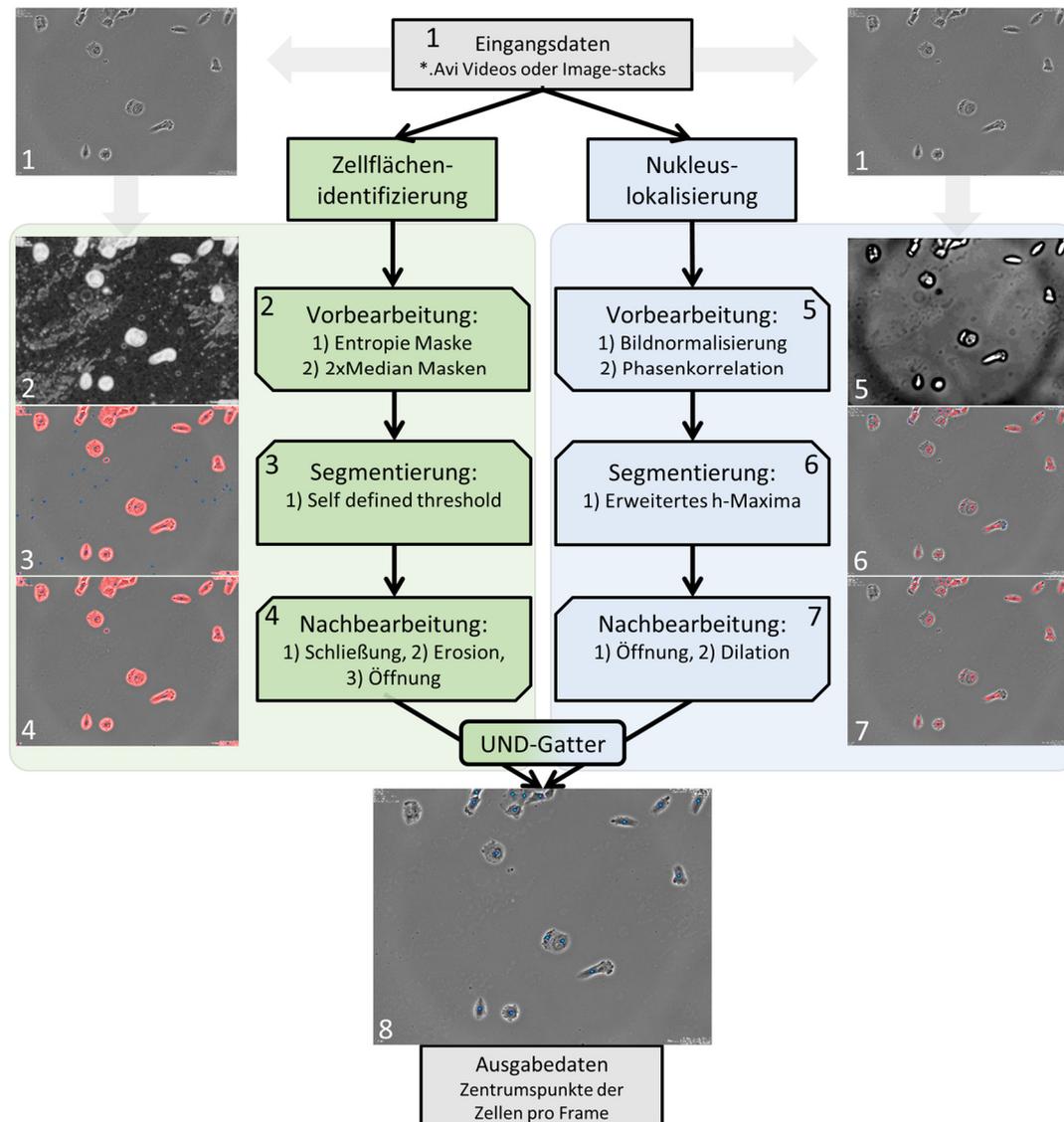


Abbildung 5: Schema der wichtigsten Schritte des TLA-Arbeitsablaufes bei der Einzelzellverfolgung

Die Eingabedaten werden pro Frame den dargestellten Operationen unterzogen. Diese lassen sich grob in zwei Bereiche unterteilen. Zum einen die Zellflächenidentifizierung (linker Ast) bei der die Pixelentropie in einem vorbestimmten Radius um den Pixel berechnet wird. Pixel mit hoher Entropie bekommen einen hohen Grauwert zugewiesen und Pixel mit niedriger Entropie eine geringen Grauwert. Das so ermittelte Bild wird durch Median-Masken einer Kantenglättung unterzogen. Daraufhin wird über einen festgelegten Threshold eine Binärisierung durchgeführt. Positive Bereiche sind hierbei rot dargestellt. Diese binäre Information wird in der Nachbearbeitung morphologisch aufgereinigt und die Zentrumsunkte bestimmt (hellblaue Pentagon).

Separat wird eine Nukleus-Lokalisierung durchgeführt, bei der durch eine Phasenkorrelation die Bereiche mit hoch dynamischem Signal hervorgehoben werden (Zellkern). Durch Applikation eines erweiterten h-Maxima-Schwellenwert werden binäre Flächen bestimmt, welche den Zellkernen entsprechen sollen (rot hervorgehoben). Diese binäre Information wird wieder morphologisch aufgereinigt, um im Anschluss die Zentrumsunkte (hellblaue Pentagon) zu lokalisieren.

Die Informationen beider Bereiche werden durch ein UND-Gatter überlagert, d.h. nur Bereiche die in beiden Ästen vorhanden sind werden als wahr angenommen und deren Zentrumsunkte bestimmt.

Im verwendeten Arbeitsablauf wird mit der Erkennung der gesamten Zellflächen im Bild (Abb. 5, grün hervorgehoben) begonnen. Dies beinhaltet noch keine Trennung von sich in Kontakt befindenden Zellen. Es wird mit einer Skalierungsoperation um den Faktor 0,5 begonnen, was eine bis zu vierfache Reduzierung der Verarbeitungszeit der nachfolgenden Schritte ermöglicht. Diese Schritte beinhalten eine schrittweise (Pixel für Pixel) Berechnung der Entropie im Radius 7 Pixel um den jeweils analysierten Pixel des Bildes (*i.e* die Ungleichheit der Pixelwerte in einem 7×7 Pixel großen Bereich um den zu berechnenden Pixel, nach $-\sum p * \log(p)$ bei dem p als die Pixelwerte der Umgebung definiert ist).

Das Ergebnis wird wiederum als Grauwert-Bild dargestellt (Abb. 5-2). Regionen im Bild in denen sich Zellen befinden, welche im Vergleich zum Hintergrund eher große Intensitätsschwankungen im Bild erzeugen, besitzen durch die Entropiebestimmung einen sehr großen Grauwert und werden folglich weiß dargestellt. Dem Hintergrund wird hingegen ein sehr niedriger Grauwert zugewiesen wodurch er dunkel dargestellt wird.

Zusammengefasst wird durch die bisher beschriebenen Schritte der Kontrast zwischen Zellen und dem Hintergrund erhöht, wodurch eine akkurate Erkennung der Zellflächen ermöglicht wird. In den nächsten zwei Schritten wird Pixel für Pixel eine Medianmaske appliziert, welche im Radius von 5 Pixel und folgend 11 Pixel den Median des Signals um jeden Pixel errechnet. Dies generiert eine erhöhte Unschärfe des Entropie-Bildes, was infolgedessen zu einer Kantenglättung und Signalspreizung der sichtbaren Strukturen führt. Im Anschluss wird das Bild wieder auf Originalgröße skaliert.

Nachfolgend können die Zellflächen identifiziert werden, indem eine globale Binärisierung mit festem Grenzwert von 0,6 (60%) durchgeführt wird. Die in Abb. 5-3 zu sehenden roten Flächen entsprechen den Bereichen des Bildes, welche die 60% Schwelle überschritten haben und folglich Zellen enthalten.

In den nächsten Schritten werden die binären Flächen aufgereinigt, indem Löcher von einer maximalen Größe von 500 Pixeln geschlossen werden und morphologische Erosion im Radius 1 Pixel gefolgt von morphologischer Öffnung im Radius 9 Pixeln durchgeführt wird (Abb. 5-3). Öffnung und Schließung sind Kombinationen aus morphologischer Erosion und Dilatation und sind zusammengenommen morphologische Basisoperationen, welche in der digitalen Bildverarbeitung zur Aufreinigung verwendet werden [121]. Genauer bedeutet dies für die Öffnung eine Unterdrückung von lokalen Störungen durch helle Bildpunkte und für die Schließung eine Unterdrückung begrenzter dunkler Störungen [122]. Zudem glätten und verbinden diese morphologischen Operationen die Kanten der binären Maske. Gefolgt werden diese Schritte durch die Löschung von Flächen kleiner als 500 Pixeln und einer Erosion im Radius 5 Pixeln. Hiermit ist die akkurate Erkennung der Zellflächen abgeschlossen und es wird mit der Nukleuslokalisierung (Abb. 5 – blau hervorgehoben) fortgefahren.

Zu Beginn der Nukleusidentifizierung wird das Signal im Bild normalisiert (adjust). Im nächsten Schritt wird eine Phasenkorrelation mit dem Faktor 0,7 Pixel durchgeführt, was zu einer Aufhellung von signaldynamischen Bereichen führt (Abb. 5-5). Phasenkorrelation ist allgemein ein Ansatz um den relativen translativen Versatz zwischen zwei ähnlichen Bildern zu ermitteln und wird wie hier üblicherweise für die Bildregistrierung eingesetzt. In dem hier verwendeten Ansatz wird dasselbe Bild in der Phase um den genannten Faktor 0,7 Pixel verschoben und mit dem ursprünglichen, nicht verschobenen Bild einer Phasenkorrelation unterzogen. Im Endeffekt führt dies hier zu einer Aufhellung signaldynamischer Bereiche der Aufnahme.

Signaldynamische Bereiche befinden sich überwiegend dort, wo Zellen eine sehr komplexe und hohe Struktur aufweisen. Im Regelfall entspricht dies dem Zentrum der Zellen, in denen unter anderem der Zellkern zu finden ist. In diesen Bereichen führt es somit durch die Phasenkorrelation zur stärksten Aufhellung des Signals. Im Gegensatz dazu wird der für Phasenkontrastaufnahmen typische und die Zellen umringende Lichtkranzeffekt (Abb. 5-1, weißer Kranz um jede Zelle), durch die Phasenkorrelation auf Grund der fehlenden Signaldynamik, in dieser Region im Resultierenden Bild sehr dunkel dargestellt. Zusammengenommen werden die Zellen so von einem schwarzen Ring umrandet und besitzen im Zentrum einen gut definierten hellen Fleck (Abb. 5-5). Der so stark verstärkte Kontrast zwischen dem Zellzentrum und den Randregionen der Zellen ermöglicht eine präzise Lokalisierung der Zellen. In Kombination wird sogar die Trennung der einzelnen Zellen selbst bei leichtem Zell/Zell-Kontakt ermöglicht. Vor der Lokalisierung der Zellen wird das entstandene Bild noch in einem relativ großen Radius von 20 Pixeln mit einer Medianmaske überarbeitet, gefolgt von einer erneuten Normalisierung und einer zweiten Medianmaske mit einem Radius von 11 Pixel. Zusammengenommen führen diese Schritte zu einer weiteren Aufhellung und Eingrenzung des hellen Signalbereichs im Zentrum der Zellen und verbessern die Zellzentrumslokalisierung, durch die nun applizierte erweiterte h-Maxima-Binärisierung (Abb. 5-6). h-Maxima-Grenzwerte suchen im Allgemeinen nach Maxima, welche den Schwellenwert überschreiten, verbinden diese in einem angegebenen Radius und unterdrücken alle regionalen Nebenmaxima, welche die Schwellenwerttiefe unterschreiten. Die entstandene binäre Information wird in den weiteren Schritten wieder morphologisch aufgereinigt, indem sie im Radius 9 Pixel geöffnet wird, gefolgt von einer Dilation im Radius 15 Pixel. Flächen kleiner als 1000 Pixel werden gelöscht. Das Ergebnis der Nukleusidentifizierung ist in Abb. 5-7 dargestellt.

Im letzten Schritt werden beide binären Masken, entsprechend den roten Bereichen in Abb. 5-4 und Abb. 5-7, durch ein UND-Gatter verknüpft. Hierbei werden nur Bereiche übernommen welche sowohl in der Zellflächenidentifizierung als auch bei der Nukleusidentifizierung erkannt wurden. Dies dient dem effektiven Ausfiltern von fehlerhaft erkannten Zellfragmenten, bzw. „dreckigen“ Bereichen in der Zellkulturschale. Artefakte

dieser Art werden in der Regel nur in der Zellflächenidentifizierung erkannt (Abb. 5-3 und 5-4) und werden somit durch die Anwendung des UND-Gatters aussortiert. Zuletzt wurden Regionen kleiner als 800 Pixel in den neu erzeugten binären Flächen gelöscht und der Massenschwerpunkt jeder Fläche bestimmt. Die Massenschwerpunkte jeder Fläche dienen im Folgenden als Lokalisator der Zellen.

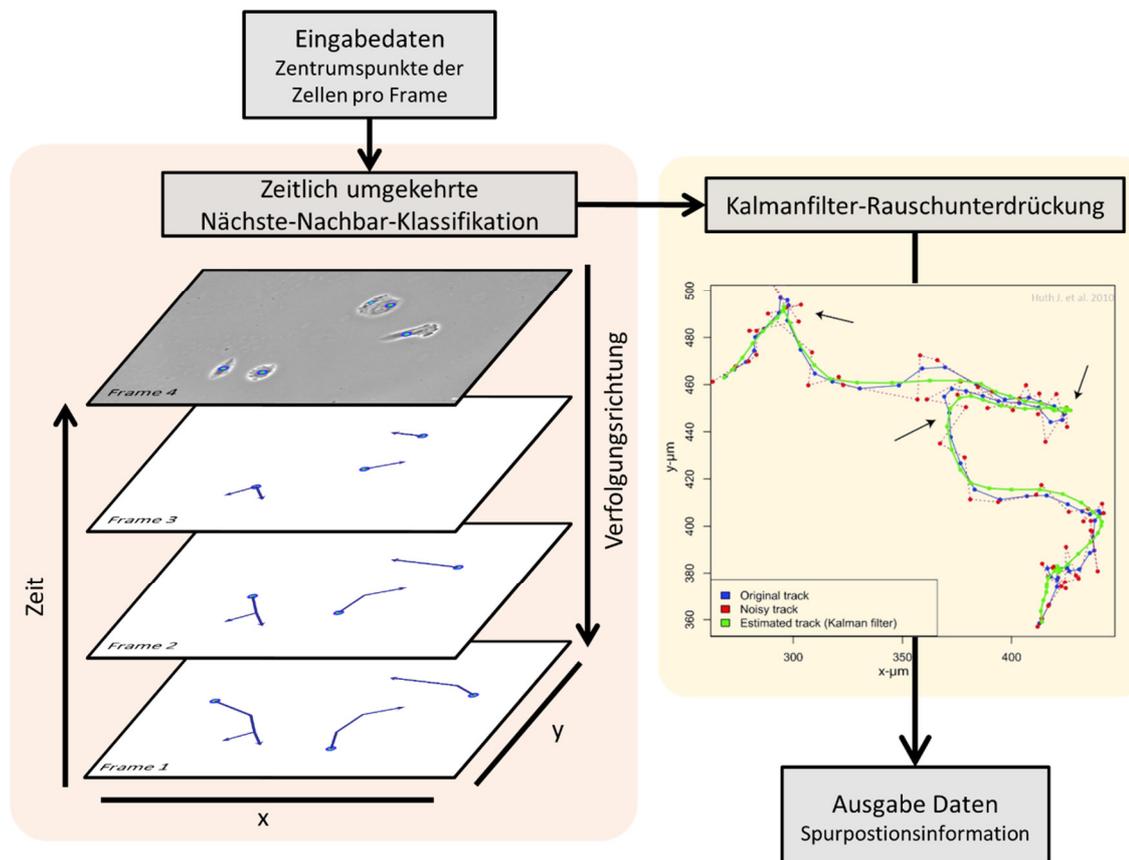


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Lokalisatorenverknüpfung über die Zeit

Mit Hilfe einer Nächsten-Nachbar-Klassifikation werden die in Abb. 5 erzeugten Zell-Lokalisatoren (blaue Hexagon) revers über die Zeit miteinander zu Zellspuren verknüpft (orange hervorgehoben). Diese Zellspuren werden einer Kalmanfilter-Rauschunterdrückung unterzogen, um die beste Schätzung des tatsächlichen Zellverlaufes zu generieren

Gelb hervorgehoben- Abbildung aus: [90] Huth et al. BMC Cell Biology, 2010, Figure 4, [CC BY 4.0].

Der zuvor erläuterte und in Abb. 5 dargestellte Arbeitsablauf wird schrittweise für jeden Frame des zu analysierenden Videos durchgeführt. Es ergeben sich somit Lokalisatoren für jede Zelle in jedem Frame im Verlaufe der Zeit. Diese Lokalisatoren werden nun, wie in Abb. 6 dargestellt, durch eine Nächste-Nachbar-Klassifikation verbunden. Begonnen wird mit dem letzten Frame dessen Lokalisatoren jeweils mit dem *a priori* Frame verknüpft werden. Im Analysisbereich von den „advanced options“ von TLA wurden die Parameter für die Nächste-Nachbar-Klassifikation wie folgt eingestellt. Die maximale Entfernung des nächsten Lokalisators betrug 400 Pixel und die minimale Länge einer Zellspur betrug 30 Frames. Pro registrierte Zellspur, durfte der Lokalisator in insgesamt 4 Frames verloren werden und 5

Frames lang in den Randbereich des Videos geraten. Ein Mitoseevent, welches sich durch die reverse Nachverfolgung, beginnend mit dem letzten Frame, als ein Verschmelzen zweier Zellspuren darstellt musste mindestens in 4 Frames vorliegen und in einer Mindestdistanz von 34 Pixeln stattfinden. Die hier verwendete Methodik um die Mitosen zu verarbeiten, hat allgemein den Vorteil, dass im laufenden Video keine neuen Zellspuren generiert werden müssen. Im Gegenteil kann pro Mitoseevent jeweils eine Zellspur gelöscht werden. Zusammengenommen reduziert dies die Fehleranfälligkeit der Methode, aufgrund falsch initiiertes Zellspuren im Verlauf der Videos.

Zur Aufreinigung der ermittelten Zellspuren wurde in TLA eine Kalmanfilter-Rauschunterdrückung durchgeführt, welche in Abb. 6 gelb hervorgehoben und exemplarisch dargestellt ist. Der Kalmanfilter bedient sich grundsätzlich einer begrenzten Vorhersage von Objektpositionen im Verlauf einer Bewegung, welche wiederum zur Ermittlung des besten Schätzwertes der tatsächlichen stattfindenden Bewegung verwendet werden. Der erzeugte Schätzwert kann wiederum verwendet werden, um die tatsächlichen Positionen in einer verrauschten Umgebung, präziser als es die eigentliche Messung zulassen würde, zu bestimmen. Der Kalmanfilter ist, wie in Huth et al. [90] beschrieben, angewandt worden ohne die dort vorgeschlagenen Werte der Filtermatrizen (Appendix 2.2) zu verändern.

4.1.1a) Die Kalmanfilter-Rauschunterdrückung

Zusammengefasst besteht die Kalmanfilter-Rauschunterdrückung grundlegend aus zwei Schritten, welche sich iterativ wiederholen. Zuerst wird, wie in Eq. 1 beschrieben, anhand des Bewegungsmodells (A , dargestellt in Appendix 2.2) und der vorangegangenen Bewegung ($t-1$), eine Vorhersage über die Position im nächsten Frame (*a priori*; \hat{s}_t) getroffen.

$$s_t = A * \hat{s}_{t-1} + w \quad (\text{Eq. 1})$$

Im nächsten Schritt (Eq. 2) wird der *a priori* Zustand korrigiert und neu vorhergesagt (\hat{s}_t). Dies geschieht in dem eine Gewichtung (K) der Differenz ($z_t - s_t$) zwischen der gemessenen verrauschten Position (z_t) und der bereits vorhergesagten Position (s_t) ermittelt wird.

$$\hat{s}_t = s_t + K(z_t - s_t) \quad (\text{Eq. 2})$$

Die Gewichtung wird daraufhin schrittweise verbessert in dem die Qualität der Vorhersage zwischen z_t und dem neuen s_t (zuvor als \hat{s}_t bestimmt) neu gewichtet wird, um wiederum ein neues \hat{s}_t zu bestimmen. Wenn die so ermittelte Vorhersage „gut“ ist, steigt die Gewichtung (K) zugunsten der *a priori* Vorhersage. Eine gute Vorhersage ist durch niedrige Residuen zwischen dem Bewegungsmodell (A) und der *a priori* Vorhersage im Vergleich zur gemessenen Position definiert. Wenn die so ermittelte Vorhersage hingegen „schlecht“ ist, d.h. das Bewegungsmodell A besitzt niedrigere Residuen mit den gemessenen Lokalisatoren, verschiebt sich die Gewichtung auf die Seite der eigentlichen Messung und unterdrückt somit die *a priori*

Vorhersage. Die beiden Schritte für die Bewertung werden nun iterativ wiederholt, bis die Gewichtung der *a priori* Vorhersage und des gemessenen Lokalisators sich ausgleichen und somit die bestmögliche Schätzung mit den niedrigsten Residuen zwischen der Schätzung, dem Bewegungsmodell und der tatsächlichen Messung erreicht ist.

4.1.1b) Statistik zur Kontrolle der Gleichverteilung der Zellspuren

Zur Analyse des Laufverhaltens der Zellen wurde ein Homogenitätstest für Vektoren nach Rayleigh durchgeführt. Der Rayleigh Testes, welcher ein p Schwellenwert Test ist, bestimmt die Signifikanz der Abweichung von der Normalverteilung der Zellspuren [123] und lässt sich wie folgt beschreiben:

$$C = \sum_{i=1}^n \cos \theta_i = \frac{x_i}{|P(x_i, y_i)|} \quad S = \sum_{i=1}^n \sin \theta_i = \frac{y_i}{|P(x_i, y_i)|} \quad (\text{Eq. 3})$$

C und S stehen hier jeweils für die Summe der Vektoren der Zellspuren in X und Y

$$R^2 = C^2 + S^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

R steht für die Hypotenuse der Summe der Vektoren in X und Y und damit dem Schwerpunkt der Gesamtbewegung der Kohorte

$$\bar{R} = \frac{R}{N} \quad (\text{Eq. 5})$$

\bar{R} entspricht dem mittleren Vektor aus C und S

$$\bar{Z} = n\bar{R}^2 \quad (\text{Eq. 6})$$

Z ist das Ausmaß der Winkelverteilung aller mittleren Vektoren

Für $n < 50$:

$$p = e^{-Z} \left(1 + \frac{2Z - Z^2}{4n} - \frac{24Z - 132Z^2 + 746Z^3 - 9Z^4}{288n^2} \right) \quad (\text{Eq. 7})$$

Für $n \geq 50$:

$$p = e^{-Z} \quad (\text{Eq. 8})$$

Der p -Wert wird mit einer Schwelle von 0,05 für die Normalverteilung der Vektoren aller Zellspuren in einem Video verwendet.

Mit dem Rayleigh-Test konnte ermittelt werden, ob die Zellen vom Startpunkt aus zufällig in eine Richtung laufen oder in einer Kohorte von Zellen vom Startpunkt aus gezielt in eine Richtung wandern. Gerichtete Bewegung und somit ein Überschreiten des p -Schwellenwertes,

wäre wiederum ein Hinweis auf chemotaktische bzw. eine beeinflusste Bewegung der Zellen. Diese Form der Bewegung würde einem unbekanntem Stoffkonzentrationsgradienten oder anderem Attraktor zu Grunde liegen und hätte möglicherweise großen Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen. Der Rayleigh-Test kann einen Wert zwischen 0 und 1 erzeugen, in dem 0 für eine perfekte zufällige Bewegung der Zellen einer Kohorte steht und 1 für eine perfekte Gleichausrichtung (Homogenität) der Bewegung aller Zellen der Kohorte. Der p -Schwellenwert für die Homogenitätsbestimmung der Bewegung wurde auf 0,05 gesetzt und in keiner gemessenen Probe überschritten.

Zusätzlich zum Rayleigh-Test wurde der Schwerpunkt der Zellbewegung ermittelt. Dieser wurde bei der Erstellung der Bilder angezeigt und als schnelle und einfache Kontrolle der Gleichverteilung des Zellspurenverlaufes verwendet. Eine Verschiebung des Schwerpunktes M_{end} vom Mittelpunkt M_{start} (0,0) kann als Indikator für die Ausrichtung der Bewegung einer Zellkohorte verwendet werden. In Abb. 7 ist der Schwerpunkt (rotes Kreuz) leicht in den negativen x -Achsenbereich verschoben (ca. 8 μm). Eine Verschiebung dieser Größenordnung wurde u.a. in Kombination mit dem Rayleigh-Test (welcher hier die Schwelle $p=0,05$ nicht überschritt) als zufällige Bewegung gewertet.

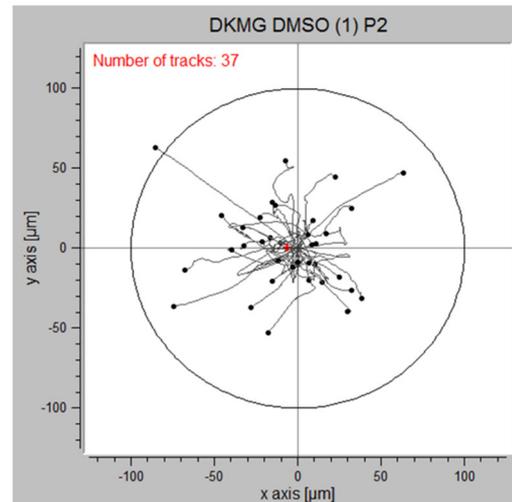


Abbildung 7: Zellspuren von DK-MG-Zellen

Zellspuren eines Zeitraffervideos von DK-MG-Zellen. Das rote Kreuz gibt den, nach Eq. 9 errechneten, Schwerpunkt der Bewegung wieder. Der Startpunkt (M_{start}) aller Zellbewegungen wurde auf den Ursprung (0,0) gesetzt.

$$M_{end} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_{i,end}, y_{i,end}) \quad (\text{Eq. 9})$$

$$M_{start} = (x = 0, y = 0) \quad (\text{Eq. 10})$$

Der Schwerpunkt M_{end} definiert sich als der statistische Mittelwert aller Endpunkte wohingegen der Startpunkt aller Zellspuren M_{start} auf den Ursprung des Koordinatensystems (0,0) gesetzt wurde.

4.1.1c) Statistik zur Ermittlung der Direktionalität der Zellspuren

Zur Ermittlung der Geradlinigkeit der Zellbewegung wurde die Direktionalität der Zellspuren im Verlauf des Videos bestimmt. Die Direktionalität berechnet sich wie in Eq. 11 beschrieben und in Abb. 8 schematisch dargestellt aus der Gesamtstrecke (GS) geteilt durch die Nettostrecke (NS):

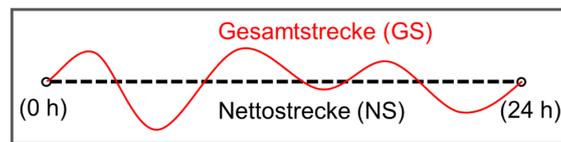


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Gesamtstrecke gegen die Nettostrecke

Die Gesamtstrecke entspricht der realen gelaufenen Strecke einer Zelle und die Nettostrecke entspricht dem euklidischen Vektor vom Start zum Endpunkt der Zellspur.

Abbildung modifiziert aus: [12]; Memmel et al., Oncotarget 8 (2017) 45298–45310 Figure 1D [CC BY 3.0]

$$D = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (GS_i / NS_i) \quad (\text{Eq. 11})$$

Nach Eq. 11 definiert sich die Direktionalität D , aus der Nettostrecke (NS), genauer der euklidische Strecke zwischen Startpunkt 0 h und Endpunkt 24 h, geteilt durch die über den gesamten Zeitraum bestimmten gelaufenen Gesamtstrecke (GS) (siehe Abb. 8). Die Direktionalität kann somit zwischen 0 (eine Strecke mit gleichem Start und Endpunkt) oder 1 (eine perfekten Gerade zwischen Start und Endpunkt) schwanken.

4.1.2 Anwendung der automatischen Einzelzellverfolgung zur Untersuchung der Migration von DK-MG- und SNB19-Zellen unter PI3K/mTOR- und Hsp90-Inhibition

Mit der modifizierten Methode zur automatischen Einzelzellverfolgung wurden DK-MG- und SNB19-Zellen unter PI3K/mTOR und/oder Hsp90-Inhibition in Kombination mit oder ohne Bestrahlung untersucht. Wie aus den Zellspuren der Kontrolle in Abb. 10 hervorgeht, zeigen DK-MG- und SNB19-Zellen ein unterschiedliches Migrationsverhalten. Unbehandelte DK-MG-Zellen weisen im Vergleich zu SNB19 eine erhöhte directionale Persistenz auf. Nach den mit Gleichung Eq. 11 berechneten Direktionalitäten, sowohl in bestrahlten und unbestrahlten Proben, stellen sich die Unterschiede wie folgt dar. DK-MG-Zellen weisen eine Direktionalität von $0,59 \pm 0,01$ und $0,62 \pm 0,01$ (\pm SE) auf, während SNB19-Zellen mit $0,53 \pm 0,01$ und $0,51 \pm 0,01$ signifikant ungerichteter laufen. Die Geschwindigkeit beider Zelllinien ist ohne Bestrahlung mit $0,18 \pm 0,003$ $\mu\text{m}/\text{min}$ (\pm SE) für DK-MG und $0,19 \pm 0,006$ für SNB19 vergleichbar. Zusammengefasst führt dieses Verhältnis der Direktionalität und Geschwindigkeit zu dem um etwa 10% größeren euklidischen Abstand vom Ursprung zum Endpunkt der Zellspuren (Abb. 10B, DMSO). Neben dem Unterschied im Migrationsverhalten sind in den Phasenkontrastvideos (Abb. 10A, DMSO) Unterschiede in den Lauffronten der Zellen zu erkennen. DK-MG-Zellen stellen sich, wie in Abbildung 9 zu sehen, durch eine stark polarisierte Zellmorphologie dar. Sie weisen eine breite gut definierte Lauffront (Lamellipodium) auf und ziehen eine schmalere hintere Kante nach sich. SNB19-Zellen sind im starken Kontrast hingegen durch mehrfache spontan entstehende Lamellipodia charakterisiert. Die vielen Lamellipodia ziehen die SNB19-Zellen in verschiedene Richtungen und haben somit einen starken Einfluss auf deren Bewegungsrichtung (Abb. 9, weißen Pfeile). SNB19-Zellen weisen zudem keine oder nur sehr kleine transiente Blebs in den Lamellipodia auf, wohingegen bei DK-MG-Zellen das gesamte Lamellipodium mit transienten Blebs bestückt ist. Die Blebs sind in den Phasenkontrastaufnahmen in Abb. 9 als dunkle sphärische Körper sichtbar.

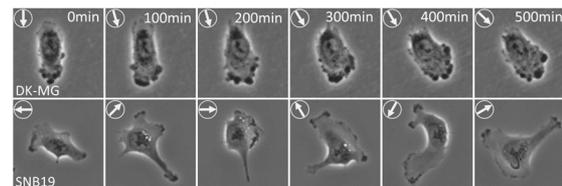


Abbildung 9: Richtungspersistenz bei DK-MG- und SNB19-Zellen

Die Aufnahmen wurden alle 100 min über 500 min Gesamtdauer angefertigt. Die Pfeile beschreiben die Richtung der Bewegung des Zellkörpers.

Abbildung aus: [12] Memmel et al., *Oncotarget* 8 (2017) 45298–45310 Figure 1C [CC BY 3.0]

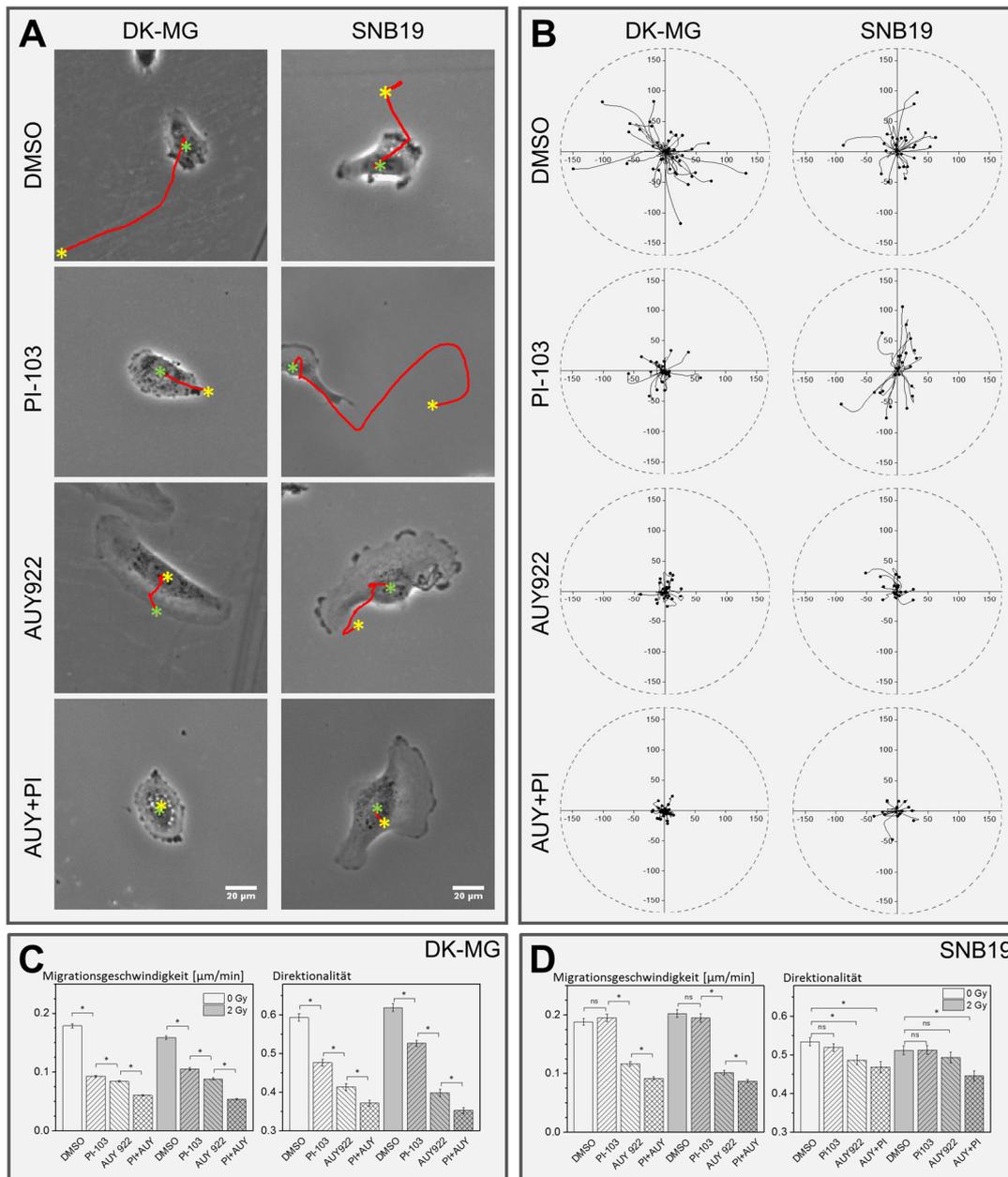


Abbildung 10: Effekte der PI3K/mTOR- und Hsp90-Inhibition auf die Motilität von DK-MG- und SNB19-Zellen gemessen durch die automatische Einzelzellverfolgung bei bestrahlten und unbestrahlten Proben

Panel A zeigt repräsentativ die typische Morphologie und das Bewegungsverhalten bei unbestrahlten (DMSO Kontrolle) oder inhibitorbehandelten unbestrahlten Zellen. Rote Linien geben hier den Migrationsweg der Zellen wieder. Des Weiteren zeigen die gelben Sternchen (*) den Startpunkt bei 0 h und grüne Sternchen (*) den Endpunkt der Migration nach 5 h an. Es handelt sich hierbei um einen Auszug aus Phasenkontrastvideos mit einer Zelllokalisierung alle 10 min über einer Gesamtdauer von 5 h. Panel B ist die Zusammenfassung aller lokalisierten Zellen eines Videos im gleichen Zeitverlauf. Die Startposition jeder Zellspur wurde auf den Ursprung (0,0) des Graphen gelegt. Schwarze Punkte zeigen den Endpunkt nach 5 h an. Die Gesamtergebnisse sind in Panel C und D als arithmetisches Mittel \pm SE der Migrationsgeschwindigkeit (gesamt abgelaufene Strecke geteilt durch die Zeit) oder der Direktionalität (Gleichung 11 und Abb. 8) von mindestens 500 Zellen pro Bedingung. Weiße und graue Balken zeigen jeweils unbestrahlte und bestrahlte Proben. Schwarze * steht für einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) und „ns.“ bedeutet nicht signifikant.

Abbildung aus: [12] Memmel et al., *Oncotarget* 8 (2017) 45298–45310 Figure 1 [CC BY 3.0]

Die Behandlung der DK-MG-Zellen mit PI-103 (PI3K/mTOR Inhibitor) oder AUY922 (Hsp90 Inhibitor) führte ohne Bestrahlung zu einer stufenweisen, jeweils signifikanten ($p < 0.05$), Reduzierung der Migrationsgeschwindigkeit (Abb. 10C). Die DK-MG-Zellen verlangsamten sich von $0,18 \pm 0,003$ bei PI-103 Behandlung um 50% auf $0,09 \pm 0,002$ und bei AUY922 um 56% auf $0,08 \pm 0,002$ $\mu\text{m}/\text{min}$ ($\pm\text{SE}$). Die Kombination beider Inhibitoren hatte mit einer Abschwächung der Migration um 77% auf $0,06 \pm 0,002$ $\mu\text{m}/\text{min}$ den mit Abstand größten Effekt. In den Phasenkontrastvideos (Auszug abgebildet in Abb. 10A, linke Spalte) ist zu erkennen, dass die DK-MG-Zellen bei Inhibitorbehandlung ihre Lamellipodia und Polarität nahezu vollständig verlieren. Des Weiteren kommt es unter der Einzelbehandlung mit AUY922 zu einer markanten Größenzunahme der Zellfläche. Die Direktionalität der Bewegung von DK-MG-Zellen nahm bei unbestrahlten Proben signifikant schrittweise, entsprechend dem Behandlungsschema (PI-103, AUY922 und AUY+PI) von $0,59 \pm 0,001$ um 20% auf $0,47 \pm 0,001$, um 27% auf $0,43 \pm 0,001$ und um 37% auf $0,37 \pm 0,001$ ab. Nach der Bestrahlung verhielten sich die DK-MG-Zellen ähnlich zu den unbestrahlten Proben. Die Migrationsgeschwindigkeit nahm von $0,15 \pm 0,003$ bei PI-103 Behandlung um 27% auf $0,11 \pm 0,002$ und bei AUY922 Behandlung um 40% auf $0,09 \pm 0,002$ $\mu\text{m}/\text{min}$ ab. Die duale Behandlung mit beiden Inhibitoren erzielte ebenfalls den größten Effekt mit einer Reduzierung um 70% auf $0,05 \pm 0,001$. Die Direktionalität der bestrahlten DK-MG-Zellen nahm ebenfalls in signifikanten Schritten und vergleichbar mit den unbestrahlten Proben von $0,62 \pm 0,01$ um 16% auf $0,53 \pm 0,008$, um 35% auf $0,40 \pm 0,009$ und um 44% auf $0,45 \pm 0,008$ entsprechend der Kontrolle, PI-103, AUY922, und der doppelten Behandlung ab.

Wie in Abb. 10C zu sehen trat bei SNB19-Zellen nach der PI3K/mTOR Inhibition mit PI-103 keine Reduzierung der Geschwindigkeit der Zellen auf. Mit $0,19 \pm 0,006$ für die Kontrolle und $0,19 \pm 0,006$ $\mu\text{m}/\text{min}$ für die PI-103-behandelten Zellen blieb die Motilität der Zellen identisch. In bestrahlten Zellen gab es mit $0,20 \pm 0,007$ und $0,19 \pm 0,007$ ebenso keinen Unterschied zwischen der Kontrolle und PI3K/mTOR Inhibition. Zusätzlich ist in den Phasenkontrastvideos entsprechend den repräsentativen Aufnahmen (Abb. 10A, rechte Spalte) zu sehen, dass es keine erkennbare Veränderung in der Zellmorphologie unter PI-103 Behandlung gab. Die Inhibierung von Hsp90 führte hingegen zu einer signifikanten Reduzierung der Geschwindigkeit. Sie nahm bei den unbestrahlten SNB19-Proben um 43% auf $0,12 \pm 0,004$ und bei den bestrahlten Proben um 50% auf $0,10 \pm 0,004$ ab. Außerdem führte die duale Inhibition, wie bei DK-MG, zu einer zusätzlichen signifikanten Reduzierung der Geschwindigkeit verglichen mit der einfachen Hsp90-Inhibierung. Genauer nahm die Zellmigration bei den unbestrahlten Proben auf $0,09 \pm 0,003$ $\mu\text{m}/\text{min}$ ab (53% Abnahme verglichen mit der Kontrolle) und bei den bestrahlten Proben $0,09 \pm 0,003$ $\mu\text{m}/\text{min}$ ab (55% Abnahme verglichen mit der Kontrolle). Die Direktionalität der SNB19-Zellen blieb, im Vergleich der Kontrolle und PI-103-Behandlung, mit $0,53 \pm 0,01$ und $0,52 \pm 0,01$ für die unbestrahlten und $0,51 \pm 0,01$ und $0,51 \pm 0,01$ für die bestrahlten SNB19-Zellen ebenfalls unverändert. Die AUY922-Behandlung führte nur für die unbestrahlten Proben zu einer

signifikanten Reduzierung der Direktionalität. Sie nahm um 8% auf $0,49 \pm 0,01$ und um 4% auf $0,49 \pm 0,01$ für die jeweils unbestrahlten und bestrahlten SNB19-Zellen ab. Die duale Behandlung führte sowohl bei unbestrahlten, sowie bestrahlten SNB19-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Direktionalität, mit jeweils 12% auf $0,47 \pm 0,01$ und $0,45 \pm 0,01$. Sowohl die AUY922 als auch die Kombinationsbehandlung hatte einen sichtbaren Effekt auf die Morphologie der SNB19-Zellen (Abb. 10A, rechte Spalte). Die gesamte sichtbare Zellfläche wurde hier jeweils größer und die multiplen Lamellipodia, wenn vorhanden, wurden kleiner und waren in den Phasenkontrastbildern nicht mehr so stark ausgeprägt.

Zusätzlich wird aus Abb. 10A und den zugrundeliegenden Videos (Daten nicht gezeigt) für die jeweils doppelt-behandelten Zellen (AUY+PI) ersichtlich, dass es bei nahezu allen DK-MG-Zellen zu einer vollständigen Inhibierung der Bewegung der Zellkörper kommt ($\sim 0 \mu\text{m}/\text{min}$). Die Einzelzellverfolgung erfasste diesen Zustand allerdings mit einer Geschwindigkeit von $0,40 \mu\text{m}/\text{min}$. Unter Begutachtung der unbearbeiteten Videos (Daten nicht gezeigt) wird ersichtlich, dass es sich hierbei um intrinsische Zellbewegung handelt. Intrinsische Zellbewegung umfasst die Bewegung aller Zellorganellen und führt zur leichten Bewegung der in der Einzelzellverfolgung ermittelten Zelllokalisatoren. Dies erzeugt selbst bei stehenden Zellkörpern eine minimalen Grundgeschwindigkeit in der Einzelzellverfolgung. Der gleiche Effekt gilt für SNB19-Zellen. Allerdings sind diese Zellen selbst bei stehenden Zellkörpern beweglicher, was zu einer höheren Dynamik der Zellkernbewegung und folglich des Lokalisators führt.

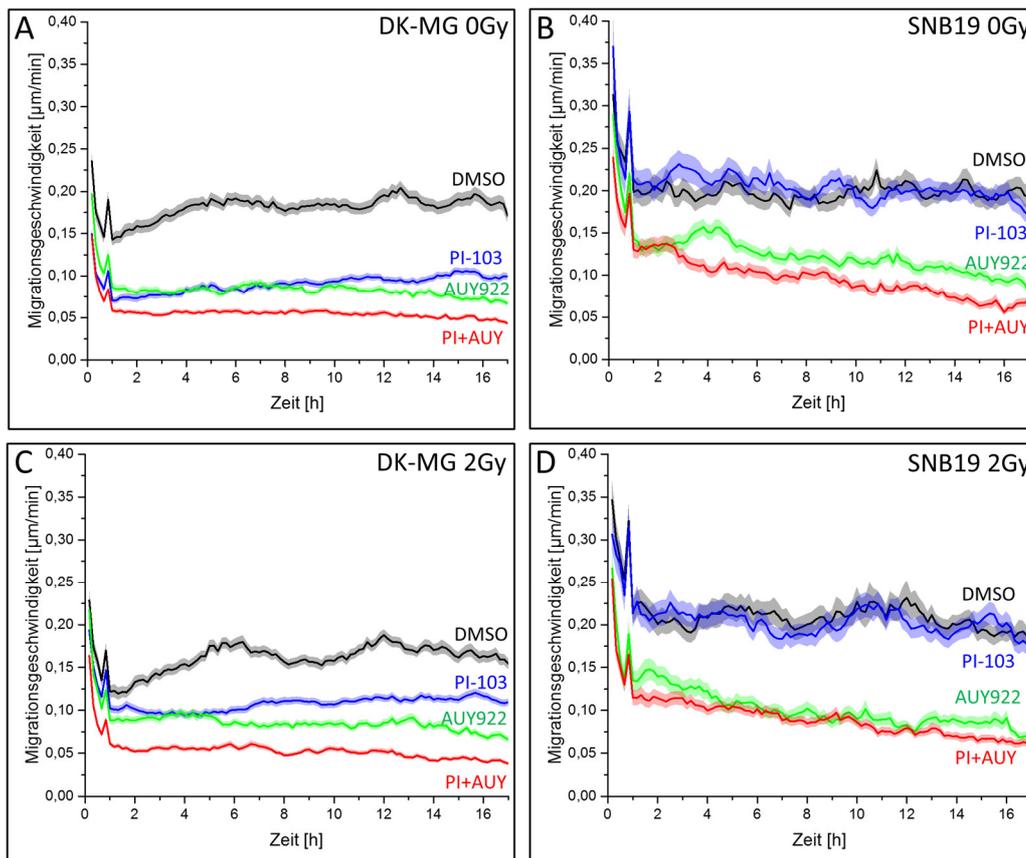


Abbildung 11: Zeitabhängiger Einfluss der PI3K/mTOR- und Hsp90-Inhibition auf die Motilität von DK-MG- und SNB19-Zellen ermittelt durch Aufarbeitung der Einzelzellverfolgungsdaten

Dargestellt sind die Einzelzellverfolgungsdaten aus Abb. 10 indem die Zellspuren zeitlich sortiert und zeitabhängig gemittelt wurden (\pm SE). Panel A und C zeigen den Verlauf der Geschwindigkeit von jeweils bestrahlten und unbestrahlten DK-MG-Zellen und der DMSO Kontrolle, PI-103, AUY922 Behandlung und der Kombination von PI-103 und AUY922 Behandlung. Panel B und D zeigen entsprechend den Verlauf der Geschwindigkeit bei SNB19-Zellen.

Im nächsten Schritt wurden mit Hilfe des Excel-Makros, (siehe Appendix 4), die Zellspuren aller Videos einer Bedingung zeitlich sortiert und für jeden Zeitpunkt gemittelt. Dies erlaubte, wie in Abb. 11 dargestellt, den zeitabhängigen Einfluss der Inhibitoren auf die Zellgeschwindigkeit zu ermitteln. In jeder Bedingung ist hier im Zeitbereich 0-30 min, also in den ersten 3 Frames des Videos (10 min pro Frame), eine starke Abnahme der Geschwindigkeit, direkt gefolgt von einem spitzen Peak bei 30 min zu erkennen. Hierbei handelt es sich um ein Artefakt, bedingt durch die nächsten Nachbarklassifikation, in welcher ein Verlust des Zelllokalisators von maximal 4 Frames vorgesehen ist. Dies bedeutet, dass in stabilen und somit Lokalisator verlustfreien Zellspuren die ersten \sim 4 Frames vom tatsächlichen Verlauf der Zellspur abgeleitet werden. Folglich muss die Kalmanfilterung (siehe 4.1.1a) mit fehlerhaften *a priori* Bedingungen arbeiten und die Gewichtung K wird falsch ermittelt. Resultierend führt dies zur Überschätzung der Geschwindigkeiten und den dargestellten Spitzen. Die Überschätzung hält an bis sich die Gewichtung K nach \sim 3-4 Frames eingependelt hat. Auf die statistische Auswertung (Abb. 11C, D) hat dies aufgrund der hohen Gesamtframezahl (\sim 108 Frames) nahezu keinen Einfluss ($<5\%$).

Im Anschluss an die Messartefakte im 0-40 min Bereich, ist bei nahezu allen Bedingungen nach ~40 min ein linearer Verlauf der Geschwindigkeiten ermittelt worden. Die Höhe der linear-verlaufenden Bereiche, ergo die Geschwindigkeit der Zellen zum Mittelpunkt (8 h 10 min) der linearen Regression zwischen 40 min und 17 h, entspricht den in Abb. 10C und D über die gesamte Zeit statistisch ermittelten Geschwindigkeiten. Verglichen mit der statistischen Auswertung ergab sich eine relative Differenz von maximal ~8% zu den mit der linearen Regression ermittelten Werten. Für DK-MG-Kontrollzellen wurde für diesen Vergleich die lineare Regression auf 5 h - 17 h eingeschränkt und blieb auch hier im Bereich von ~3% verglichen mit der statistischen Auswertung.

Anhand der Steigung der angewendeten linearen Regressionen, ließen sich im Folgenden die Geschwindigkeitszunahmen im Verlauf der Aufnahme ermitteln. Für die DK-MG-Kontrollzellen wurden die linearen Regressionen separat auf die Bereiche von 40 min – 5 h und 5 h-17 h angelegt. Diese Einschränkungen waren für die DK-MG-Kontrollzellen (Panel A/B – schwarzer Graph) nötig, da sie zu Beginn zwischen 40 min und ~5 h, sowohl bei bestrahlten als auch unbestrahlten Zellen, eine signifikante Beschleunigung der Migrationsgeschwindigkeit mit $+7,1 \pm 0,20 \mu\text{m/s}^2$ und $+7,6 \pm 0,27 \mu\text{m/s}^2$ um insgesamt $\sim 0,05 \mu\text{m/s}^2$ aufweisen. Gefolgt wird diese Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit von einem stabilen linearen Verlauf (Beschleunigung $> 0,3 \mu\text{m/s}^2$) und von Schwankungen im Bereich um $0,025 \mu\text{m/min}$. SNB19-Zellen wiesen im Gegensatz in der Kontrolle in diesem Zeitfenster (40 min - 17 h) keine nennenswerte Beschleunigung ($< +0,9 \mu\text{m/s}^2$) der Migration auf (Abb. 11, schwarze Graphen). Bei den unbestrahlten DK-MG-Zellen unter PI-103 Behandlung (Abb. 11, blaue Graphen) ist über den gesamten Verlauf eine leichte Abnahme der Geschwindigkeit mit $-1,18 \pm 0,6 \mu\text{m/s}^2$ von $\sim 0,075$ auf $\sim 0,1 \mu\text{m/min}$ zu sehen.

Mit 2 Gy bestrahlten DK-MG-Zellen zeigten nach PI-103-Behandlung leichte Schwankungen der Geschwindigkeit (um $\sim 1 \mu\text{m/min}$) auf. Insgesamt blieb die Migrationsgeschwindigkeit, mit einer minimalen Beschleunigung von $< 0,8 \mu\text{m/s}^2$, auf einem stabilem Level. Bei den SNB19-Zellen unter PI-103-Inhibitorbehandlung verlangsamte sich die Migrationsgeschwindigkeit mit $-1,03 \pm 0,12 \mu\text{m/s}^2$ über den gemessenen Zeitraum. Bei 2 Gy Strahlung blieben die SNB19-Zellen, abgesehen von den Schwankungen im Bereich von $0,179-0,231 \mu\text{m/min}$, bei PI-103 Behandlung mit einer minimalen Abnahme von $< -0,6 \mu\text{m/s}^2$ relativ stabil. Die Behandlung mit AUY922 (Abb. 11, grüne Graphen) führte unabhängig von der Bestrahlung bei DK-MG-Zellen sowohl mit $< 0,67 \mu\text{m/s}^2$ zu keiner nennenswerten Geschwindigkeitsveränderung. Wohingegen SNB19-Zellen jedoch mit $-2 \pm 0,8 \mu\text{m/s}^2$ und $-2 \pm 1 \mu\text{m/s}^2$ für 0 und 2 Gy eine eindeutige Reduzierung der Geschwindigkeit über den gemessenen Zeitraum aufweisen. Der gleiche Effekt trat bei der gleichzeitigen Behandlung mit AUY922 und PI-103 auf (Abb. 11, rote Graphen). SNB19 wurden mit $-2,5 \pm 0,7 \mu\text{m/s}^2$ und $-2,1 \pm 0,5 \mu\text{m/s}^2$ über die Dauer der Messung langsamer, während DK-MG-Zellen bei der gleichzeitigen Behandlung mit $< 0,67 \mu\text{m/s}^2$ relativ stabil blieben.

Durch die zeitaufgelöste Betrachtung der Migrationsgeschwindigkeiten in der Einzelzellverfolgung können somit zeitverzögerte Effekte der Inhibitorbehandlung, insbesondere für die Behandlung durch den Hsp90 Inhibitor AUY922 beobachtet werden. Unter Begutachtung der Videos und Erfahrung mit dritten Zelllinien stellt sich allerdings schnell heraus, dass sich dieser Effekt bedingt durch die vermehrte Apoptose unter AUY922 Behandlung einstellt. Sterbende Zellen verlieren kurz vor der Apoptose ihre Bewegungsfähigkeit, werden allerdings noch für einen kurzen Zeitraum durch die Software mit verfolgt.

4.1.3 Ausarbeitung einer neuen automatischen Methode zur Zellflächenlokalisierung im Wundheilungsassay

Zusätzlich zur Einzelzellverfolgung wurde im nächsten Teil der Arbeit die Migration von Zellmonolayern, entgegen der Migration einzelner Zellen, mithilfe des Wundheilungsassays untersucht. Entgegen der Einzelzellverfolgen gewinnen Zell zu Zell Kommunikation und Zellmatrixeffekte an Prominenz und fließen somit mit in die Untersuchung ein [124].

Es wurde mit einer Pipettenspitze eine Wunde im konfluenten Zellrasen erzeugt und mit der BioStation IM für 18 h bei 10 min pro Frame aufgenommen. Die entstandenen Zeitrafferaufnahmen wurden zu Beginn des Projektes per Hand unter Zuhilfenahme des Bildanalyseprogrammes ImageJ ausgewertet. Im ersten Schritt wurde den Bildeigenschaften die passenden Pixeldimensionen von $0,44125 \mu\text{m}$ pro Pixel ($706 \mu\text{m} \times 530 \mu\text{m}$ für das gesamte Video) zugewiesen. Die zellfreien Räume wurden im nächsten Schritt mit Hilfe des Polygonselektionswerkzeugs einmal zu Beginn der Aufnahme markiert und jeweils separat in den ROI-Manager überführt. Über die XOR-Funktion konnten die Selektionen kombiniert und die Dimensionen in μm^2 des zellfreien Raumes ermittelt werden. Indem dieser Schritt für den Zeitpunkt des ersten Kontaktes beider Lauffronten (~ 8 h) wiederholt wurde konnte über die Differenz der Fläche des zellfreien Raumes von $0 - 8$ h die Spaltschlussgeschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{min}$ ermittelt werden.

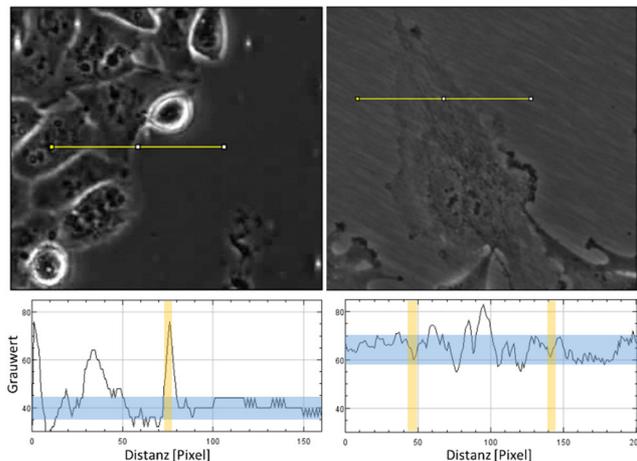


Abbildung 12: Vergleich des Signalverlaufes zwischen Zellen in der Lauffront eines Wundheilungsassays

In der linken Aufnahme und dem zugehörigen Graphen ist der Signalverlauf in der gelben Geraden von der Lauffront von DK-MG-Zellen dargestellt. Im Graphen gelb hervorgehoben ist die Grenzregion zwischen Zelle und Hintergrund. Blau abgegrenzt ist das Hintergrundsignal der Probenkammern. Die rechte Aufnahme und Graphen zeigt den Signalverlauf bei SNB19-Zellen.

Da die oben genannte Analyse-methode sehr arbeits- und zeitaufwändig ist und die ermittelte Geschwindigkeit nur durch die lineare Regression zweier Punkte bestimmt wird, wurde im Laufe dieses Projektes eine neue Methode zur Erkennung der Zellflächen im Wundheilungsassay entwickelt, welche auf der Bestimmung der zeitabhängigen Signaldynamik zwischen zwei Zeitpunkten pro Pixel basiert. Der hier beschriebene Arbeitsablauf wird in der von Huth et al. [90] entwickelten Softwareumgebung TLA durchgeführt. Huth et al. [90] haben ebenfalls einen Arbeitsablauf zur automatischen Analyse von Wundheilungsassays erstellt, welcher allerdings auf sehr großen Signaldifferenzen zwischen den Zellen und dem Hintergrund angewiesen ist.

Bei Phasenkontrastmikroskopieaufnahmen, wie in der BioStation IM, wird der Kontrast von Phasengrenzen verstärkt (z.B. die Wasser/Fett/Wasser-Grenzen biologischer Membranen). Dies führt, bei Zellen mit einer ausgeprägten 3D-Struktur und hoher Granularität im Zellverband, zu den für die Erkennung benötigten Signaldifferenzen (siehe Abb. 12A). Bei den untersuchten Glioblastomzellen liegen die Zellen allerdings häufig sehr gespreitet und damit flach vor. Dies führt gerade in den Lauffronten der Zellen zu einem schwachen Kontrastverhältnis. Für die Analyse des Wundheilungsassays sind die Lauffronten der Zellen allerdings ein wichtiges Kriterium zur Ermittlung der Spaltschlussrate. Niedriger Kontrast führt in einer kontrastbasierten Lauffronterkennung unweigerlich zu einer schlechten oder fehlerhaften Detektion der Wachstumsgrenze (Abb. 12B). Aus diesen Gründen konnte der von Huth et al. [90] vorgeschlagene Arbeitsablaufs in der TLA-Umgebung hier nicht eingesetzt werden. Es wurde daher eine neue Detektionsmethode implementiert, welche vorrangig von zeitlichen Signalunterschieden zwischen dem *a priori* (-1) und aktuellen Frame (0) abhängig ist (siehe Appendix 1). Signalunterschiede der Phasenkontrastaufnahmen in diesem Zeitfenster, entstehen primär durch intrinsische Bewegungen der Zellkompartimente und nur sekundär durch die Bewegungen des gesamten Zellkörpers.

Die intrinsische Zellbewegung, welche in den Phasenkontrastaufnahmen sichtbar ist, fasst sich aus den minimalen Bewegungen aller Zellkompartimente zusammen. Sie weist bei allen Zellen im Zeitfenster von 10 Minuten in etwa eine vergleichbare Aktivität auf. Sie findet somit in den gesamten, mit Zellen besetzten Bereichen, im Video statt. In den zellfreien Bereichen tritt keine vergleichbare Bewegung in diesem Zeitrahmen auf. Dieser Effekt ermöglicht somit die akkurate Trennung beider Bereiche und ist unabhängig von dem tatsächlichen Kontrast der Zellen im Video (Abb. 13). Selbst bei sehr artefaktreichen Aufnahmen, z.B. ausgelöst durch Zellfragmente von apoptotischen Zellen [125] bei hohen Bestrahlungsdosen oder zellschädigenden Inhibitorbehandlungen, konnten die Videos hier ohne größere Schwierigkeiten durch Anwendung der beschriebenen Methodik ausgewertet werden (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst ermöglicht dies eine vielseitige Verwendung der auf Signaldynamik basierten, robusten Zellflächenerkennung für die Wundheilungsassays.

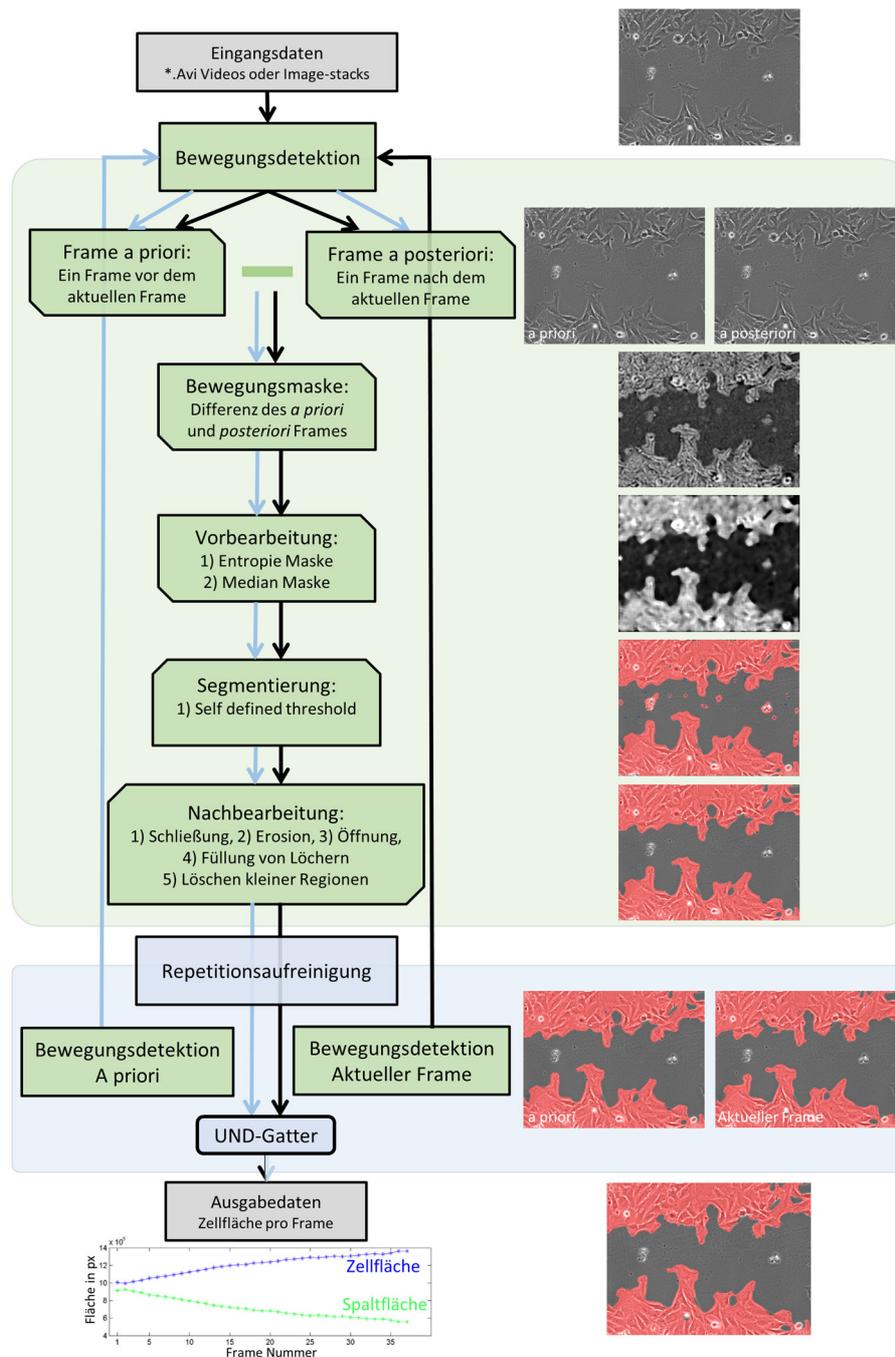


Abbildung 13: Schema der wichtigsten Schritte des TLA-Arbeitsablaufes bei dem Wundheilungsassay

Die Eingabedaten werden pro Frame den dargestellten Operationen unterzogen. Die Abbildungen (rechts) repräsentieren den jeweiligen, auf derselben Ebene stehenden Schritt des Schemas dar. Die im Schema dargestellten Operationen sind in die folgenden zwei Bereiche unterteilt (grün und hellblau). Begonnen wird mit der Detektion dynamischer Bereiche in dem Frame. Hierfür wird der Frame *a priori* (-1) und *a posteriori* (+1) des aktuellen Frames voneinander subtrahiert. Die entstehende „Bewegungsmaske“ weist helle Bereiche mit ausgeprägter zeitlicher Dynamik und dunkle Bereiche mit geringer zeitlicher Dynamik auf. In der Vorbereitung wird das Signal durch einen Entropiefilter gespreitet und durch einen Medianfilter weichgezeichnet. Die Segmentierung erzeugt mit Hilfe eines „self defined threshold“ eine binäre Maske (rot). Die Nachbearbeitung sorgt für eine Kantenglättung und unterdrückt Artefakte der binären Maske durch eine Reihe von morphologischen Operationen.

In der Repetitionsaufreinigung (blau) wird die gesamte beschriebene Bewegungsdetektion (grün) noch einmal *a priori* (Frame -1) durchgeführt und die so entstandene zweite binäre Maske durch ein UND-Gatter mit der ersten binären Maske verrechnet.

Durch den Einsatz der Analysesoftware TLA von Huth et al. [90] und dem in Abb. 13 beschriebenen, von Grund auf neuentwickeltem, Algorithmus für TLA ist es möglich bei einer bewegungsstabilen Aufnahme signaldynamische Bereiche (mit Zellen bewachsene Flächen) und signalstabile Bereiche (zellfreie Räume) zu unterscheiden. Die neue Methode ist extrem robust gegenüber zelltypspezifischen morphologischen Unterschieden und kann ohne Feinjustierung der Parameter auf verschiedene Zelltypen angewandt werden. Der Aufbau des Arbeitsablaufes stellt sich wie folgt dar.

Begonnen wird mit der Generierung der Bewegungsmaske durch eine Subtraktion des *a priori* (-1) und *a posteriori* (+1) Frames in Bezug zu dem laufenden Frame. Dies erzeugt ein Bild indem sich signalstabile Bereiche dunkel darstellen und signaldynamische Bereiche hell. Das entstandene Bild wird darauf hin um den Faktor 0,5 Pixel verkleinert um die Rechenzeit der folgenden Operationen um den Faktor 4 Pixel zu verkürzen.

Bei der Vorbereitung findet eine Pixel für Pixel Verrechnung statt bei der die lokale Entropie im Radius von 9 Pixeln errechnet wird. Pixel umgeben von hoher Entropie, welche somit vor der Bewegungsdetektion eine hohe Signaldynamik aufweisen, werden heller dargestellt und Pixel umgeben von geringer Entropie, welche eine hohe Signalstabilität aufweisen, dunkler. Durch den relativ großen Radius von 9 Pixeln, in dem die Entropie ermittelt wird, verteilt sich das Signal abhängig von der Entropie über den gesamten Zellkörper. Im Anschluss wird durch einen Median-Filter mit dem Radius von 20 Pixeln eine Weichzeichnung vorgenommen, welche zu einer Spreitung des Signals über die Zelle führt. Dies ist nötig um, die hochdynamischen Zellränder (extrem hell) zusammen mit den Zellkörpern (relativ dunkel) gut vom zellfreien Hintergrund abzuheben und das Bild auf die nun folgende Binärisierung vorzubereiten. Dieser Effekt ist in Abb. 13 im „Bewegungsmaske“ Bild zu erkennen.

Der angewendete Schwellenoperator ist ein „*self defined threshold*“, welcher auf eine Signalschwelle von 22% gesetzt wurde. Hierdurch wird eine binäre Maske generiert welche bereits die Zellflächen gut erkennt, allerdings noch grobe Fehler in den Zellfronten aufweist (Abb. 13, „Segmentierung“ rote Fläche). Zudem sind noch einige Zellfragmente in dem zellfreien Raum zu erkennen. Vor der folgenden Nachbearbeitung wird das Bild wieder auf Originalgröße skaliert (Faktor 2).

In der Nachbearbeitung wird die generierte Maske aufgereinigt, indem die folgenden morphologischen Bildoperationen durchgeführt werden. Zuerst wird eine morphologische Schließung im Radius von 10 Pixeln gefolgt von Erosion im Radius von 5 Pixeln durchgeführt. Zusammengenommen glätten diese morphologischen Operationen die Kanten der binären Maske. Im Anschluss werden Löcher kleiner als 1000 Pixel geschlossen und Regionen kleiner als 8000 Pixel gelöscht.

Im nächsten Schritt wird *a priori* die gesamte bereits erwähnte Bewegungsdetektion wiederholt. Die errechnete binäre Maske wird daraufhin über ein logisches UND-Gatter mit der zuvor generierten binären Maske verrechnet. Somit werden nur Pixel welchen mindestens 2 Frames (10 Minuten) lang eine binäre 1 (rote Flächen) zugewiesen wird, in die finale Maske überführt. Dies führt effektiv zu einem Filter gegen sich schnell bewegende Fremdkörper im Video. Fremdkörper können sich u.a. als verschiedene vorbeiziehende Aggregate im Medium, sonstige Zellfragmente oder ganze losgelöste/schwimmende Zellen darstellen. Insgesamt gehören die Fremdkörper nicht zu den Zellmonolayerfronten und sollten damit auch nicht vermessen werden.

Im letzten Schritt wird in der Subregion (1x:1y bis 2x:2y) von der binären Maske abgezogen und damit auf 0 gesetzt. Somit wird ein 4 Pixel großer quadratischer Leerraum in der oberen linken Ecke der binären Maske erzeugt. Dies verhindert, dass die ermittelte binäre Fläche das gesamte Bild ausfüllen kann, wodurch in der TLA internen Matrix-Berechnung einen kritischen Fehler in der Matlab runtime entstehen würde.

Durch den Einsatz der Analysesoftware TLA mit dem beschriebenen Arbeitsablauf ist es nun möglich eine lineare Regression zur Ermittlung der Geschwindigkeit, durch alle relevanten Datenpunkte (Zeiten) durchzuführen. Es können ebenfalls zeitabhängige Regressionen durchgeführt werden, vorausgesetzt die Migrationsgeschwindigkeit ändert sich im Verlauf der Aufnahme. Zusammengenommen verspricht dies eine höhere Genauigkeit in der Bestimmung der Geschwindigkeit, als die zuvor angewendete Regression durch zwei Punkte. In der repräsentativen Darstellung (Abb. 13, Graph) kann man den zeitlichen Verlauf einer Wundheilung von SNB19-Zellen erkennen.

4.1.4 Anwendung des automatischen Algorithmus zur Untersuchung des Einflusses von PI3K-/mTOR- und Hsp90-Inhibition auf die Migration von DK-MG- und SNB19-Zellen im Wundheilungsassay

Mit Hilfe der neuentwickelten automatischen Auswertung des Wundheilungsassays wurden DK-MG- und SNB19-Zellen unter PI3K/mTOR oder/und Hsp90 Inhibition auf ihre Wundschlussrate untersucht. Die in Abb. 14 gezeigten Aufnahmen und die zugehörige Auswertung wurde manuell von Dmitri Sisario [12] durchgeführt.

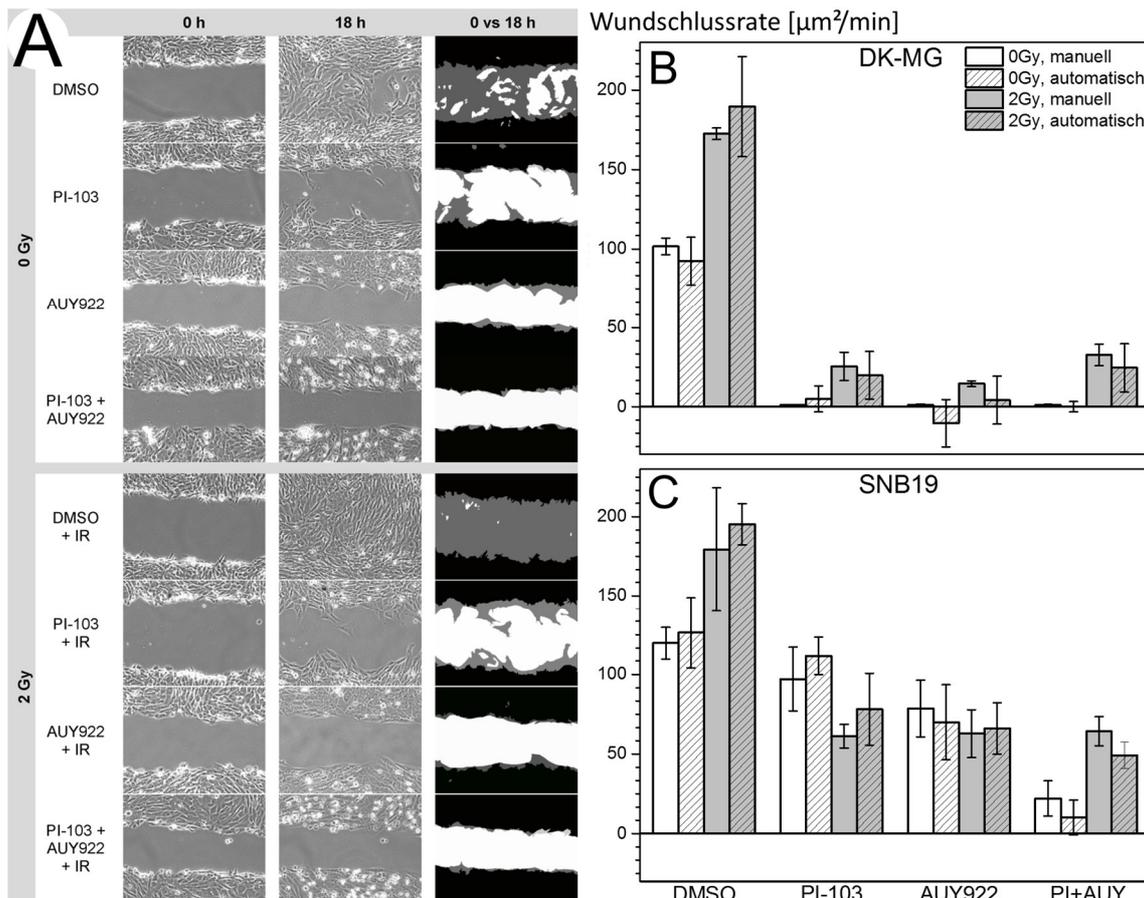


Abbildung 14: Effekte der PI3K/mTOR- und Hsp90-Inhibition auf die Migration von bestrahlten (2 Gy) und unbestrahlten DK-MG- und SNB19-Zellen im manuell und automatisch ausgewertetem Wundheilungsassay
 Panel A zeigt repräsentative Phasenkontrastbilder von DK-MG-Zellen in der linken, bei 0 h und mittleren Spalte bei 18 h nach applizieren der Wunde im einschichtigen Zellrasen. Die rechte Spalte zeigt zusätzlich eine Montage in der die gemessene Zellfläche bei 0 h in Schwarz, bei 18 h in Grau und die zellfreie Wunde in Weiß dargestellt ist. Die Balkendiagramme in B für DK-MG-Zellen und C für SNB19-Zellen fassen den Einfluss der Inhibitorenbehandlung auf die Wundschlussrate ($\mu\text{m}^2/\text{min}$) zusammen. Die weißen Balken repräsentieren die unbestrahlten und die grauen Balken die 2 Gy bestrahlten Proben als arithmetisches Mittel \pm SE von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Videos.

[12]; Memmel et al., Oncotarget 8 (2017) 45298–45310 Figure 2 [CC BY 3.0]

Wie in Abb. 14 zusammengefasst, kam es bei Zugabe der Inhibitoren zu einer Verringerung der Geschwindigkeit des Wundschlusses im Vergleich zur Kontrolle. Abb. 14A zeigt repräsentative Videoausschnitte (0 h und 18 h) mit DK-MG-Zellen. Die Montagen (0 vs. 18h), entstanden durch manuelle Auswertung des Wundheilungsassays, zeigen den Spaltschluss der Kontrollversuche der DK-MG- und SNB19-Zellen nach 18 h. Bei den PI-103, AUY-922 und kombiniert behandelten DK-MG- und SNB19-Zellen fand nach 18 h kein Spaltschluss statt.

In Abb. 14B ist die statistische Auswertung der DK-MG-Zellen, manuell (m) und automatisch (a) ausgewertet, dargestellt. Der Spaltschluss kam bei DK-MG-Zellen unter PI-103-, AUY922- und der AUY+PI-103-Behandlung nahezu zum Erliegen. Verglichen zur Kontrolle nahm die Spaltschlussrate (AUY+PI) in den unbestrahlten Proben um das 100-Fache, von (m) $101 \pm 5,2 \mu\text{m}^2/\text{min}$ und (a) $92,3 \pm 15,0 \mu\text{m}^2/\text{min}$ auf (m) $1 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{min}$ und (a) $0,01 \pm 3,2 \mu\text{m}^2/\text{min}$, ab. Die AUY922-Behandlung der DK-MG-Zellen reduzierte die Spaltschlussrate auf (m) $1 \pm 0,8 \mu\text{m}^2/\text{min}$, (a) $10,4 \pm 14,9 \mu\text{m}^2/\text{min}$ und die PI-103 Behandlung der Zellen auf (m) $1 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{min}$, (a) $4,9 \pm 8,3 \mu\text{m}^2/\text{min}$

Nach der Bestrahlung kam es hingegen bei DK-MG-Zellen in allen Versuchen zu einem Anstieg der Spaltschlussrate. Zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Kontrollen (DMSO) beschleunigte sich der Spaltschluss auf (m) $172 \pm 3,7 \mu\text{m}^2/\text{min}$ und (a) $189,6 \pm 31,5 \mu\text{m}^2/\text{min}$. Die Behandlung mit den Inhibitoren hatte hier, verglichen mit den unbestrahlten DK-MG-Zellen, nicht die vorher sichtbare, totale Unterdrückung des Spaltschlusses zur Folge. Die Spaltschlussrate ist bestrahlt mit PI-103 (m) $25 \pm 8,9 \mu\text{m}^2/\text{min}$, (a) $19,8 \pm 15,1 \mu\text{m}^2/\text{min}$, AUY922 (m) $15 \pm 1,8 \mu\text{m}^2/\text{min}$, (a) $4,1 \pm 15,1 \mu\text{m}^2/\text{min}$ und der Kombination AUY+PI (m) $33 \pm 6,8 \mu\text{m}^2/\text{min}$, (a) $24,5 \pm 15,2 \mu\text{m}^2/\text{min}$ signifikant schneller als die unbestrahlten Proben ($p < 0,005$).

Dagegen zeigen sich SNB19-Zellen sehr viel weniger empfänglich für die Inhibitorbehandlung bezüglich der Unterdrückung der Spaltschlussraten. In den unbestrahlten Proben kam es in der PI-103-Behandlung zu einer Abnahme von (m) $120 \pm 9,9 \mu\text{m}^2/\text{min}$ (a) $126,3 \pm 22,3 \mu\text{m}^2/\text{min}$ um $\sim 19\%$ auf (m) $97 \pm 20 \mu\text{m}^2/\text{min}$, (a) $111,7 \pm 11,9 \mu\text{m}^2/\text{min}$. Bei AUY922-Behandlung reduzierte sie sich um 34% auf (m) $78 \pm 17,8 \mu\text{m}^2/\text{min}$, (a) $69,9 \pm 23,6 \mu\text{m}^2/\text{min}$ und bei der Kombination von AUY922 und PI-103 um 82% auf (m) $22 \pm 11,1 \mu\text{m}^2/\text{min}$, (a) $10,1 \pm 11,0 \mu\text{m}^2/\text{min}$. Verglichen mit 100-Fachen Abnahme der Spaltschlussrate bei DK-MG ist dieser Effekt bedeutend geringer. Bestrahlung mit 2 Gy beschleunigte auch hier die Spaltschlussrate in der Kontrolle um $\sim 50\%$ auf (m) $179 \pm 39,2 \mu\text{m}^2/\text{min}$, (a) $195,2 \pm 13,0 \mu\text{m}^2/\text{min}$. Nach Bestrahlung verlangsamte sich die Spaltschlussrate um $\sim 65\%$, verglichen mit der bestrahlten Kontrolle, in allen Inhibitor kombinationen. PI-103-Behandlung mit Bestrahlung führte bei den SNB19-Zellen zu einer signifikanten Reduzierung der Spaltschlussgeschwindigkeit auf (m) $61,2 \pm 7,39 \mu\text{m}^2/\text{min}$, (a) $78,1 \pm 22,6 \mu\text{m}^2/\text{min}$ verglichen mit den unbestrahlten PI-103 behandelten Zellen. Die Bestrahlung der AUY922 behandelten SNB19-Zellen hatte mit (m) $62,8 \pm 15,0 \mu\text{m}^2/\text{min}$, (a) $66,0 \pm 16,2 \mu\text{m}^2/\text{min}$ keine signifikante Änderung der Spaltschluss-geschwindigkeit,

verglichen zu den unbestrahlten SNB19-Zellen, zur Folge. AUY922 und PI-103 Behandlung führte nach Bestrahlung zu einer Beschleunigung der SNB19-Zellen auf (m) $64,3 \pm 9,2 \mu\text{m}^2/\text{min}$, (a) $49,2 \pm 8,3 \mu\text{m}^2/\text{min}$.

Die Auswertung mit der in dieser Arbeit entwickelten, automatischen Methode korrelierte gut mit der manuellen Auswertung. In den DK-MG-Zellen ist zu erkennen, dass der Standardfehler in jeder Bedingung verglichen zu der manuellen Auswertung leicht zunahm. Bei den SNB19-Versuchen blieb der Fehler über alle Bedingungen betrachten in etwa gleich, verglichen mit der jeweiligen manuellen Auswertung. Zusammengenommen umfasst die automatische Auswertung hier mit bis zu 9 Videos pro 3 Versuchswiederholungen in etwa die doppelte Datenmenge, welche 3 Wiederholungen mit je 4 Videos umfasst. Die Untersuchung eines Videos und Markierung der Spaltregion im ersten und letzten vermessenen Frame dauert, je nach der Erfahrung und Fähigkeit des Experimentators und Komplexität des Spaltverlaufes, zwischen 15-30 Minuten. Die automatische Methode benötigt für dieselbe Arbeit ca. 2 Minuten und wertet den gesamten Spaltverlauf in allen ~ 100 Frames aus. Dies ermöglicht es wiederum, anhand der ermittelten Daten eine zeitaufgelöste Untersuchung der Wundheilung durchzuführen.

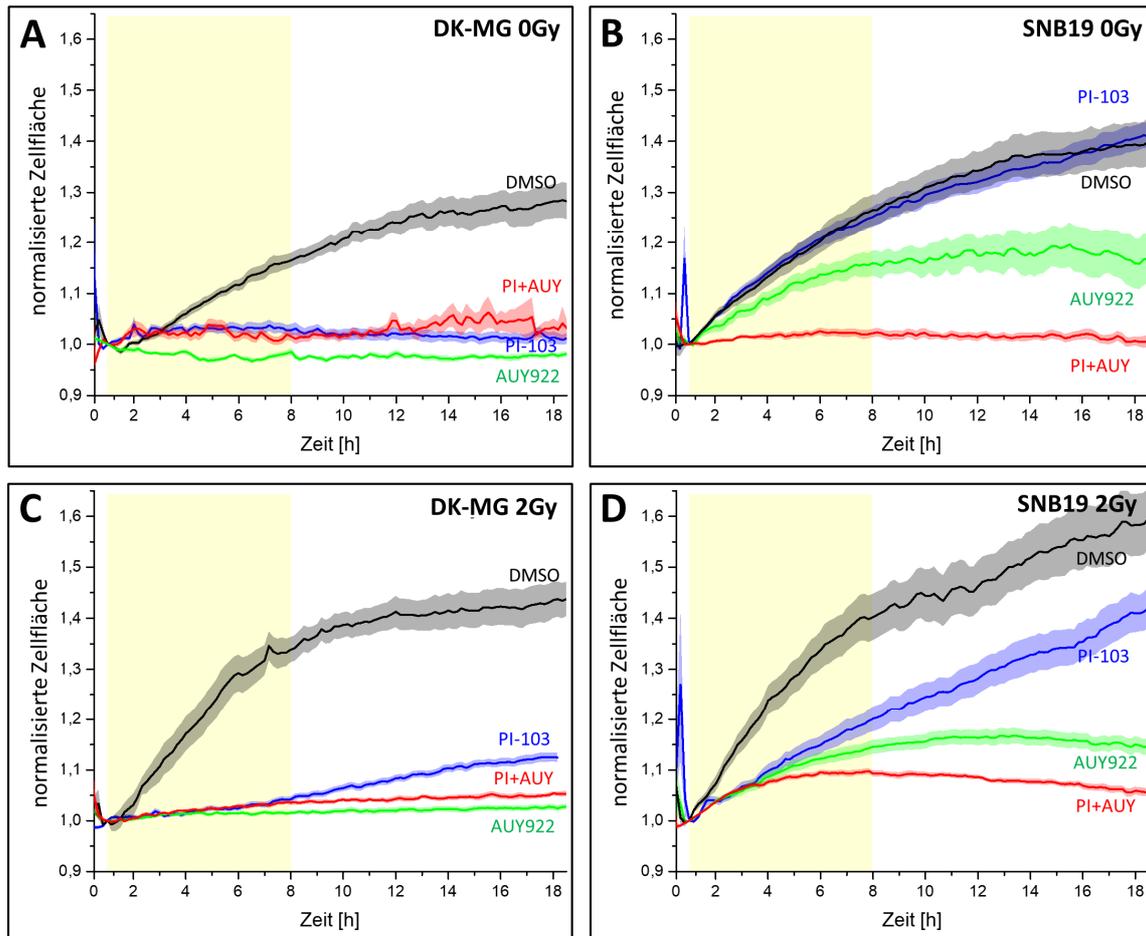


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Wundheilung bei DK-MG- und SNB19-Zellen unter PI3K/mTOR- und Hsp90-Inhibition ermittelt durch die TLA basierte automatische Auswertung

Dargestellt ist der Verlauf der gemittelten und auf den 5. Frame (40. Minute) normalisierten Zellflächen. Gelb hervorgehoben ist der für die Bestimmung der Spaltschlussrate (Abb. 14) verwendete Bereich zwischen 0,6 h und 8 h. Die Steigungen der Graphen entsprechen jeweils den automatisch ermittelten Spaltschlussgeschwindigkeiten. Die gemessene Zellfläche wurde für diese Abbildung auf den jeweils 5. Frame (Minute 40) normalisiert. Teil **A** und **C** zeigen den Verlauf der Zellflächen (\pm SE) bei bestrahlten (2 Gy) und unbestrahlten DK-MG-Zellen und Teil **B** und **D** den entsprechenden Verlauf bei SNB19-Zellen.

Die Graphen in Abb. 15 zeigen die in Abb. 14 verwendeten Daten nach einer automatisierten zeitabhängigen Auswertung. In jeder Bedingung sind im Bereich von 0-0,6 h (ca. 5 Frames) starke Schwankungen in der ermittelten Zellfläche zu erkennen. Diese Schwankungen entstehen aufgrund fehlender (Frame 0) oder ungenauer (Frame 1-4) Abgleichmöglichkeiten für den *a priori* Abgleich. Nach \sim 3-4 Frames, abhängig von der Videoqualität, gleichen sich der gemessene Zustand und die *a priori* Vorhersage an und erlauben somit eine akkurate Erkennung. Aus diesem Grund wurde zur automatischen Bestimmung der Geschwindigkeit erst ab dem 5. Frame gemessen.

Abb. 15A stellt den Verlauf des Spaltzuwachses von unbestrahlten (0 Gy) DK-MG-Zellen dar. Die Steigung des Graphen im gelb hervorgehobenen Bereich entspricht jeweils den in Abb. 15 bestimmten Spaltschlussrate. Die mit PI-103, AU922 oder der Kombination

behandelten Bedingungen schwanken hier jeweils um den normalisierten Startwert (1,0). Dies kommt der vollständigen Unterdrückung des Spaltschlusses in Abb. 14 gleich. Die Kontrolle zeigt hier im vermessenen Bereich lineares Verhalten und flacht nach 8 h merklich ab. Unter Begutachtung der original Videos (Daten nicht gezeigt) und der in Abb. 14A gezeigten Videoausschnitte, ist dieser Effekt auf den Kontakt der Migrationsfronten in einem Großteil der Videos zurückzuführen. Sobald sich die Migrationsfronten berühren und der Spalt geschlossen ist geht die gemessene Wundschlussrate auf nahezu $0 \mu\text{m}^2/\text{min}$ zurück. Dies drückt folglich die gemittelte Wundschlussrate der entsprechenden Bedingung, weshalb es hier nach 8 h zum Abflachen der Kontrollen kommt. Aus diesem Grund wurde der für die Ermittlung der Spaltschlussrate verwendete Bereich bis auf maximal 8 h angelegt (in Abb. 15 gelb hervorgehoben). DK-MG-Zellen der 2 Gy DMSO Kontrolle (Abb. 15C) weisen den gleichen abflachenden Effekt auf, wohingegen der Graph im 0,6-8 h-Bereich eindeutig stärker zunimmt. Die stärkere Steigung stimmt wiederum mit der ermittelten Statistik aus Abb. 15B zwischen 0 und 2 Gy, sowohl manuell als auch automatisch, überein. Zusätzlich entsprechen die Steigungen der Inhibitor behandelten Proben (0 und 2 Gy) ebenfalls den Verhältnissen der ermittelten Spaltschlussraten und verhalten sich entgegen der Kontrollen über den gesamten 18 h-Bereich linear. Erklärt wird dies durch die entsprechenden Videos und repräsentativen Phasenkontrastbilder und Merges aus Abb. 14A. Hier ist zu sehen, dass die Spaltgrenzen im Gegensatz zu den Kontrollen aufgrund der stark inhibierten Wundschlussrate über die gesamten gemessenen 18 h Bereich nicht in Kontakt kommen. Somit tritt der bei den Kontrollen auftretende, in der Statistik die Spaltschlussrate verlangsamende Effekt (Abb. 15) bei den Inhibitor behandelten Proben nicht auf.

SNB19-Zellen zeigen unbestrahlt ebenfalls eine annähernd lineare Zellflächenzunahme (Abb. 15A). Die Steigung der Graphen entspricht auch hier den zuvor manuell bestimmten und später automatisch bestätigten (Abb. 14C) Spaltschlussgeschwindigkeiten. Die Steigung zwischen den unbehandelten und den mit PI-103-behandelten Zellen ist hier nahezu identisch. Auch in der Statistik der automatischen Auswertung aus Abb. 14C zeigt sich zwischen der Kontrolle und PI-103 kein signifikanter Effekt. AUY922 Behandlung führte bei SNB19-Zellen hingegen zu einer Sättigung der Flächenzunahme bei ~ 8 h. Dieses Ergebnis ist mit 2 Gy Bestrahlung sowohl bei der alleinigen AUY922 Behandlung als auch der Kombination aus AUY922 und PI-103 zu sehen. Wie in Abb. 14A dargestellt ist, sind hier die Migrationsfronten jedoch nicht in Kontakt. Dies bedeutet, dass es sich hier nicht um den beschriebenen Effekt, ausgelöst durch in Berührung kommende Zellfronten, handelt. Vielmehr geht dieser Effekt aus einem zeitabhängigen Einfluss der Inhibitoren hervor. Unter Begutachtung der Phasenkontrastbilder und Merges aus Abb. 14A in Kombination mit den aufgenommen Videos wird schnell ersichtlich, dass es bei Zugaben von AUY922 in den zeitlich späteren Aufnahmen (z.B. Abb. 14A, 18h), zu vermehrten Zellsterben kommt. Dies lässt sich in den Phasenkontrastaufnahmen an der zunehmenden Anzahl von sich ablösenden, abgerundeten und als weiße Flecken zu erkennenden Zellen festmachen. In den zugehörigen Videos (Daten nicht

gezeigt) ist zudem klar zu erkennen, dass es sich hier in der Mehrzahl nicht um mitotische Zellen handelt, welche in Phasenkontrastbildern ein ähnliches Erscheinungsbild aufweisen würden. Trotz dieses Effektes verhalten sich die Steigungen im Zeitraum zwischen 0,6 h und 8 h auch bei den SNB19-Zellen proportional zu den in Abb. 14B bestimmten Spaltschlussraten.

4.1.5 Effekte von PI3K/mTOR und Hsp90 Inhibierung auf das F-Aktin-Zytoskelett und die FAK-Verteilung der Zellen

Die Bewegung von Zellen ist ein komplexer Prozess welcher sich in verschiedene Typen unterteilt, die wiederum auf viele verschiedene Proteinkomplexe angewiesen sind. Einzelne Zellen bewegen sich je nach Substrat und Ursprung in mesenchymal, amöboid pseudopodal/filopodale oder amoeboid-blebbigen Typus [84]. In der für die Migration von Glioblastomzellen charakteristischen Bewegung, spielt vor allem der mesenchymale Bewegungsmodus eine Rolle [84].

Bei der mesenchymalen Bewegung baut sich die Kraftgewinnung primär auf die schnelle und koordinierte Wandlungsfähigkeit des F-Aktin-Zytoskelettes, dem F-Aktin-Myosin getriebenen retrograden Flusses und dem Aktintreadmilling im Lamellipodium und der Verankerung durch fokale Adhäsionen (FA) zur extrazellulären Matrix (EZM) auf [87,126]. In der 2D-Bewegung entwickeln die Zellen hierfür ein breites Lamellipodium in der Lauffront. Um die in dieser Arbeit gezeigten Unterschiede des Migrationsverhaltens von DK-MG- und SNB19-Zellen in Kombination mit PI3K/mTOR- und Hsp90-Inhibierung besser zu verstehen, wurden deshalb im Folgenden die Einflüsse auf die Struktur des F-Aktinskelettes und der Verteilung von FAK genauer untersucht. Hierfür wurden Immunfluoreszenzaufnahmen mit Hilfe von konfokaler Laserscanningmikroskopie (cLSM) und hochauflösender *d*STORM, zur Aufnahme der F-Aktinstruktur und FAK(Tyr397) von ganzen Zellen (cLSM) und deren Migrationsfronten (*d*STORM) angefertigt.

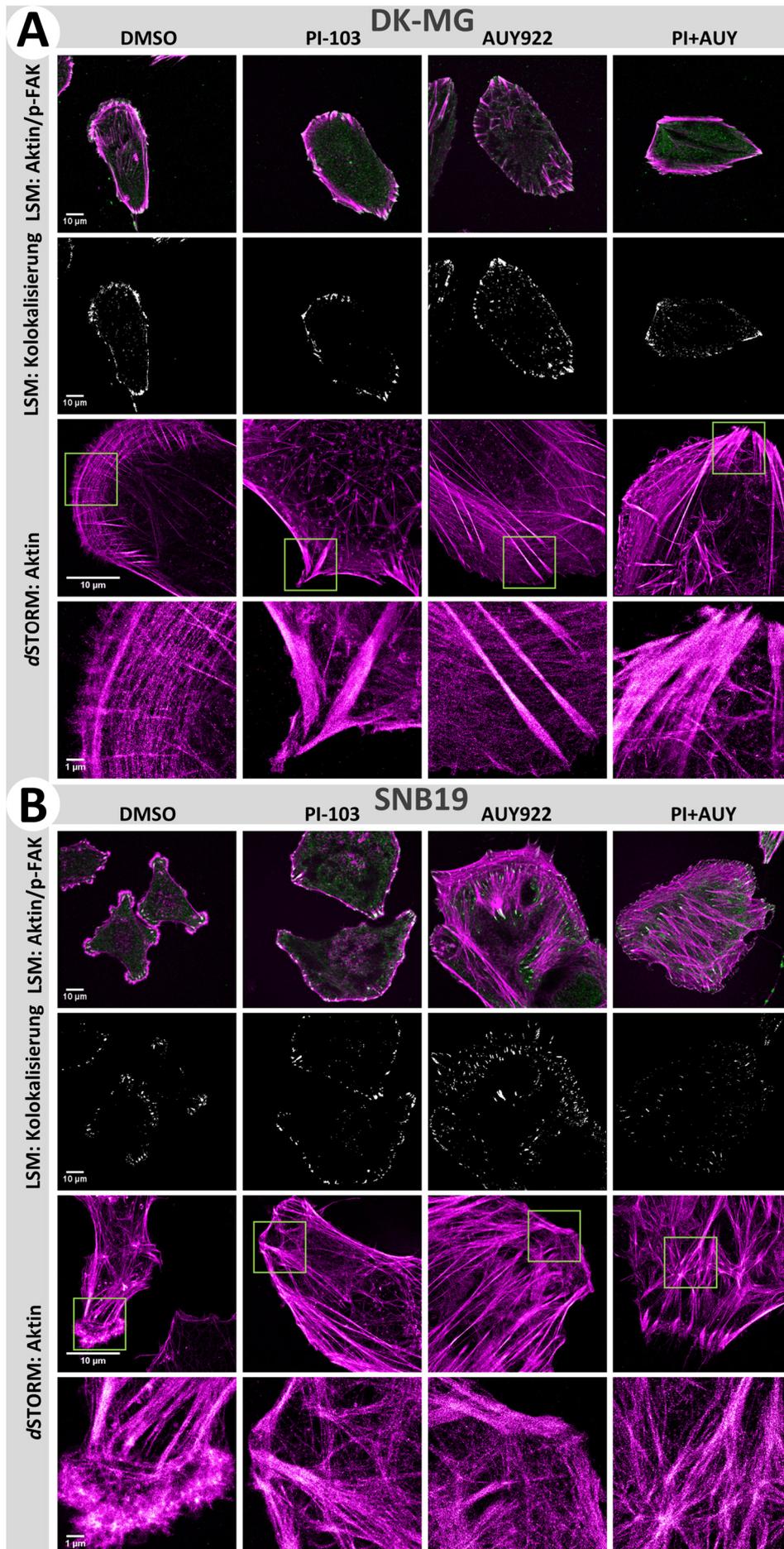


Abbildung 16: Effekte von PI-103 und AUY922 auf die F-Aktinstruktur und p-FAK-Verteilung in DK-MG- und SNB19-Zellen

Panel **A** zeigt jeweils Aufnahmen von DK-MG- und Panel **B** von SNB19-Zellen. Die Bilder wurden konfokal (cLSM, oberen zwei Reihen des Panels) oder hochaufgelöst (*d*STORM, unteren zwei Reihen des Panels) aufgenommen. Um die F-Aktin und pFAK-Struktur darzustellen wurden die Aufnahmen jeweils nahe der basalen Membran durchgeführt. Die Einlagen in der jeweils obersten Reihe zeigen Farbmerges von F-Aktin (magenta) und pFAK (grün). Die zweite Reihe zeigt das binäre Ergebnis der Kolo-kalisation von F-Aktin und pFAK. Weiß entspricht positiver Kolo-kalisation und schwarz einem Bereich ohne Kolo-kalisation. In der dritten Reihe sind Ausschnitte des F-Aktinzytoskelettes der entsprechenden Zellen hochaufgelöst dargestellt. Die hellgrünen Vierecke entsprechen den vergrößerten Bildern in der letzten Reihe.

[12]; Memmel et al., *Oncotarget* 8 (2017) 45298–45310 Figure 3 [CC BY 3.0]

Die oberen zwei Reihen von Abb. 16 stellen jeweils die cLSM-Aufnahmen von F-Aktin magenta, FAK grün und Kolo-kalisationen von FAK und F-Aktin weiß dar. Wie in Abb. 16A zu sehen ist, weisen DK-MG-Kontrollzellen (linke Spalte) eine front- und rückwärtig polarisierte Morphologie auf. In der Lauffront ist die, für ein Lamellipodium mit Aktintreadmilling typische und im Schema in Abb. 3 gezeigte, F-Aktinstruktur sowohl in den konfokalen als auch hochaufgelösten Aufnahmen zu erkennen [76]. In den konfokalen Aufnahmen sind die dorsalen Stressfasern, welche jeweils mit einer FAK/F-Aktin kolo-kalisierenden Region beginnen, und die querverlaufenden Bögen des Lamellipodiums gut zu erkennen. Die Überlagerung von FAK und F-Aktin und die damit einhergehende Kolo-kalisation sind Indikatoren für die Anwesenheit einer fokalen Adhäsion (Abb. 16A, B, zweite Reihen). Die hochaufgelösten Aufnahmen zeigen zudem die feine Struktur der querverlaufenden Bögen, welche aus vielen (>20) sehr feinen F-Aktinfasern bestehen. Nach hinten werden die Zellen schmaler und enden mit einer Reihe von gut definierten FA's. Im Zentrum der Zelle sind feine ventrale Stressfasern zu erkennen, welche sich entlang der Zellpolarität ausrichten und jeweils vorne und hinten eine FA besitzen.

SNB19-Kontrollzellen weisen (Abb. 16B – linke Spalte) eine völlig unterschiedliche F-Aktinstrukturierung auf. Wie schon in den Phasenkontrastvideos (Abb. 9 und Abb. 10) zu erkennen war, besitzen SNB19-Zellen mehrere Lauffronten und weisen daher eine multipolare Struktur auf. Die konfokalen und insbesondere die hochaufgelösten *d*STORM Aufnahmen verdeutlichen zudem das Fehlen der für ein Lamellipodium mit Aktintreadmilling typischen F-Aktinstruktur. SNB19-Zellen zeichnen sich mit einer diffusen, selbst mit den hochaufgelösten *d*STORM Aufnahmen nicht differenzierbaren, F-Aktinwolke direkt an der Lauffront aus. In der Kolo-kalisation sind zudem, unmittelbar hinter dieser F-Aktinwolke gut definierte FA's zu erkennen. Diese FA's bilden wie bei den DK-MG-Zellen die Spitze einiger Stressfasern aus. Grundsätzlich ähneln sie den dorsalen Stressfasern des Lamellipodienmodells (Abb. 3). Die äußeren Stressfasern jedes Lamellipodiums verbinden zudem zum Großteil die jeweils benachbarten Lamellipodia der Zelle. Sie verlaufen hierbei gebogen direkt entlang der sichtbaren Zellkante und enden dort ebenfalls mit einer FA. Entgegen den DK-MG-Zellen, besitzen die SNB19-Zellen mit ihrer multipolaren Struktur keine definierbare rückseitige

Struktur. In den konfokalen Aufnahmen sind im Zentrum der SNB19-Zellen keine und in den *d*STORM Aufnahmen nur vereinzelte und sehr feine F-Aktin-Stressfasern sichtbar.

Unabhängig von den verwendeten Inhibitoren ist die auffälligste Änderung der DK-MG-Zellen unter Inhibitorbehandlung das Fehlen der polarisierten Zellstruktur. Sie bilden folglich nicht die für ein Lamellipodia mit Aktintreadmilling typische F-Aktinstruktur aus querverlaufenden Bögen und dorsalen Stressfasern aus. Dies führt zudem zu einer grundlegenden Veränderung der FA-Verteilung. Nach PI-103 Behandlung weisen die Zellen, sowohl bei cLSM als auch *d*STORM Aufnahmen, markante Stressfasern in der Peripherie der Zelle auf. Diese beginnen, wie in Abb. 16 in der F-Aktin/pFAK Kolo-kalisierung zu sehen, mit großen gut definierten FA's. Der zentrale Bereich weist in den cLSM Aufnahmen keine ventralen Stressfasern auf. In der Hochauflösung werden jedoch kleine und zufällig orientierte Stressfasern nahe der Basalmembran, mit einem Durchmesser von ca. 70-200 nm sichtbar. Unter AUY922-Behandlung weisen DK-MG-Zellen markante, radial verlaufende Stressfasern auf welche ins Zentrum der Zelle ausgerichtet sind. Auch diese F-Aktin-Stressfasern enden in der Zellperipherie in einer FA.

Obwohl PI-103 nahezu keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der SNB19-Zellen in der Einzelzellverfolgung hatte und nur eine mäßige Inhibierung in den Wundheilungsversuchen zeigte, führte es zu einer markanten Umstrukturierung des F-Aktinskelettes. Wie in Abb. 16B dargestellt, verloren die Zellen ihre Multipolarität aus vielen kleinen Lamellipodia. Tatsächlich scheinen diese zu einem großen Lamellipodium verschmolzen zu sein. Des Weiteren ist in den Lamellipodien die in der DMSO Kontrolle sichtbare, F-Aktinwolke verschwunden. Die Migrationsfront der Zellen besitzt zudem reichlich FA, wohingegen die Rückseiten der Zellen nahezu keine FA besitzen. Die Behandlung mit AUY922 führte bei den SNB19-Zellen, zusammen mit der stark inhibierten Migration, sowohl in der Einzelzellverfolgung als auch im Wundheilungsassay, zu einer markanten Änderung der Zellmorphologie und des F-Aktinskelettes. Mit der Ausbildung von einem Netzwerk aus vielen und stark ausgeprägten Stressfasern im gesamten Zellkörper sind auch die flankierenden FA's entsprechend groß und stark ausgeprägt. Zusätzlich ist eine Zunahme der sichtbaren Zellfläche um knapp das Zweifache zu erkennen. Eine Bestrahlung der Zellen mit 2 Gy führte hingegen in beiden Zelllinien zu keiner signifikanten Veränderung der Struktur des F-Aktinskelettes oder der FA Verteilung, verglichen mit den entsprechenden unbestrahlten Proben.

4.2 Untersuchung der Nanometer-Struktur und der zeitlichen Dynamik der DNA-Reparaturfoci

Neben der Untersuchung des Einflusses der ionisierenden Strahlung und gezielter PI3K/mTOR und Hsp90 Inhibierung auf die Bewegung der GBM Zellen, soll nun im nächsten Teil dieser Arbeit die DNA-DSB-Reparaturmechanismen anhand drei ausgewählter Proteine genauer analysiert werden. Die hocheffektiven DNA-Reparaturmechanismen bei Tumorzellen lassen sich unter dem charakteristischen Merkmal der Apoptoseresistenz (Abb. 1) zusammenfassen. Tumorzellen sind aufgrund des hohen replikativen Stresses, als Folge ihrer erhöhten Teilungsrates, anfällig für DNA-Schäden, weshalb die hochgefahrenen DNA-Reparaturmechanismen nötig sind um die Zellen vor dem Zelltod zu bewahren [127]. Der Behandlung von Patienten mittels Radiotherapie wirkt diese charakteristische Eigenschaft der Apoptoseresistenz von Krebszellen allerdings entgegen. Die hier untersuchten Proteine γ H2AX und DNA-PK nehmen eine zentrale Rolle in der Prozessierung der DNA-DSB ein. Diese drei Proteine sollen im Folgenden sowohl quantitativ in konfokalen Mikroskopieaufnahmen wie auch qualitativ mit Hilfe der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopiemethode *d*STORM untersucht werden.

4.2.1 *Quantitative Untersuchung von γ H2AX-Foci mit automatisierten Methoden*

Für die quantitative Analyse der DSBs in 3D-cLSM-Bildstapeln sollte ein ImageJ basiertes Plugin entwickelt werden. Es sollte somit das postulierten 1:1 Verhältnisses der γ H2AX-Foci zu den jeweiligen Brüchen [55] ausgenutzt werden, um Rückschlüsse auf die Kinetik der DNA-DSB-Reparatur zu schließen.

Softwareumgebungen oder ganze Mikroskopiesysteme für die 2D-Auswertung von γ H2AX sind bereits weit verbreitet und in Gebrauch [40,97–100,102–104]. 2D-Systeme haben allerdings den Nachteil, dass ihre Genauigkeit stark von der Position des Zellkerns in den Aufnahmen abhängig ist. Schematisch ist dies als Z-Schnitt in Abb. 17 dargestellt. Die Nukleusmidsektion (grün) des vollständig dargestellten Nukleus enthält hier 9 Foci während die Nebensektionen (orange), aufgrund der annähernd runden Form des Nukleus eine kleinere Kugelkalotte abbilden und deshalb nur jeweils 5 Foci enthalten. Wird der Focigehalt des Querschnittes auf die gesamte Fläche (X, Y) der Sektion des Nukleus extrapoliert ergeben sich somit für dieses Beispiel in der Nukleusmidsektionsfläche ~ 63 Foci und in einer der Nebensektionsfläche ~ 20 Foci. Dieser Effekt erzeugt in diesem extremen Beispiel einen Fehler von $\sim 80\%$ zwischen Midsektion und Nebensektion für die ermittelten Foci pro Zelle in 2D-Aufnahmen.

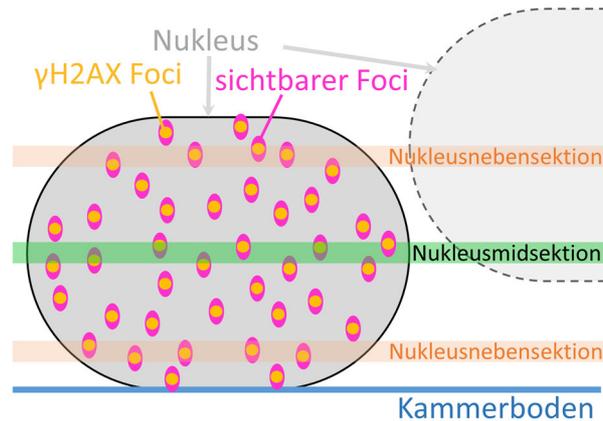


Abbildung 17: Schematische Darstellung einer Nucleusaufnahme mit gefärbtem γ H2AX

Der Nucleus einer Zelle ist grau mit den tatsächlichen γ H2AX-Foci gelb und den in 3D-cLSM-Aufnahmen rekonstruierten Foci magenta dargestellt. Der grüne Querschnitt zeigt die Midsektion des Nucleus an und die braunen Querschnitte dessen Nebensektionen. Der Kammerboden des Kammerglides ist blau dargestellt. Ein zweiter Nucleus, welcher etwas oberhalb des Kammerbodens liegt und sich somit nicht die Nucleusmidsektion teilt, ist am oberen rechten Rand des Bildes in blassgrau und mit gestricheltem Rand dargestellt.

Selbst bei korrekt erkannter und aufgenommener Midsektion eines Nucleus in einem 2D-Bild, kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle weiteren Nuclei desselben Bildes ebenfalls in der Midsektion aufgenommen wurden. Dieser Effekt ist in Abb. 17 zwischen dem auf dem Kammerboden liegenden Nucleus (durchgezogener Rand) und dem axial höher liegenden Nucleus dargestellt. Dies zeigt wie sich die Midsektion eines Nucleus in der gleichen Aufnahme in der Nebensektion eines anderen Nucleus befinden kann. Des Weiteren besitzen Nuclei häufig unterschiedliche axiale Durchmesser, was ebenfalls zu Unterschieden in der Nucleusmidsektionshöhe zwischen zwei unterschiedlich großen Nuclei führt. Wie bereits dargelegt ist die Auswertung in der Midsektion aller Nuclei allerdings die Voraussetzung für eine akkurate fehlerfreie Foci-Zählung.

Ein weiteres Problem in der Vergleichbarkeit 2D-Fociauszählungen ergibt sich aus Unterschieden in der angewendeten Mikroskopie-Technik. 2D- γ H2AX-Foci-Messungen sind von der Dicke der Fokusebene abhängig, welche von der angewendeten Mikroskopie-Technik bestimmt wird. Je schlechter die axiale Auflösung (in Z) desto dicker wird die im finalen Bild dargestellte Midsektion und desto mehr Foci werden schlussendlich abgebildet. Für konfokale Mikroskope liegt die Z-Auflösung bei unter 500 nm, wohingegen Weitfeldmikroskope in der Regel eine axiale Auflösung von $\sim 1 \mu\text{m}$ besitzen [128]. Die angewandten Algorithmen sind allerdings nicht in der Lage aus den Signalinformationen im Bild die genaue Z-Position zu ermitteln, weshalb folglich alle im Bild dargestellten Foci potentiell in die Auswertung mit einfließen. Um diesen Effekt zu minimieren besitzen viele Algorithmen willkürlich wählbare globale Signal-Schwellenwerte mit deren Hilfe schwach leuchtende Foci und unspezifisches Signal ausgefiltert werden [40,97–99]. Schwach leuchtende, sehr kleine Foci sind in der Regel durch die aufgenommene Fokusebene nur angeschnitten worden, daher ist es strittig ob und ab

wann sie ausgezählt werden sollten. Die optimale Einstellung dieser Schwellenwerte ist allgemein von vielen Faktoren abhängig, wie z.B. der Helligkeit des verwendeten Farbstoffes, dem Grad der Markierung von Antikörper zu Epitop und dem Grad der Markierung von Farbstoff zu Antikörper. Aus diesen Gründen kann sich der vom Experimentator gewählte Schwellenwert zwischen verschiedenen Experimentatoren stark unterscheiden und zu einer weiteren Verzerrungen der Ergebnisse führen [129].

Für die Separation von überlappenden Nuklei und Foci, bauen 2D begrenzte Methoden in der Regel auf unterschiedliche Wasserscheidentransformationsalgorithmen (WST) auf [40,97–99]. WST im Allgemeinen wandeln Grauwertbilder in topographische Informationen um, in denen der Grauwert als Höheninformation definiert wird (dunkle Bereiche sind hoch und helle Bereiche tief dargestellt, siehe Abb. 18). Im Anschluss werden die entstehenden Täler ausgehend von verschiedenen Startpunkten „geflutet“ bis die Wasserscheiden zwischen zwei Tälern in Berührung kommen und somit die Grenzen zwischen den Tälern aufzeigen. Gängige Methoden um die Startpositionen für die Flutung festzustellen sind typischerweise vorgeflutete- oder Marker basierte WST [130]. Bei der vorgefluteten Methode werden alle Täler mit einer vorgegebenen Mindestgröße als Startpunkt der Flutung angenommen. Dies sortiert zu kleine Täler automatisch aus der Trennung aus. Bei der markerbasierten WST werden benutzerdefinierte Marker als Startpunkt der Flutungen verwendet wodurch die Trennungserkennungen nach benutzerdefinierten Eigenschaften festgelegt werden können. Marker werden in der Regel über verschiedene Maxima-Findungsmethoden wie dem „h-dome Maxima“ ermittelt [129–131]. Das h-dome Maxima ist besonders gut geeignet um kleinere Nebenmaxima aus der Erkennung auszufiltern.

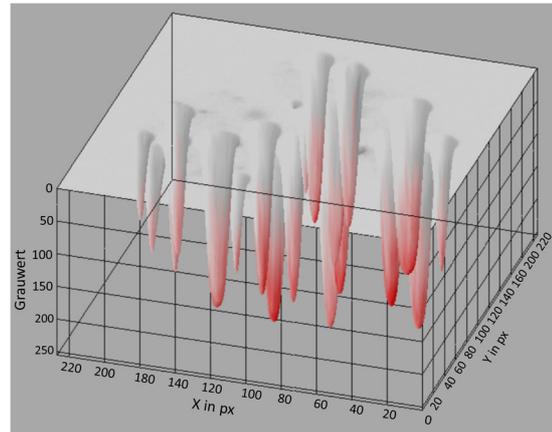


Abbildung 18: Grauwert-Z-Projektion einer rausch-unterdrückten 2D- γ H2AX-Foci-Aufnahme
X- und Y-Achse sind in nm angegeben. Die Z Achse stellt den 8-Bit Grauwert dar bei dem 0 für schwarz steht und 255 für weiß.

Angewendet auf die γ H2AX Foci, welche sich stark in ihrer Z-Position unterscheiden und damit häufig versetzt übereinander vorliegen, kommen diese 2D-WST Methoden allerdings schnell an ihre Grenzen. Wie bereits erwähnt bilden Foci welche nicht vollständig auf der Fokusebene liegen ein schwächeres Signal in der Aufnahme ab. Ein schwächeres Signal in der Aufnahme führt wiederum zu einem flacheren Tal für die WST, verglichen zu den mittig aufgenommenen Foci. Insbesondere 3D versetzt überlappenden Foci benötigen somit einen niedrigeren WST-Schwellenwert für eine separate Markergenerierung, um die überlappenden γ H2AX-Foci als einzelne Entitäten erkennen zu können. Werden die Schwellenwerte allerdings

zu stark gesenkt besteht die Gefahr von Übersegmentierung einzelner Foci [130,132]. Übersegmentierung beschreibt die Fragmentierung einzelner Entitäten aufgrund fälschlicherweise erkannter Nebenmaxima eines einzelnen Objektes, in diesem Fall eines Foci, und die damit verbundene inkorrekte Auftrennung in mehrere Untereinheiten [130]. Es ist daher Nötig für die γ H2AX-Foci Aufnahmen die 2D-WST-Schwellenwerte zwischen zu schwacher Foci-Trennung und Überfragmentierung zu balancieren, um die bestmögliche Zählung zu generieren.

Automatische 3D-Methoden schließen zwei der zuvor genannten Fehlerquellen, genauer die Abhängigkeit der Nukleusmidsektion und der partiell aufgenommenen Foci von 2D-Methoden, nahezu vollständig aus. Es werden ausschließlich ganze Nuklei aufgenommen und analysiert, weshalb deren genaue Position in Z für die abgebildete Signalstärke wie auch die Midsektion des Nukleus irrelevant wird. Die Grenzen der Aufnahme in Z sind frei wählbar und können so angepasst werden, dass sowohl der unterste Zellkern als auch der im aufgenommenen Bereich höchste Zellkern in jeder Aufnahme vollständig dargestellt wird. Automatische Methoden für die 3D- γ H2AX-Analyse mit automatischer Nukleus- und Foci-Separierung sind allerdings noch nicht verfügbar.

4.2.2 Auflösung der dreidimensionalen Struktur der γ H2AX Foci

Zur Vorbereitung der Entwicklung einer automatischen Auszählung der γ H2AX-Foci in 3D war es nötig ihre 3D-Struktur und Verteilung im Nukleus genauer zu Untersuchen. Dies sollte eine Überfragmentierung der 3D-WST ausschließen. Es wurden daher 3D-Rekonstruktionen der γ H2AX Foci mit dem cLSM von DK-MG- und SNB19-Zellen angefertigt. Anhand dieser Aufnahmen sollten mögliche Fehlerquellen identifiziert und die nötigen Parameter zur akkuraten Focierkennung abgeleitet werden.

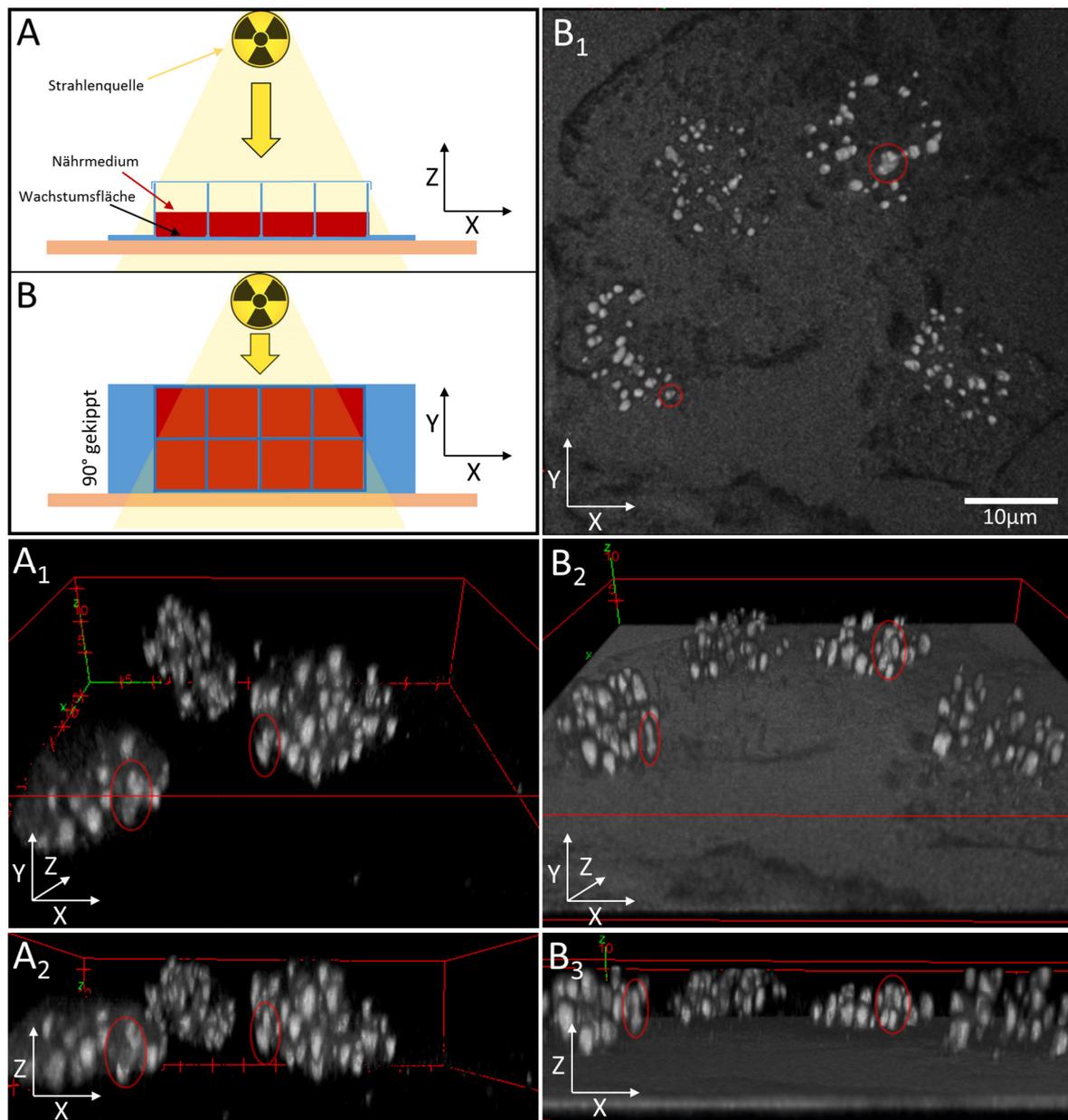


Abbildung 19: 3D-Rekonstruktion von cLSM-Aufnahmen von γ H2AX-Foci in DK-MG-Zellen nach 0° und 90° gekippter Probenkammer

Panel **A** und **B** zeigen den Versuchsaufbau bei der Bestrahlung, einmal mit normal platzierter Kammer (**A**) und einmal mit 90° gekippter Kammer (**B**). Die Achsenzuordnung der Kammer zu den cLSM Rekonstruktionen ist jeweils mit Pfeilen in X, Y, Z angegeben. Die μ -Slide-Kammern sind hellblau dargestellt. Die Wachstumsfläche der Zellen befindet sich basal in der Kammer und ist in Panel **B** entsprechend mit der Kammer ebenfalls um 90° gekippt. Das Nährmedium ist rot dargestellt und der divergierende Strahlenverlauf des Linearbeschleunigers schematisch gelb. Im Aufbau von Panel **B** sind die Kammern vollständig mit Medium gefüllt und entsprechend abgedichtet. Die 3D-Rekonstruktionen **A**₁₋₂ und **B**₁₋₃ der am cLSM aufgenommenen γ H2AX-Immunfluoreszenzaufnahmen sind schrittweise um $\sim 45^\circ$ um die X-Achse gedreht und entsprechen jeweils dem Bestrahlungsaufbau von Panel **A** oder **B**. Rote Kreise markieren in beiden Versuchsaufbauten beispielhaft in Z langgezogene, schlauchförmige γ H2AX Foci.

In Abb. 19A₁₋₂ ist exemplarisch die cLSM-3D-Rekonstruktion von DK-MG-Zellen dargestellt. Die γ H2AX-Foci weisen hier einzelne in Z langgezogene, annähernd ovale Strukturen auf. Ausgehend von dem Auflösungsverhältnisses des cLSM von X/Y zu Z mit im besten Fall ~ 180 nm (X/Y) und 500 nm (Z) [128], stellt sich ein Verhältnis zwischen lateral und axial von ca. 1:2,7 (X/Y:Z) ein. Mit der Annahme von einer annähernd kugelförmigen Verteilung der γ H2AX-Histone um die Bruchstelle, sollten die Foci in der 3D-Rekonstruktion somit etwa um das 2,7-Fache in der axialen Achse (Z), verglichen zu den lateralen Achsen (X/Y), in die Länge gezogen sein. Im Durchschnitt haben die γ H2AX-Foci in der Midsektion einen lateralen Durchmesser zwischen $0,3\sim 1,5$ μm (X/Y) und einen axialen Durchmesser (Z) von $\sim 2\text{-}4,5$ μm . Dies entspricht in etwa dem cLSM bedingtem theoretischem Auflösungsverhältnis zwischen der lateralen (180 nm) und der axialen (500 nm) Ebene um den Faktor 2,7.

Des Weiteren sind in Abb. 19A₁₋₂ beispielhaft vereinzelte schlauchförmige Foci durch einen roten Kreis markiert worden. Diese Foci besitzen im Vergleich zu ihrem lateralen Durchmesser (X/Y) einen um das $\sim 5\text{-}8$ -Fache größeren axialen (Z) Durchmesser. Der axiale Durchmesser betrug hier bis zu $7,8$ μm wohingegen der laterale Durchmesser $\sim 1,5$ μm beibehielt. Um die Abhängigkeit der hier beobachteten schlauchförmigen γ H2AX-Foci von der axial in Z ausgerichteten ionisierenden Strahlung auszuschließen, wurde der Bestrahlungsaufbau so verändert, dass die Bestrahlung parallel zur lateralen Aufnahmeebene stattfand. Dies ist schematisch in Abb. 19B dargestellt. Die Kammern wurden für diesen Versuchsaufbau um 90° zum Bestrahlungskopf gedreht. Durch den divergierenden Strahlenverlauf des Linearbeschleunigers zur Probe ist zu beachten, dass die Strahlendosis bedingt durch den Höhenunterschied der Kammern nicht mehr homogen in der Wachstumsfläche der Probenkammer ankommen kann. Als Folge ist die γ H2AX-Foci-Zählung der gekippten Probenkammern nicht direkt mit den Werten des normalen Aufbaus vergleichbar. Abb. 19B₁₋₃ zeigt die 3D- γ H2AX-Focirekonstruktion mit stufenweiser digitaler Rotation um $\sim 45^\circ$ um die X-Achse der Aufnahme. Die sichtbaren Foci-Dimensionen in der 3D-Rekonstruktion zeigen mit einem lateralen Durchmesser (X/Y) von $0,3\sim 1,5$ μm und einem axialen Durchmesser (Z) von $\sim 2\text{-}4,5$ μm dieselben Maße wie in dem nicht gekippten Versuchsaufbau. Des Weiteren sind mit roten Kreisen wieder schlauchförmige γ H2AX Foci gekennzeichnet, welche das 2,7-Fache Verhältnis der lateralen und axialen Auflösung weit überschreiten. Da die hier gefunden schlauchförmigen Foci immer entlang der axialen Ebene des Mikroskops auftreten ist anzunehmen, dass sie unabhängig von der Bestrahlungsrichtung und somit als Artefakt bedingt durch das lateral zu axiale Auflösungsverhältnis des cLSM zustande kommen.

Es ist allerdings zu beachten, dass durch die Drehung der Probenkammer die Leistungsdichte entlang des Probenkammerbodens mit steigender Höhe (in die Richtung des Bestrahlungskopfes – siehe Abb. 19B) aufgrund des Abstandsgesetzes für eine annähernd punktförmige Strahlenquelle zunimmt [133]. Die Anzahl der Foci in der gekippten Kammer

nimmt folglich mit steigender Leistungsdichte und steigender DSB-Zahl zu. Ein Vergleich der γ H2AX-Focizahl zwischen beiden Versuchsaufbauten ist somit nicht möglich.

4.2.3 FocAn-3D – Etablierung eines neuen Algorithmus für die dreidimensionale γ H2AX Analyse

Für die 3D-Analyse von γ H2AX-Foci wurde in dieser Arbeit ein eigenständiges ImageJ-Plugin mit Namen „FocAn-3D“ entwickelt. Dies sollte unter anderem die Fähigkeit besitzen in γ H2AX-Immunfluoreszenzbildern sowohl Nuklei als auch Foci in 3D zu erkennen, zu separieren und die Anzahl der Foci pro Nukleus zu bestimmen. Durch die Analyse aller Foci in 3D kann die Genauigkeit der Separierung von überlappenden γ H2AX-Foci, durch Verwendung von 3D WST-Algorithmen, im Vergleich zur 2D-Analyse, verbessert werden. Die Verbesserung in der Genauigkeit der 3D-WST im Vergleich zur 2D-WST konnte in der Literatur bereits gezeigt werden [131,132]. So ist es zum Beispiel nicht nur möglich in XY nebeneinanderliegende Foci sondern auch in Z versetzt übereinander liegende Foci, wie sie beispielsweise in Abb. 19 als Focischläuche dargestellt sind, zu trennen.

Zusätzlich wird mit FocAn-3D für die Erkennung und Separierung der einzelnen Nuklei keine separate Färbung des Chromatins mit Interkalatoren oder DNA-bindenden Farbstoffen, wie beispielsweise Hoechst oder DAPI, benötigt. Dies ist beispielsweise in vielen anderen 2D-Softwarepaketen nicht der Fall [40,41,97–100]. Unter anderem ermöglicht dies für die quantitative Analyse der γ H2AX-Foci dieselben Proben wie bei der hochauflösenden Untersuchung mit *d*STORM zu verwenden, ohne einen Einfluss der Nukleusfärbung auf die Nanometerstruktur der DNA zu befürchten. Möglich wird dies durch die in FocAn-3D verwendete graduelle Signalseparation. Hiermit können großflächige unspezifische Signalunterschiede innerhalb einer Immunfluoreszenzaufnahme ausgenutzt werden um den extrazellulären Raum, den Bereich des Zytoplasmas und den Zellkern voneinander zu trennen.

FocAn-3D ist in der Ij1 Makro Programmiersprache geschrieben, frei verfügbar und läuft unter der weit verbreiteten ImageJ 1.X Plattform (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Der Quellcode ist in Appendix 5 angegeben. Der Analyseablauf ist in Abb. 21 schematisch dargestellt und im Folgenden genau beschrieben.

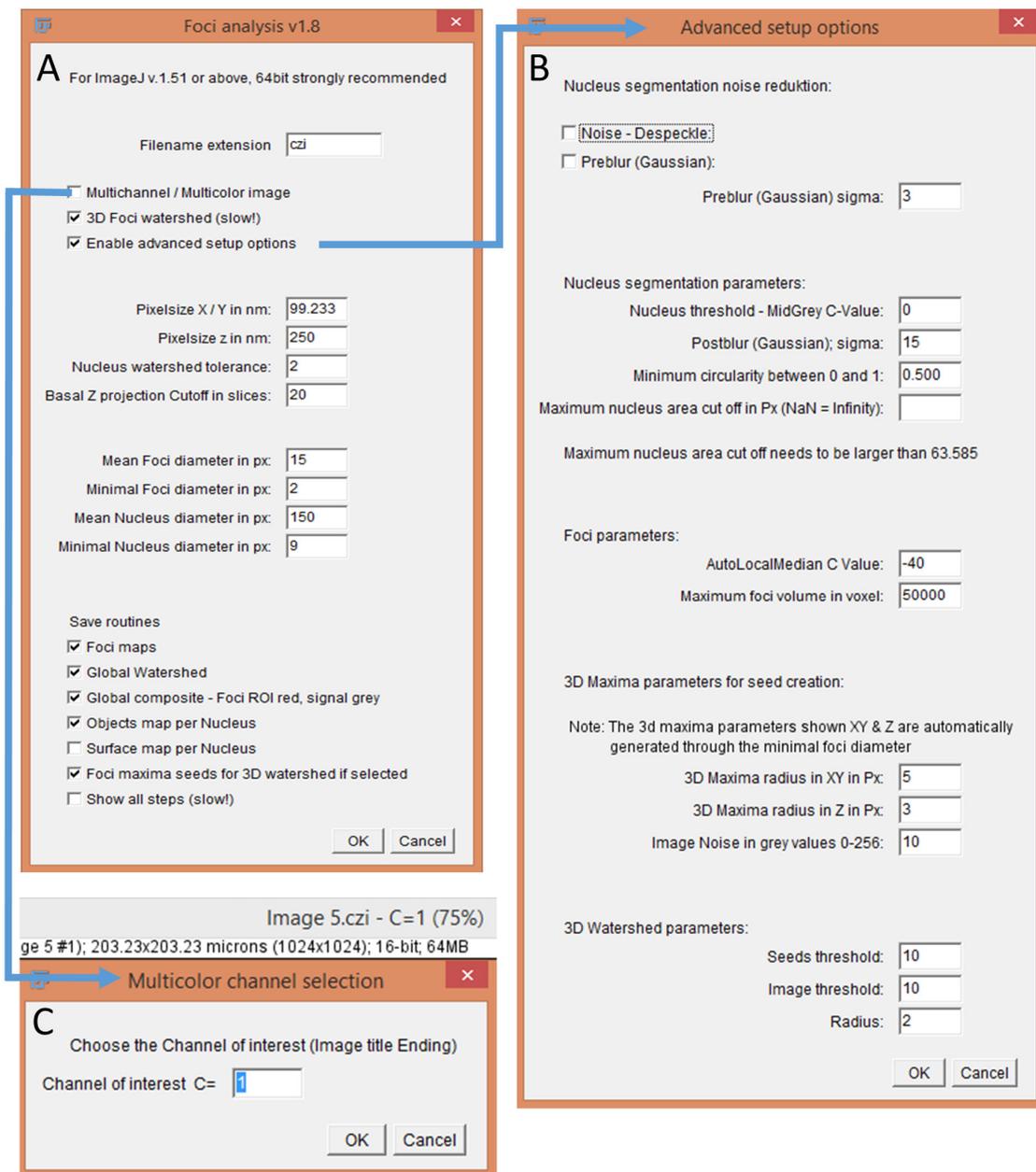


Abbildung 20: FocAn-3D Benutzerinterface

Panel A zeigt die Haupteingabeaufforderung in der, unter anderem, die Pixelsize und Größenparameter für Nuklei und Foci abgefragt werden. Aus diesen in der γ H2AX-Aufnahme messbaren Informationen werden alle nötigen Parameter für die lokalen Schwellenwerte automatisiert errechnet. Des Weiteren können hier die Speicheroptionen ausgewählt werden. Panel B zeigt die fortgeschrittenen Optionen, welche in Panel A aktiviert werden können. In dieser Eingabeaufforderung können spezifische Nukleus- und Foci-Schwellenwerts- und WST-Parameter für die 2D und 3D-WST verändert werden. Panel C fragt den Farbkanal für Multifarbenbildstapel ab und kann ebenfalls in Panel A aktiviert werden.

In Submission, Memmel et al., eingereicht 12.03.2019 BMC Bioinformatics

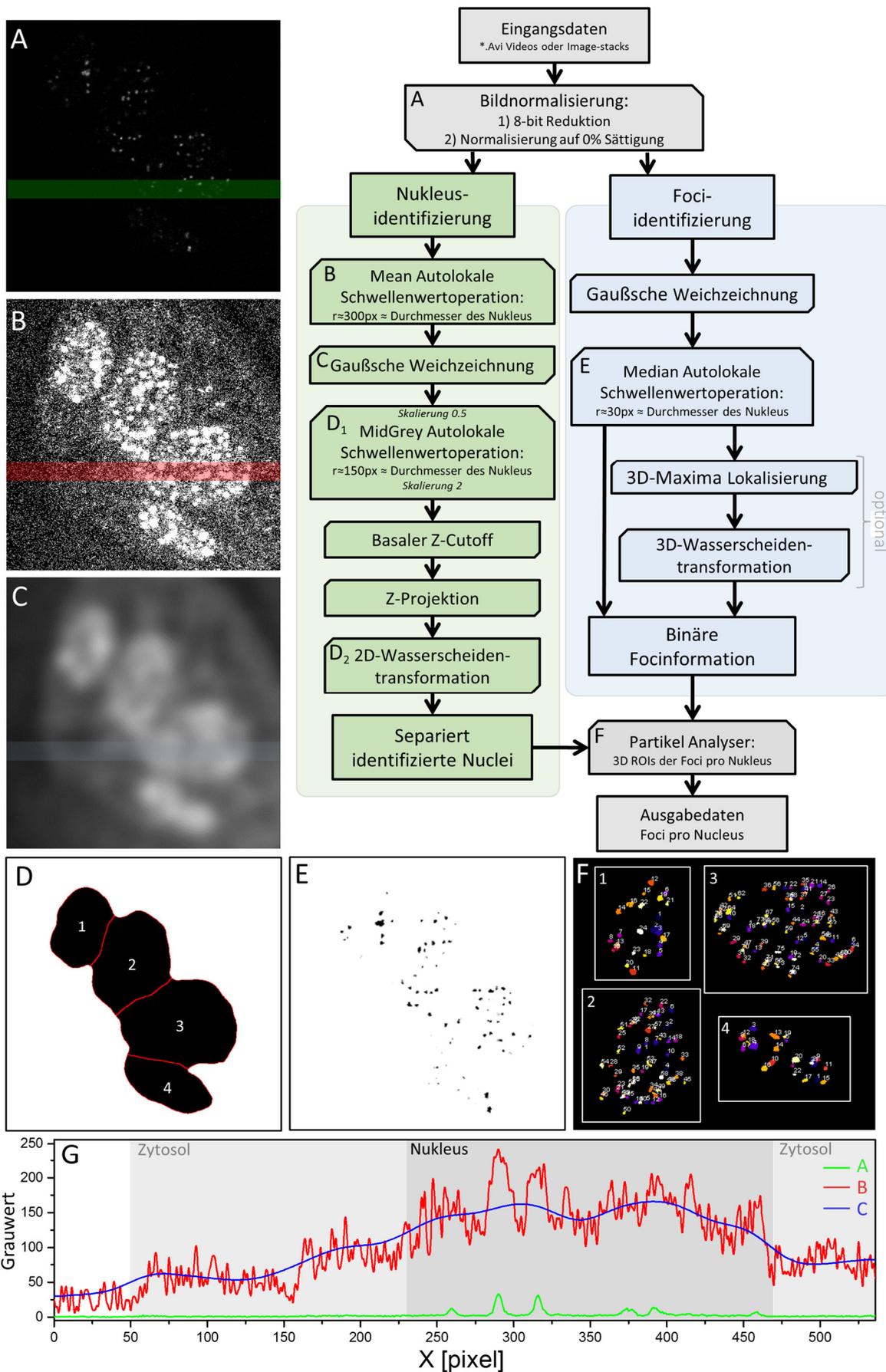


Abbildung 21: Schematische Ablauf der in FocAn-3D verwendeten Methodik für die Erkennung von Nuklei und Foci

Die unbearbeiteten Eingangsdaten werden, wie im Panel **A** dargestellt, auf 0% Sättigung normalisiert. Zuerst wird die Nukleusidentifikation durchgeführt indem auf das normalisierte Bild ein lokaler Mean-Schwellenwertoperator (Eq. 12) angewendet wird. Das Resultat wird anschließend einer Gaußschen Weichzeichnung unterzogen. Zusammengenommen erlauben diese zwei Schritte die graduelle Signalseparation, dargestellt im Bereichsplot **G**. Somit wird eine Trennung von extrazellulärem Raum zum Zytosol und zum Nukleus ermöglicht. Die jeweiligen Bereiche die dem Plot zugrunde liegen sind in Panel **A-C** farblich passend hervorgehoben. Durch den Midgrey (Eq. 13) Schwellenwertoperator wird das graduell separierte Signal, wie in **D** dargestellt, binärisiert. Die folgende WST trennt die im binären Signal erkannten Zellkerne (**D**, rote Linien). Die Fociidentifizierung beginnt mit einer Gaußschen Weichzeichnung gefolgt von einem Median autolokalem Schwellenwert, dargestellt in **E**. Im Anschluss werden beide Äste (Nukleus- und Foci-Identifizierung) des Programmablaufs kombiniert um die Foci pro Nukleus zu ermitteln. Dies ist in der axialen (z) Projektion in **F** dargestellt.

In Submission, Memmel et al., eingereicht 12.03.2019 BMC Bioinformatics

Der von FocAn-3D durchgeführte Programmablauf teilt sich grob, wie in Abb. 21 dargestellt, in zwei Bereiche. Zum einen die Erkennung und Separierung der Nuklei und zum anderen die Erkennung der γ H2AX-Foci in Kombination mit 3D-WST.

Begonnen wird, im ersten Schritt, mit einer Schnitt für Schnitt Bildnormalisierung auf 0% Sättigung. Diese Normalisierung ist notwendig, da für die Analyse von einem γ H2AX-Foci-Bildstapel ca. 80 einzelne Bilder aufgenommen werden müssen. Dies führt wiederum zum Photobleichen des verwendeten Farbstoffes über die Dauer der Aufnahmen. Als Folge werden Bilder des Z-Stapels, welche zeitlich später aufgenommen wurden, graduell weniger Signal pro Foci besitzen, verglichen mit Bildern welche zeitlich früher aufgenommen wurden. Durch die Normalisierung wird ein Ausgleich des Signals über die Aufnahmedauer erzielt, was dem Signalverlust und somit der Abnahme in der Detektionsgenauigkeit entgegenwirkt. Wie in Abb. 21A und G dargestellt sind die γ H2AX-Foci nach der Normalisierung deutlich sichtbar, die einzelnen Nuklei allerdings nicht genau zu erkennen.

Im zweiten Schritt sollen nun die Nuklei anhand ihrer schwachen Hintergrundfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Hierfür wird eine graduelle Signalseparationsmethode verwendet, welche darauf abzielt schwache Unterschiede in der unspezifischen Signaldichte des Zytosols und des extrazellulären Raumes sichtbar zu machen. Dies geschieht mit Hilfe von lokal begrenzten Schwellenwertoperationen, welche im nachfolgenden beschrieben werden. Im Allgemeinen wird für jeden Pixel in einer definierten Domäne separat, d.h. einem Radius um den zu untersuchenden Pixel, das Signal nach verschiedenen mathematischen Methoden verrechnet. Somit kann ein lokal begrenzter Schwellenwert appliziert werden, welcher nicht von dem Gesamtsignal des Bildes abhängig ist.

Für die Nukleus- und Fociidentifikation werden im Folgenden diese lokalen Schwellenwertoperationen verwendet:

Nukleus:

$$p = (p > \text{mean} - c) ? \text{Object} : \text{Hintergrund} \quad (\text{Eq. 12})$$

$$p = (p > ((\text{max} + \text{min}) / 2) - c) ? \text{Object} : \text{Hintergrund} \quad (\text{Eq. 13})$$

Foci:

$$p = (p > \text{median} - c) ? \text{Object} : \text{Hintergrund} \quad (\text{Eq. 14})$$

p steht hier für den zu untersuchenden Pixel. Die lokalen Domänenoperatoren mean , $(\text{max}+\text{min})/2$ und median bestimmen den Mean, Max+Min/2 (MidGray) oder Median in einem vorgegebenen Domänenradius r um den Pixel p . Der Parameter c wird für die manuelle Justierung des Schwellenwertes verwendet und wird standardmäßig mit 0 vorgegeben. Die angegebenen Schwellenwertoperationen bestimmen nun ob der Pixel p oder der Domänenoperator mean , $(\text{max} + \text{min})/2$ oder median einen größeren Grauwert besitzt. Wenn p den Domänenoperator übersteigt, wird der Pixel p angenommen und auf schwarz (Grauwert 0) gesetzt. Sollte p kleiner als der Domänenoperator sein wird der Pixel p abgelehnt und auf weiß (Grauwert 255) gesetzt.

Für die Erkennung des Zellkerns wird zuerst der in Eq. 12 beschriebene lokale mean Schwellenwertoperator angewandt. Es entsteht somit ein binäres Bild welches, wie in Abb. 21B zu sehen, die Schwellenwertinformationen darstellt. Die Nuklei besitzen hierbei sichtbar eine graduell höhere binäre Signaldichte als das Zytoplasma oder extrazelluläre Raum. Die Zellkerne sind somit schon optisch recht gut von der Umgebung zu differenzieren. Um aus dieser Datenlage die Nukleusflächeninformation zu extrahieren wird im nächsten Schritt ein Gaußscher Weichzeichnungsfilter mit einem Sigma von $\sim 10\%$ des durchschnittlichen Nukleus-Durchmessers verwendet. Durch diesen Filter wird das punktuell gesprenkelte binäre Signal (Abb. 21B) über die Fläche verteilt. Es entsteht folglich ein Bild in dem die Signalintensität in der Fläche stufenweise vom extrazellulären Raum bis hin zum Nukleus zunimmt (Abb. 21C, G) und somit eine erneute Schwellenwertbildung zur Detektion des Zellkerns zulässt.

Im nächsten Schritt wird der lokale $(\text{max}+\text{min})$ -Schwellenwertoperator (Eq. 14) im Domänenradius (150 Pixel = mittlerer Nukleusdurchmesser) verwendet, um die Nukleusflächeninformation durch den lokalen graduellen Signalabstufungen zu extrahieren. Globale automatische Schwellenwerte wären zwar in der Verrechnung schneller, allerdings unterliegt das Signal der Bilder starken Schwankungen, sowohl zwischen zwei Aufnahmen als auch zwischen den Nuklei in einer Aufnahme. Die Anwendung von globalen Schwellenwertoperationen eignet sich unter diesen Voraussetzungen nicht für die akkurate Lokalisierung der Nuklei. Das Ergebnis ist ein binäres Bild in dem die Zellkernfläche schwarz

(binär positiv – Grauwert 0) und der Rest weiß (binär negativ – Grauwert 255) abgebildet ist. Die bisher genannten Schritte werden für jedes Bild im Stack durchgeführt um die gesamte, 3D-Flächeninformation des Zellkerns zu ermitteln.

Da die hier angewandte Kombination von lokalen Schwellenwertoperationen sehr sensitiv für Schwankungen in der Signaldichte ist, lässt sich nicht ausschließen, dass Artefakte, bedingt durch Effekte des Glases im Probenkammerboden, auftreten. Diese Artefakte sind so ausgeprägt, dass das eigentliche Nukleussignal überlagert wird (siehe Abb. 22A) und somit die Nuklei in diesen Bildschichten nicht erkannt werden können. Um diesem Effekt entgegenzuwirken wird ein basaler Z-Cutoff durchgeführt. Der Cutoff ist so konzipiert, dass er die unteren Bereiche jeder Aufnahme, in welchen sich die Artefakte befinden, entfernt werden. Information für die Nukleusidentifizierung gehen bei dem basalen Z-Cutoff nicht verloren, da im nächsten Schritt die binäre Nukleusfläche orthogonalprojiziert (Z-Projektion) wird, um die Nukleusmaske zu erzeugen. Die Z-Projektion summiert das binäre Signal aller Schnitte auf und stellt es in einem Bild dar. Es entsteht somit die größte Fläche der Nuklei, welche die Nuklei in allen Bildschnitten einschließt. Die Z-Projektion ist hier für die Nuklei anwendbar, da Nuklei bei nahezu sub-konfluenten Zelldichten in der Probenkammer gleichmäßig auf dem Glas verteilt vorliegen und sich in der Regel nicht übereinanderstapeln. Die angewendete Z-Projektion hat zudem den Vorteil den Datensatz von drei Bilddimensionen (x, y, z) auf zwei Bilddimensionen (x, y) zu reduzieren. Dies vereinfacht alle nachfolgenden Berechnungen und verkürzt die Rechenzeiten.

Mit der nun 2D binären Nukleusmaske wird eine vorgeflutete WST durchgeführt mit dessen Hilfe überlappende Nuklei getrennt und separat erkannt werden können (siehe Abb. 21D, rote Linien). Der Toleranzwert für die Vorflutung kann in der Benutzeroberfläche (Abb. 20) von FocAn-3D eingestellt werden.

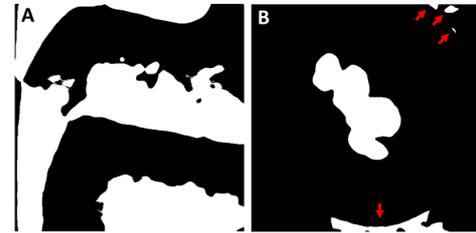


Abbildung 22: Binäre Signalartefakte in FocAn-3D

Bildteil **A** zeigt Signalartefakte der graduellen Signalseparation in den Basalbereichen, nahe dem Glasboden der Kammer. Bildteil **B** zeigt Artefakte (markiert durch rote Pfeile) in der Peripherie der erkannten Zellkerne.

In Submission, Memmel et al., eingereicht 12.03.2019 BMC Bioinformatics

Für die Identifizierung der immunfluoreszenzmarkierten γ H2AX-Foci, werden die in Abb. 21A beispielhaft dargestellten Aufnahmen mit einem Gaußschen Weichzeichnungsfilter vorbereitet. Im Anschluss werden sie mit dem *median* lokalen Schwellenwertoperator (eq. 14) binärisiert. Als Domänenradius für den Schwellenwertoperator ist der zweifache Durchmesser der Foci gewählt (~ 30 Pixel), ein Parameter welcher in der Benutzeroberfläche (Abb. 20A) abgefragt wird. Diese Operation wird für jeden Schnitt des Bildstapels durchgeführt und erzeugt somit einen Bildstapel mit binären Signalwerten in jeder Bildschicht welche die genannten Fociflächen pro Bildschicht darstellen (Abb. 21E). Für die Auszählung und Analyse der Foci müssen nun die vereinzelt erkannten Fociflächen pro Bildschicht passend den tatsächlichen Foci-Positionen im 3D-Raum zugeordnet werden. Für die Trennung von überlappenden Foci steht die Möglichkeit zur Verfügung, optional, eine 3D markerbasierte WST durchzuführen. Zur Markerfindung der markerbasierten 3D-WST wird ein 3D-Maximafinder eingesetzt,

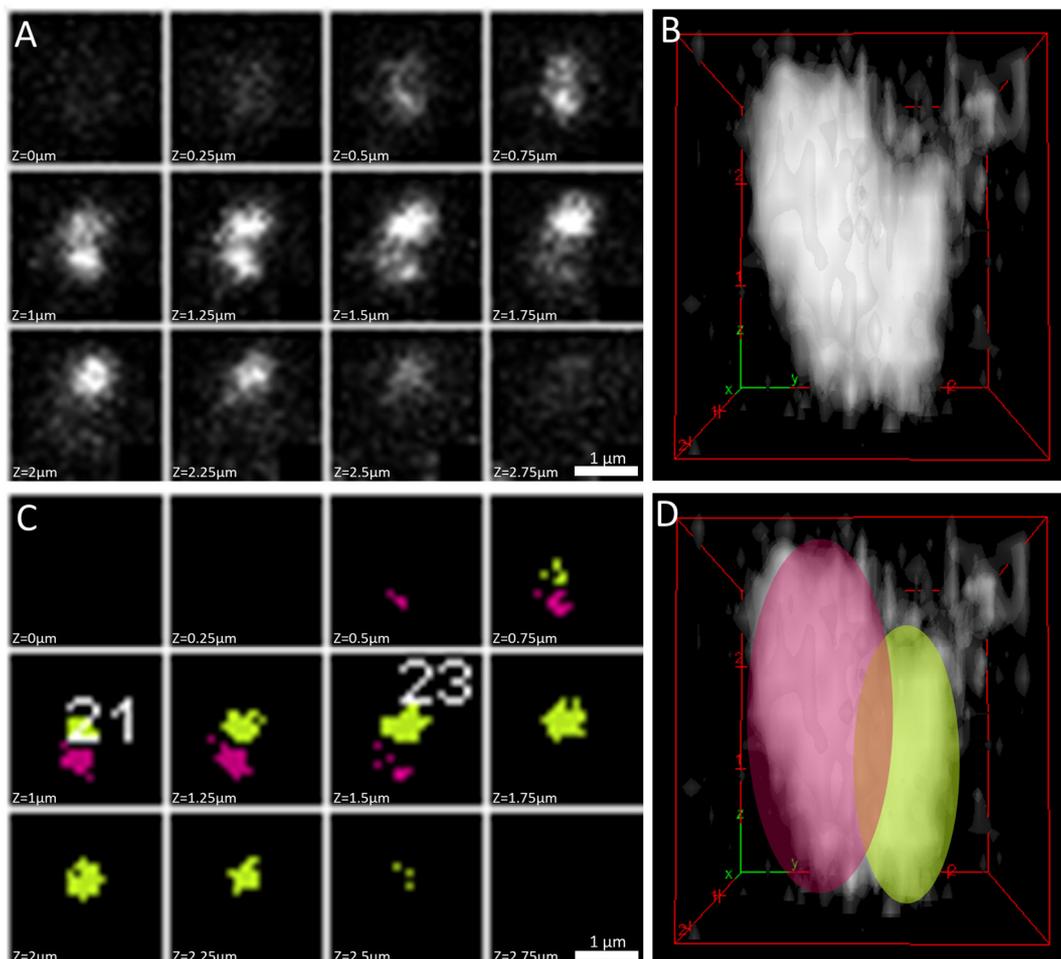


Abbildung 23: Beispiel der 3D-Wasserscheidentransformation bei einem überlappenden γ H2AX-Foci

In Abschnitt **A** ist eine Montage aus den Z-Schnitten mit jeweils 250 nm Abstand von zwei überlappenden Foci in Grauwerten dargestellt. Abschnitt **B** zeigt den gleichen Ausschnitt in einer 3D-Volumenprojektion. In Panel **C** ist die binäre Information nach der 3D-WST dargestellt. Grün entspricht dem erkannten Foci 23 und Rot dem erkannten Foci 21 (entsprechend dem in Abb. 21D, F dargestelltem Nukleus mit Nummer 2). **D** stellt eine schematische Repräsentation der überlappenden Foci, entsprechend des roten und grünen Foci in **C**, über der 3D-Volumenprojektion dar.

welcher auf das Signalmaxima im Zentrum der entsprechenden Signalwolken (Abb. 23A, B) der Foci optimiert ist. Überlappende Foci besitzen nach diesen Kriterien aufgrund ihrer Signalverteilung zwei oder mehr separate Maxima. Ausgehend von diesen Markern wird nun schichtweise und signalabhängig eine Schale um die Maxima generiert. Die 3D-Grenzen für die Trennung sind gefunden, sobald zwei Schalen, ausgehend von zwei verschiedenen detektierten Maxima und somit von zwei signalüberlappenden Foci, in Kontakt kommen (Abb. 23C, D) [134]. Exemplarisch ist dies in Abb. 23 für einen axial versetzt überlappenden Foci dargestellt. Die Zuordnung der vereinzelt Fociflächen geschieht separat für jeden Nukleus. Dies geschieht anhand der identifizierten separaten ROI (Region of Interest) des Nukleus (Abb. 21 D, rote Linien) unter Verwendung des „*Particle Analyser*“ Plugins. Als Ausgabedaten werden die Abzählung der Foci pro Nukleus generiert (Abb. 21F), welche wiederum für die Untersuchung der γ H2AX-Kinetik verwendet werden können.

Bildvoraussetzungen bei der Anwendung des FocAn-3D ImageJ-Plugins

FocAn-3D verwendet 3D-Bildstapel entweder im Einzelfarben-Grauwertformat oder multifarben Hyperstacks. Bei letzterem muss der Bildkanal welcher die Fociinformation enthält separat in dem „*Multicolor channel selection*“ Benutzerinterface (Abb. 20C) angegeben werden.

Bilder mit extrem hellen Hintergrundobjekten (ein vielfaches des Signals der Foci), die z.B. durch Unreinheiten auf dem Deckglas oder Bakterien erzeugt werden, sind zu vermeiden. Extrem helle Spots erzeugen durch die angewandte Bildnormalisierung eine Reduzierung des Foci-Signals im Vergleich zu „sauberen“ Bildern. Dies kann wiederum in der weiteren Auszählung potentiell zu Zählungsfehler führen. Des Weiteren sollte die angewandte Laserleistung und Belichtungsdauer auf die nötige Aufnahmedauer angepasst werden. Dies dient dem Zweck die Photobleachingeffekte während der Aufnahme der großen Bildstapel nach Möglichkeit zu reduzieren.

Durch die implementierte Nutzung des „*BioFormat*“ Datenimportplugin können viele verschiedene wissenschaftliche oder setupspezifische Dateiformate wie z.B. TIF, TIFF, PNG, CZI, NEF abgerufen werden. Bildparameter, wie Voxelgröße und sowohl Foci- als auch Nuklei-Dimensionen werden im ersten Dialogfenster (Abb. 20A) abgefragt und für die automatische Berechnung der Domänenradien für die Schwellenwerte verwendet. Zusammengefasst ermöglicht dies FocAn-3D bei Aufnahmen mit unterschiedlichen Pixel-/Voxelgrößen und Auflösungen anzuwenden.

Hardwarevoraussetzungen für die Nutzung von FocAn-3D

FocAn-3D läuft auf allen modernen Desktop-PCs welche auch ImageJ unterstützen. Es ist allerdings von Vorteil ein 64bit-System mit Multikern-CPU zu verwenden. FocAn-3D ist in der Lage Multithreading zu verwenden um die rechenintensiven lokalen Schwellenwertoperationen durchzuführen. Des Weiteren ist ein schneller CPU (MHz) von

Vorteil, da die 3D WST bisher nur mit einem Kern des CPUs arbeiten kann. Für ein System mit einem 4 Kern i7-4790 CPU@3.6 GHz dauert es ~4 Minuten ohne und ~8 Minuten mit 3D-WST um eine 1024×1024×60 Bildstapel zu berechnen.

Validierung von FocAn-3D gegen händische Zählung in 2D und 3D

Um die Vorgehensweise von FocAn-3D zu validieren und mit anderen, bereits etablierten Methoden abzugleichen, wurde ein Versuchsansatz mit DK-MG- und SNB19-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden bei verschiedenen Zeiten (0-24 h) nach Bestrahlung (2 Gy) fixiert und γ H2AX immunfluoreszent markiert. Es wurden 3D-Bildstapel mit den γ H2AX-gefärbten Zellen am LSM aufgenommen. Im Anschluss wurde aus diesem Datensatz ein Subdatensatz aus zufällig gemischten Bildern mit unterschiedlichen Reparaturzeiten von insgesamt 100 Zellen erstellt. Da im Folgenden arbeits- und zeitintensive graphisch unterstützte manuelle Auszählungen der Foci durchgeführt wurde, musste die Anzahl der Zellen aus zeitlichen Gründen begrenzt werden. Die Mischung der Zeiten gewährleistete zudem eine homogene Mischung aus Nuklei mit verschiedenen γ H2AX-Focizahlen.

Derselbe Datensatz wurde sowohl 2D als auch 3D per Hand mit einer graphisch unterstützen point&click-Methode in ImageJ ausgewertet und anschließend mit den entsprechenden Ergebnissen von FocAn-3D verglichen. Zum Vergleich von FocAn-3D mit der 2D point&click-Auswertung, wurden jeweils die entsprechenden Bildschnitte 11-12 der Bildstapel verwendet und mit FocAn-3D ausgezählt und verglichen. Diese befinden sich ca. 3 μ m über dem Glasboden der Kammer und bilden die Midsektion der meisten Nuklei ab.

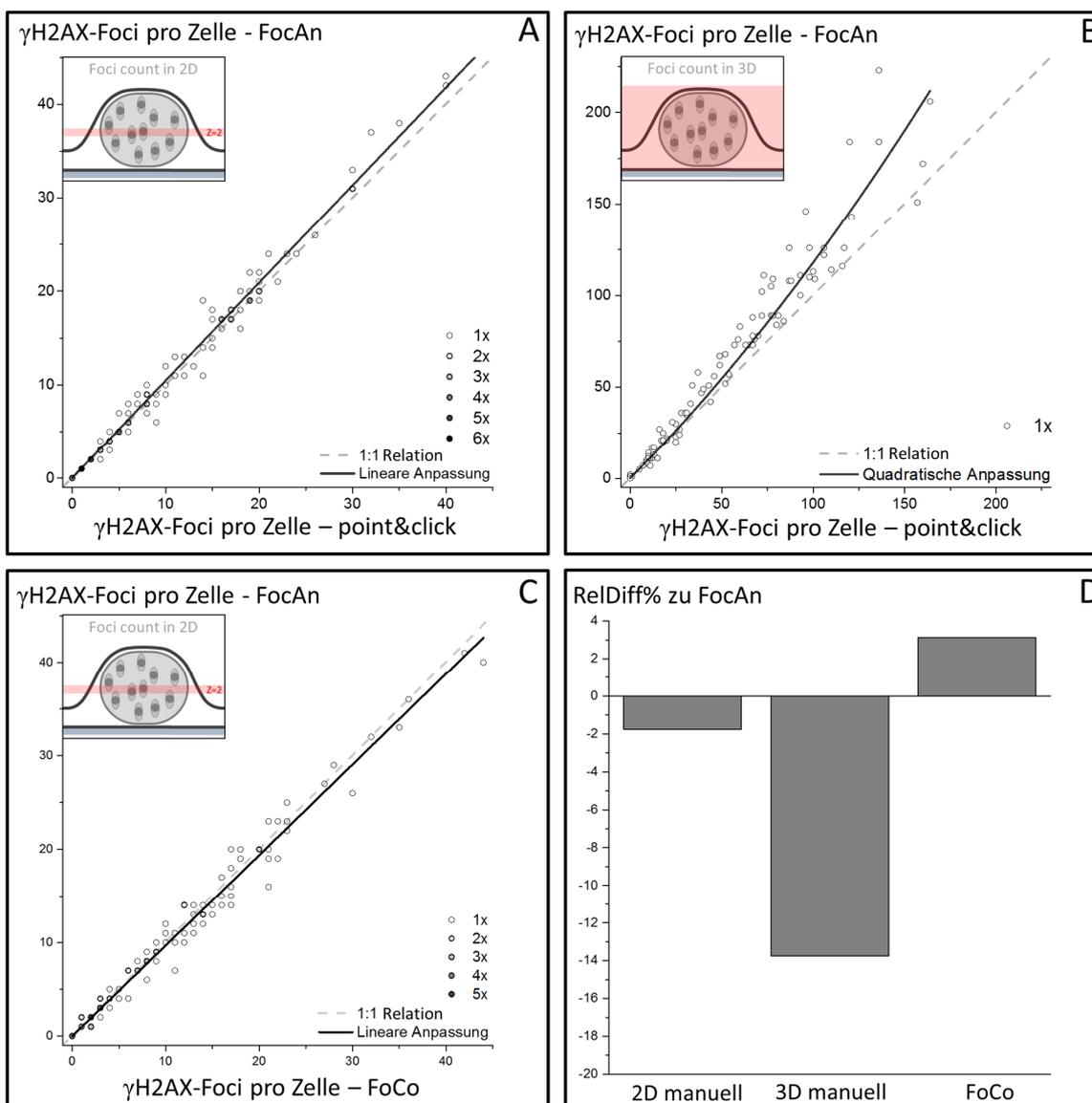


Abbildung 24: Vergleich von der Fociauszahlung mittels FocAn-3D gegen eine händische point&click-Zählung in 2D und 3D sowie dem 2D-Zählprogramm FoCo

Die Einlagen in **A**, **B** und **C** beschreiben jeweils das Volumen indem die Analyse durchgeführt wurde. Entweder wurde wie in den Einlagen dargestellt die Midsektion, mit einer Dicke von 2 Bildschnitten (**A** und **C**), oder das gesamte 3D-Volumen (**B**) in einem Datensatz von 100 Zellen mit variierenden Zeiten nach Bestrahlung (2 Gy), ausgezählt. Die manuelle sowie die Auszählung mit einem etabliertem 2D Zählprogramm FoCo [40] ist jeweils auf der x-Achse aufgetragen und die Auszählung mit FocAn-3D jeweils auf der y-Achse. In der 2D-Auszählung, sowohl in Bildabschnitt **A** als auch **C**, stimmen die Daten jeweils gut überein. Dies ist anhand der linearen Regression (durchgezogenen Linie) im Vergleich zur 1:1 Relation ($x=y$, gestrichelte Linie) zu erkennen. In der 3D-Auszählung folgen die Daten eher einem quadratischen Verlauf, was in der quadratischen Regression (durchgezogene Linie in **B**) zu erkennen ist. Panel **D** stellt die jeweilige relative Differenz nach Gleichung (Eq. 15) der Methoden verglichen zu FocAn-3D dar.

In Submission, Memmel et al., eingereicht 12.03.2019 BMC Bioinformatics

Abb. 24A zeigt die 2D point&click-Auszählung aufgetragen gegen die mit FocAn-3D erstellte 2D-Auszählung. Die gestrichelte Linie stellt die optimale Verteilung ($x=y$) zwischen den beiden Analysemethoden dar. Die durchgezogene Linie stellt die lineare Regression der Daten dar. Sie ist auf den Ursprung (0:0) festgesetzt. Überlagernde Datenpunkte, sind wie in der Abb. 24A dargestellt, durch einen dickeren Rand oder Füllung hervorgehoben. Aufgrund der Heterogenität des Datensatzes, in welchem alle gemessenen Reparaturzeiten (0-24 h) enthalten sind, verteilen sich die Punkte über einen breiten Bereich von 0-42 Foci per Nukleus. Anhand der Steigung der linearen Regression von $\sim 1,04 \pm 0,007$ und dem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,995$ ist davon auszugehen, dass beide Zählungsmethoden (manuell und mit FocAn-3D) im 2D-Datensatz gut übereinstimmen und nur eine minimale Gewichtung in Richtung FocAn-3D besitzen. Zusätzlich wurde die relative Differenz (*RelDiff*) nach Gleichung (Eq. 15) zu FocAn-3D bestimmt.

$$RelDiff = \frac{N_M - N_{FocAn}}{N_{FocAn}} * 100\% \quad (Eq. 15)$$

N_M steht hierbei für die vergleichende Methode und N_{FocAn} für den Abgleich mit FocAn-3D. Wie nun in Abb. 24D dargestellt ist die relative Differenz zwischen der händischen Auszählung und FocAn-3D kleiner als 2%.

Bei der manuellen Auszählung der 3D-Daten im Vergleich zu FocAn-3D (Abb. 24B) ist ein eindeutiger Trend in Richtung FocAn-3D mit steigender Focizahl pro Nukleus zu erkennen. Die durchgezogene Linie stellt hier einen quadratischen Fit nach Gleichung (Eq. 16) auf die 3D-Daten dar.

$$y = A * x + B * x^2 \quad (Eq. 16)$$

($A * x$) definiert den linearen Startbereich und ($B * x^2$) die quadratisch steigende Abweichung in den höheren Bereichen.

Obwohl derselbe Datensatz zu Grunde liegt übersteigen die erkannten Foci pro Nuklei im 3D-Auszählung bei weitem die der 2D-Auszählung. Das Maximum liegt hier im Bereich von 250 Foci pro Nukleus und damit etwa um das ~ 6 -fache höher als in der 2D-Auswertung. Extrapoliert man allerdings den 2D ermittelten Maximalwert auf den Inhalt eines perfekt kugelförmigen Nukleus so erreicht man mit ~ 275 Foci pro Nukleus einen leicht höheren Wert als die tatsächlich in der 3D-Auswertung bestimmten 250 Foci pro Nukleus. Die mit Eq. 15 bestimmte relative Differenz zwischen FocAn-3D und der händischen Auswertung liegt hier bei etwa 14% zugunsten FocAn-3D.

Als zusätzliche Validierung der hier entwickelten Methode wurde FocAn-3D mit der vor kurzem von Lapytsko et al. entwickelten Software FoCo [40] unter der Verwendung eines 2D-Datensatzes für beide Programme verglichen. FoCo ist für 2D-Datensätze optimiert worden und ist nicht in der Lage 3D-Daten zu verarbeiten. Es benötigt zusätzlich zur γ H2AX-Färbung spezifisch gefärbte Nuklei. Dies dient der Erkennung und Trennung der Nuklei sowie der folgenden Zuordnung der Foci. Es war somit erforderlich den hier verwendeten Datensatz für die Verwendung mit FoCo zu modifizieren. Als Grundlage diente auch hier derselbe Datensatz ohne Nukleusfärbung wie er auch in der 3D-Analyse verwendet wurde. Da FoCo zur Erkennung des Nukleus eine separate Färbung benötigt wurde die binäre 2D-Nukleusmaske für diesen Zweck verwendet. Die 2D-Nukleusmaske wurde mit FocAn-3D aus dem gesamten 3D-Datensatz gewonnen (siehe Abb. 21D) und als zweiter Farbkanal an die passenden 2D- γ H2AX-Midsektionen ergänzt. Es war wichtig in diesem Fall den vollen 3D-Datensatz für die Generierung der Nukleusinformationen zu verwenden, da die verwendete graduelle Signalseparation am genauesten mit 3D-Daten arbeitet. Somit können Fehler im Abgleich der Nuklei zwischen FoCo und FocAn-3D ausgeschlossen werden. Die verwendete Nukleusseparation wurde bei der Anwendung in FoCo noch einmal manuell überprüft. Dies ist Voraussetzung beim Durchlauf der Daten in FoCo und so auch in Lapytsko et al. [40] beschrieben. Die Fociinformation wurde somit in den roten Farbkanal der Bilder verschoben und die binäre Nukleusinformation in den grünen Farbkanal. Folglich ist die Voraussetzung für FoCo von Zweifarbenbilder mit dem Foci-Signal im ersten Farbkanal und den „gefärbten“ Nuklei im zweiten Farbkanal erfüllt. FocAn-3D wurde modifiziert um statt der natürlich generierten Nukleusinformation dieselbe, für FoCo erstellte, binäre 2D Nukleusinformation zu akzeptieren und zu verwenden. Dies gestaltete den Abgleich zwischen FoCo und FocAn-3D so präzise und unverzerrt wie möglich.

In Abb. 21C sind nun die FoCo-Zählungen gegen die FocAn-3D-Zählungen aufgetragen. Anhand der linearen Regression und der Verteilung der Punkte ist zu erkennen das beide Methoden gut miteinander übereinstimmen. Die Steigung der linearen Regression beträgt $\sim 0.97 \pm 0.009$ und weicht somit nur um 0.03 vom idealen 1:1 Verhältnis ab. Die relative Differenz liegt bei $\sim 3\%$ zugunsten FoCo.

4.2.4 Automatische Hochdurchsatz- γ H2AX-Focizählung in DK-MG- und SNB19-Zelllinien

Im folgenden Experiment wurden die beiden, hier untersuchten Zelllinien, DK-MG und SNB19 in drei separaten Durchläufen jeweils 0', 10', 20', 30', 3 h, 6 h, 12 h und 24 h nach 2 Gy Bestrahlung fixiert und γ H2AX immunfluoreszent markiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am cLSM und die Auszählung der γ H2AX-Foci mit FocAn-3D. Für jeden Zeitpunkt nach IR wurde die Focizahl von 80 Zellen pro Zelllinie bestimmt.

Abb. 25 zeigt den Verlauf der γ H2AX-Focizahl über die Zeit für beide Zelllinien. Es ist eine zweiteilige Kinetik, bestehend aus Induktion und Verfall zu erkennen. Für SNB19-Zellen stieg die Zahl der Foci, vom Hintergrundlevel der unbestrahlten Probe, von ~ 15 auf das Maximum von ~ 47 Foci pro Nukleus. Dies geschah im Bereich von 10-20 Minuten nach IR (Abb. 25, blaue Symbole). Nach dem Maximum der Focizahl ist ein exponentieller Verfall zu erkennen, welcher das Hintergrundniveau von ~ 15 Foci pro Nukleus nach ca. 12 h erreicht. DK-MG, verglichen mit dem beschriebenen Verlauf für SNB19, zeigt eine langsamere Induzierung mit dem Maximum zwischen 20 und 30 Minuten mit ~ 40 Foci pro Nukleus (Abb. 25, rote Symbole). Der nachfolgende Verfall stellt sich ebenfalls langsamer dar. Das Hintergrundlevel von ~ 16 Foci pro Nukleus wird erst bei 24 h erreicht.

Um die beschriebenen Daten genauer zu untersuchen wurde überprüft ob sie dem bereits beschriebenen Verlauf der γ H2AX-Focikinetik folgen [135,136]. Dies erfolgte in dem ein modifiziertes Modell von Mariotti et al. (Eq. 17) [137] angelegt wurde welches die Induktion und den Abbau in der γ H2AX-Focikinetik beschreibt.

$$N(t) = A^2(1 - e^{-t/\tau_1})(e^{-t/\tau_2}) + R \quad (\text{Eq. 17})$$

Die exponentiellen Terme $(1 - e^{-t/\tau_1})$ und $A(e^{-t/\tau_2})$ beschreiben jeweils den Induktions- und Verfallsprozess. Die Exponenten wurden umgestellt um statt der Wachstums-/Verfallsraten die Zeitkonstanten für Wachstum (τ_1) und Verfall (τ_2) zu verwenden. Des Weiteren wurde der Summand R hinzugefügt um in der Gleichung die spontan auftretenden und für Krebszellen typischen [48] γ H2AX-Foci zu berücksichtigen.

Wie in den in Abb. 25 dargestellten, durchgängigen Kurven zu sehen, passt das Modell von Mariotti et al. zu dem Verlauf der hier dargestellten γ H2AX-Foci. Die Induktionsgeschwindigkeit ist hier für beide Zelllinien sehr viel schneller als der respektive Verfall ($\tau_1 \ll \tau_2$). Des Weiteren zeigt die Induktion von γ H2AX-Foci bei SNB19-Zellen einen steileren Anstieg als bei DK-MG-Zellen. τ_1 -SNB19 ist mit 2,8 Minuten schneller als τ_1 -DK-MG bei 8,4 Minuten. Die Kontrolle weist in beiden Zelllinien mit ~ 15 Foci pro Nukleus denselben Wert auf. Obwohl beide Zelllinien ein ähnliches Maximum der γ H2AX-Focizahlen besitzen (40~45 Foci pro Nukleus) kommt es zu großen Unterschieden im Abbau der γ H2AX-Foci. SNB19 baut die γ H2AX-Foci sehr viel schneller wieder ab ($\tau_2 \approx 125$ min) als DK-MG-Zellen ($\tau_2 \approx 326$ min).

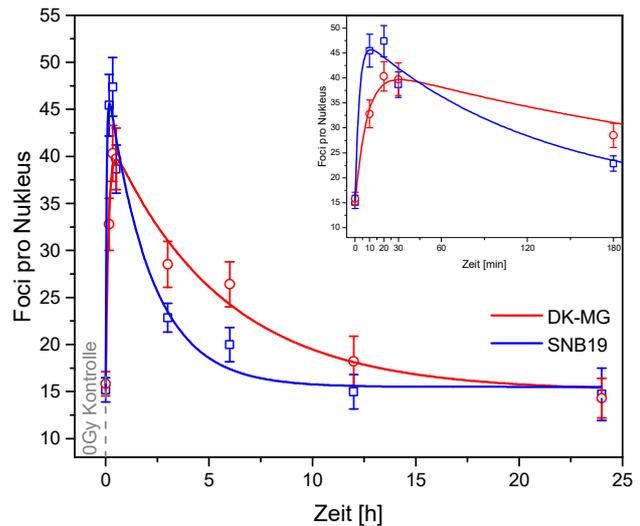


Abbildung 25: Automatische Fociauszahlung von DK-MG- und SNB19-Zellen

Dargestellt ist ein direkter Vergleich zwischen der γ H2AX-Focizahl bei DK-MG- und SNB19-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach 2 Gy Bestrahlung. Für den Zeitpunkt 0' wurden unbestrahlte Proben verwendet. Das Insert zeigt eine Vergrößerung des Zeitabschnittes zwischen 0 und 3 h. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus ~ 80 Zellen. Es wurde eine modifizierte Version des Modells von Mariotti et al. [137] angelegt.

In Submission, Memmel et al., eingereicht 12.03.2019
BMC Bioinformatics

4.2.5 γ H2AX- und DNA-PK-Foci in cLSM-Immunfluoreszenzaufnahmen

Neben der quantitativen Untersuchung mit FocAn-3D sollen nun im nächsten Versuchsteil die γ H2AX-Foci im Detail untersucht werden. Um die γ H2AX-Reparaturfoci und deren Interaktion mit DNA-PK genauer zu analysieren wurden mit 2 Gy bestrahlte DK-MG- und SNB19-Zellen 2 h nach Bestrahlung fixiert, angefärbt und mittels cLSM untersucht. Abb. 26 zeigt repräsentative cLSM Bilder von γ H2AX-Foci (grün dargestellt). Die γ H2AX-Foci erscheinen als helle Cluster, welche sich von dem sehr schwachen Hintergrundsignal des Nukleus abheben. Die Färbung der katalytischen Untereinheit von DNA-PK (DNA-PKcs) in Abb. 26A und B (magenta) stellt sich als sehr dichtes im Nukleus verteiltes und kaum geclustertes Signal dar. Genauerer Abgleich mit dem γ H2AX-Signal zeigt annähernd kontralokalisiertes Signal. Ein Maximum des γ H2AX Signales um ~ 60 -80% geht mit einem Rückgang des DNA-PKcs Signales (bis zu 60%) einher.

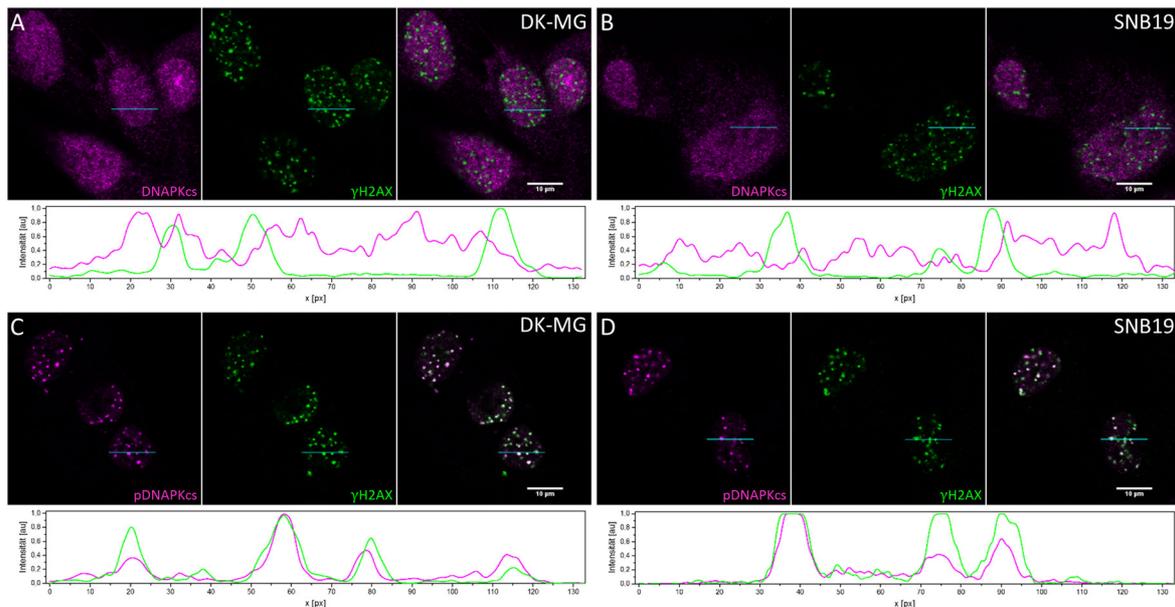


Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbungen von γ H2AX, DNA-PKcs und pDNA-PKcs in DK-MG- und SNB19-Zellen.

Gezeigt sind DK-MG- und SNB19-Zellen jeweils nach 2 Gy Bestrahlung und 2 h Reparaturzeit. In Panel A und B sind die Färbungen mit γ H2AX (grün) und DNA-PKcs (magenta), jeweils einfarbig und als zweifarbiger Merge, dargestellt. Panel C und D zeigen die Färbungen mit γ H2AX und pDNA-PKcs. Die cyanfarbige Linie zeigt die Position des jeweils unter dem Bild dargestellten Intensitätsprofils dar. Die Profile sind auf ihr maximales Signal normiert.

Verglichen mit dem unphosphorylierten DNA-PK (Abb. 26A, B) zeigten die an Serin 2056 phosphorylierten DNA-PKcs (pDNA-PKcs) Immunfluoreszenzfärbungen (Abb. 26 C, D) ein entgegengesetztes Ergebnis. Die pDNA-PKcs-Signalverteilung ist wie bei γ H2AX-Foci clusterförmig und hebt sich eindeutig vom Hintergrundsignal des Zellkerns ab. pDNA-PKcs-Foci lassen sich zudem ausschließlich in Kollokalisation mit γ H2AX-Foci feststellen. Es sind in den Farbmerges in Abb. 26B und C auch γ H2AX-Foci (grün) zu erkennen welche keine entsprechend kollokalisierten pDNA-PKcs-Foci besitzen (weiß).

4.2.6 Auflösung der Nanometerstruktur von γ H2AX- und pDNA-PKcs- in DK-MG- und SNB19-Zellen mittels der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopiemethode dSTORM

Im nächsten Schritt dieser Arbeit sollten die im Nanometerbereich skalierten Strukturen der DSB-Reparaturmaschinerie genauer untersucht und in hier bisher nicht erreichtem Detail dargestellt werden. Da beugungsbegrenzte Mikroskopiemethoden für die Auflösung dieser Größenordnungen nicht ausreichend sind wurde die hochauflösende Mikroskopietechnik dSTORM verwendet. Im Gegensatz zu beugungsbegrenzten cLSM Aufnahmen mit einer lateralen Auflösung von ~ 180 nm [128] ließen sich mit dSTORM subbeugungsbegrenzte Auflösungen bis zu ~ 21 nm [138] erreichen. Dies war ausreichend um die Nanometerstruktur des DSB Markerhistons γ H2AX und der an Serine-2056 phosphorylierten DNA-Reparaturkinase pDNA-PK darstellen zu können.

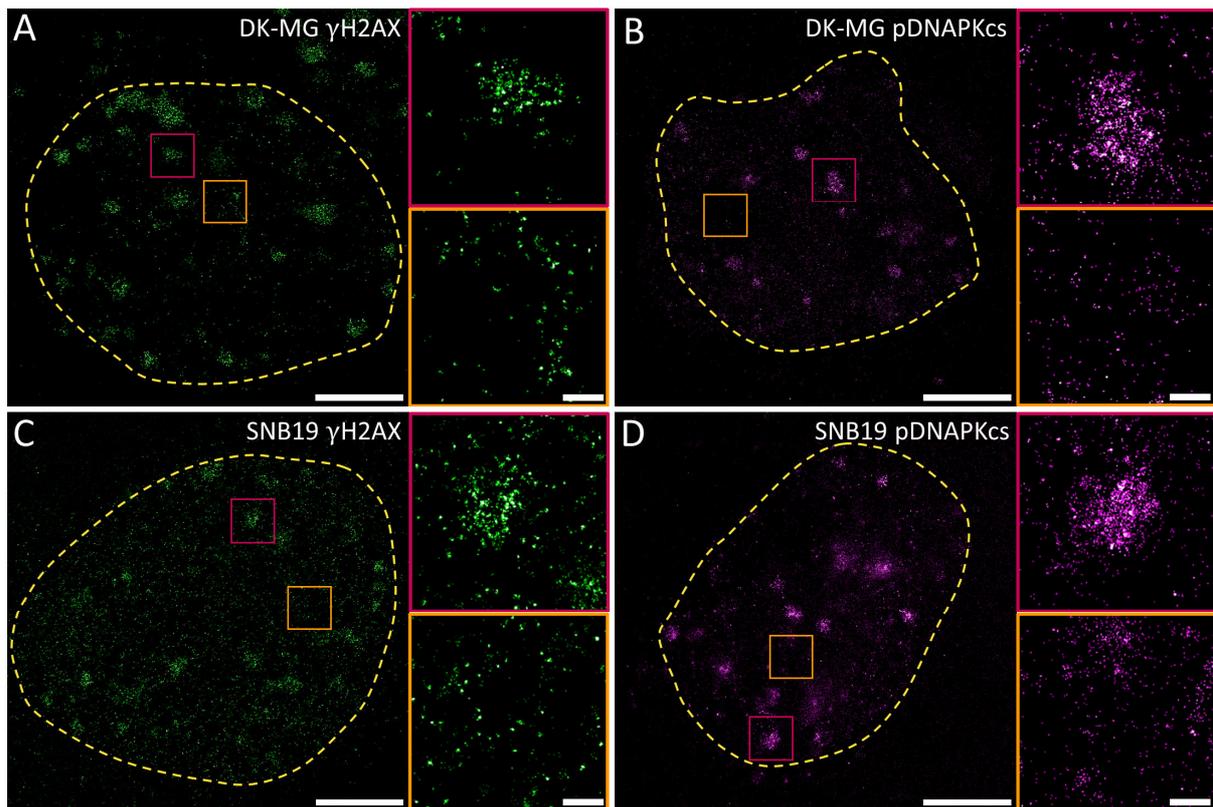


Abbildung 27: Repräsentative *d*STORM-Rekonstruktionen von γ H2AX-, pDNA-PKcs-, in DK-MG- und SNB19-Zellen

Repräsentative Aufnahmen von DK-MG-Zellen (A, B, C) und von SNB19-Zellen (C, D, E). Alle gezeigten Proben wurden mit 2 Gy bestrahlt und nach 3 h fixiert und angefärbt. Dargestellt ist γ H2AX (grün) in der ersten Spalte (A, C) und pDNA-PKcs (magenta) in der zweiten Spalte (B, D). Der Maßstabsbalken der Rekonstruktionen des gesamten Nucleus entspricht 4 μ m und in 5x vergrößerten Inserts 400 nm. Die rot umrandeten Inserts zeigen jeweils einen entsprechenden Foci und die orange umrandeten Inserts eine focifreie Fläche im Zellkern.

In den *d*STORM-Rekonstruktionen ist die Nanometerstruktur der γ H2AX-Foci als inhomogene Verteilung aus sub-Clustern dargestellt worden (Abb. 27, rote Inserts). Die Summe dieser sub-Cluster entspricht jeweils den in Abschnitt 5.3 (Abb. 26) gezeigten gleichmäßigen Signalcluster (Foci) der cLSM-Aufnahmen. Die sichtbaren sub-Cluster der *d*STORM-Rekonstruktionen werden im Folgenden als Nanofoci bezeichnet. In beiden untersuchten Zelllinien besaßen die γ H2AX-Nanofoci (Abb. 27A, C) einen typischen Durchmesser von etwa 40-50 nm. Zudem wiesen die Zellen in den γ H2AX-Foci freien Bereichen (Abb. 27A, C, orangenes Insert) ebenfalls vereinzelte pan-Nukleare γ H2AX-Nanofoci auf.

Die cLSM Aufnahmen zeigten für pDNA-PKcs eine ähnliche Struktur und Verteilung der Foci (Abb. 26B, D). In den *d*STORM-Rekonstruktionen (Abb. 27B, D) unterschieden sich pDNA-PK jedoch von den entsprechenden Rekonstruktionen der γ H2AX-Nanofoci (Abb. 27A, C). pDNA-PK wies hier eher diffuses Signal über die gesamte Focifläche auf. Im Gegensatz zu der Verteilung der klar abzugrenzenden γ H2AX-Nanofoci. Die Verteilung in den pDNA-PKcs focifreien Bereichen des Zellkerns (Abb. 27B, D, orangenes Insert) wies nahezu

keine sub-Cluster auf. pDNA-PK zeichnete sich auch hier durch eine eher diffuse Signalverteilung aus.

4.2.7 Nanofocicounter – Quantifizierung der hochaufgelösten γ H2AX-Nanofoci

Im nächsten Schritt wurden die *d*STORM Aufnahmen einer quantitativen Auswertung unterzogen. Da sich die Signalverhältnisse und Strukturen in den hochaufgelösten γ H2AX-Rekonstruktionen (Foci zu Nanofoci) entsprechend zu den cLSM Aufnahmen (Nukleus zu Foci) verhalten, konnte eine vergleichbare Methodik wie in FocAn-3D angewandt werden. Der Nanofocicounter ImageJ-Algorithmus, schematisch in Abb. 28 dargestellt, unterteilt sich daher ebenfalls in zwei separate Bereiche. Zum einen die Foci-Identifikation und zum anderen die Nanofoci-Identifikation. Als Eingangsdaten dienen hier die durch die *rapid*STORM-Software rekonstruierten *.png (Abb. 28A). Die Foci stellen sich hier als Cluster aus engen γ H2AX-Nanofoci dar, welche im ersten Schritt durch eine *mean* autolokale Schwellenwertoperation grob erkannt werden und im Anschluss doppelt durch eine Gaußsche Weichzeichnung weiterverarbeitet werden. Zusammen führt dies zu einer Signalseparation, welche abhängig von der Dichte der Lokalisationscluster ist und der tatsächlichen Position der Foci entspricht. Die den Foci entsprechenden resultierenden Signalwolken (Abb. 28B) können durch einen festgesetzten globalen Schwellenwert extrahiert werden. Auf das entstandene binäre Bild wird im nächsten Schritt eine 2D-WST angewandt um überlappende Foci zu trennen (Abb. C, rote Linien). Im letzten Schritt der Foci-Identifizierung werden sehr kleine binäre Bereiche ($<3500 \text{ nm}^2 \triangleq$ kleinsten mit FocAn-3d ermittelten Foci), aussortiert und die restlichen erkannten Foci für die Nanofoci-Identifizierung verwendet.

Für die Nanofoci-Identifizierung wird jeder Foci aus dem Originalbild extrahiert und separat ausgewertet. Hierfür werden lokalisationsarme Bereiche mit einer Lokalisationsstärke von unter 30% entfernt. Dieser Schritt löscht die schwachen Hintergrundlokalisationen in den Foci und erlaubt eine genauere Nanofoci-Identifizierung. Im nächsten Schritt wird eine *Mid-Grey* autolokale Schwellenwertoperation (Eq. 14) im doppelten Nanofoci-Durchmesser durchgeführt. Das entstehende binäre Bild besitzt Flächen entsprechend der vollen Halbwertsbreite (FWHM) der Nanofoci-Lokalisationen, welche die als Nanofoci Struktur präzise repräsentieren (Abb. 28E). Nach einer 2D-WST wird, mit Hilfe des „*Particle Analyser*“ ImageJ Plugins, das resultierende binäre Bild mit einem Größenausschluss von 8 Pixeln ausgewertet. Der Größenausschluss wird manuell vermessen und dient dazu sehr kleine binäre Flächen auszuschließen, welche den Detektionsartefakten entsprechen. Die Ausgabedaten sind *.txt Dateien mit der Anzahl und Fläche der Nanofoci separat für jeden Foci.

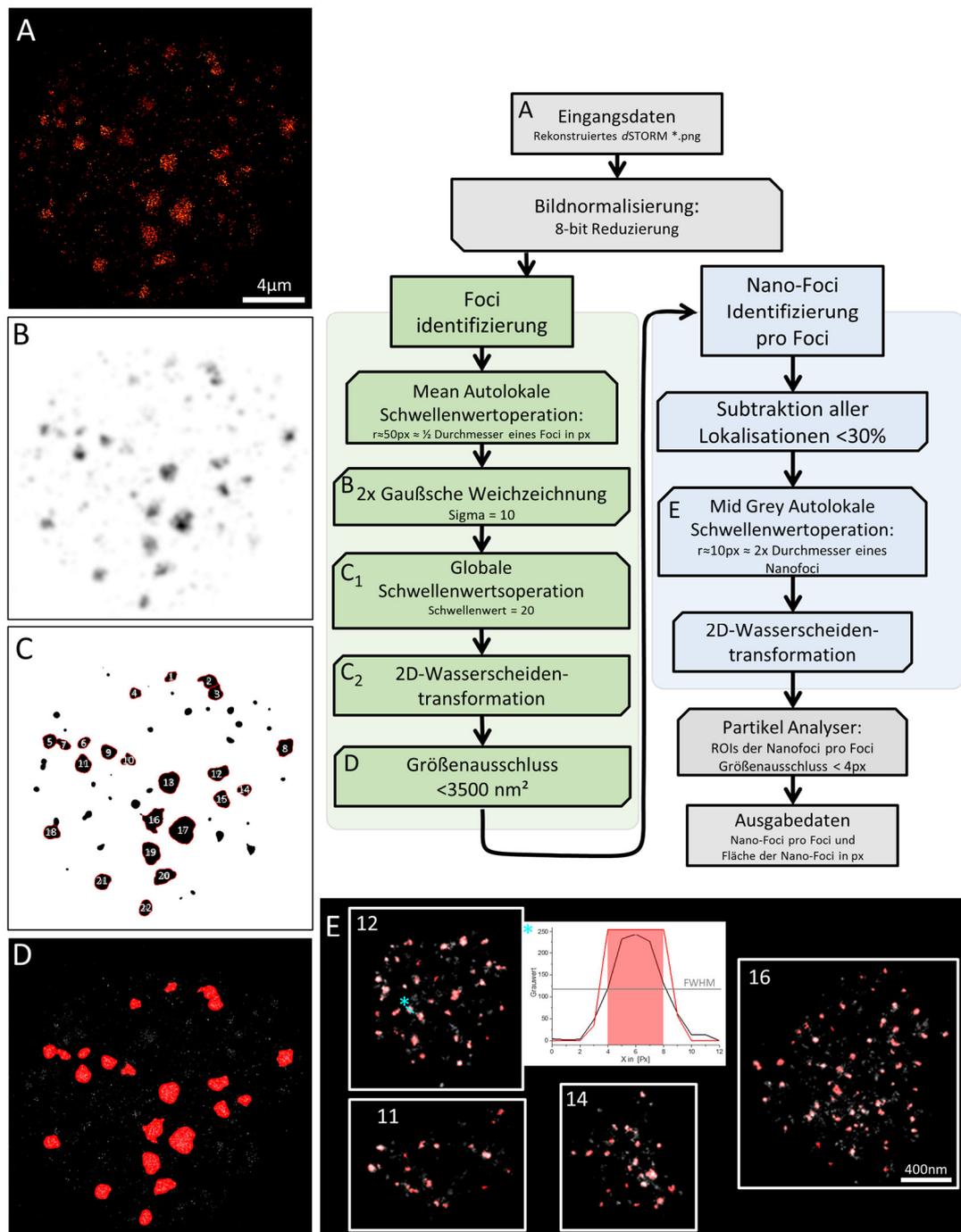


Abbildung 28: Schema der wichtigsten Schritte im Nanofocicounter für die Analyse von Nanofoci am Beispiel von γ H2AX

Als Eingangsdaten werden dSTORM-Rekonstruktionen (Panel A - *.png) verwendet und auf 8-Bit reduziert. Panel B zeigt den Beginn der Foci-Identifizierung indem der mean autolokale Schwellenwert der dSTORM-Rekonstruktion 2x weichgezeichnet wird. Durch Anlegen eines globalen Schwellenwertes (Panel C) werden die Foci erkannt, getrennt und einem Größenausschluss von <3500 nm² unterzogen. Panel D zeigt die erkannten Foci (rot) über dem Originalsignal in Grau. Die Nanofoci-Identifizierung geschieht für jeden Foci separat indem alle Lokalisationen unter 30% verworfen werden und ein autolokaler Mid-Grey-Schwellenwert angelegt wird (Panel E, rote Flächen). Die in Panel E gezeigten identifizierten Nanofoci entsprechen dem erkannten Foci 11,12,14 und 16 aus Panel C. Das Linienprofil eines zufälligen Nanofoci ist in Panel E gezeigt (in E-12 mit * markiert). Gezeigt wird das tatsächliche Signal (schwarz) als Grauwert und die binäre Maske (rot). Der Bereich über dem Schwellenwert ist als rote Fläche hervorgehoben und die volle Halbwertsbreite (FWHM) des ursprünglichen Signals durch eine graue Linie dargestellt.

Der Nanofocicounter wurde daraufhin auf einen Datensatz von DK-MG- und SNB19-Zellen, welche mit 2 Gy bestrahlt und entweder nach 30 Minuten oder 6 h fixiert wurden, angewendet. Die Probenpräparation und Aufnahme wurden von Dmitri Sisario durchgeführt und ebenfalls für die Locan basierte Auswertung in Sisario et al. [105] verwendet. Nanofoci-Durchmesser wurden, unter der Annahme von annähernd kreisförmigen Nanofoci, aus den Nanofoci-Flächen errechnet und in Abb. 29 dargestellt.

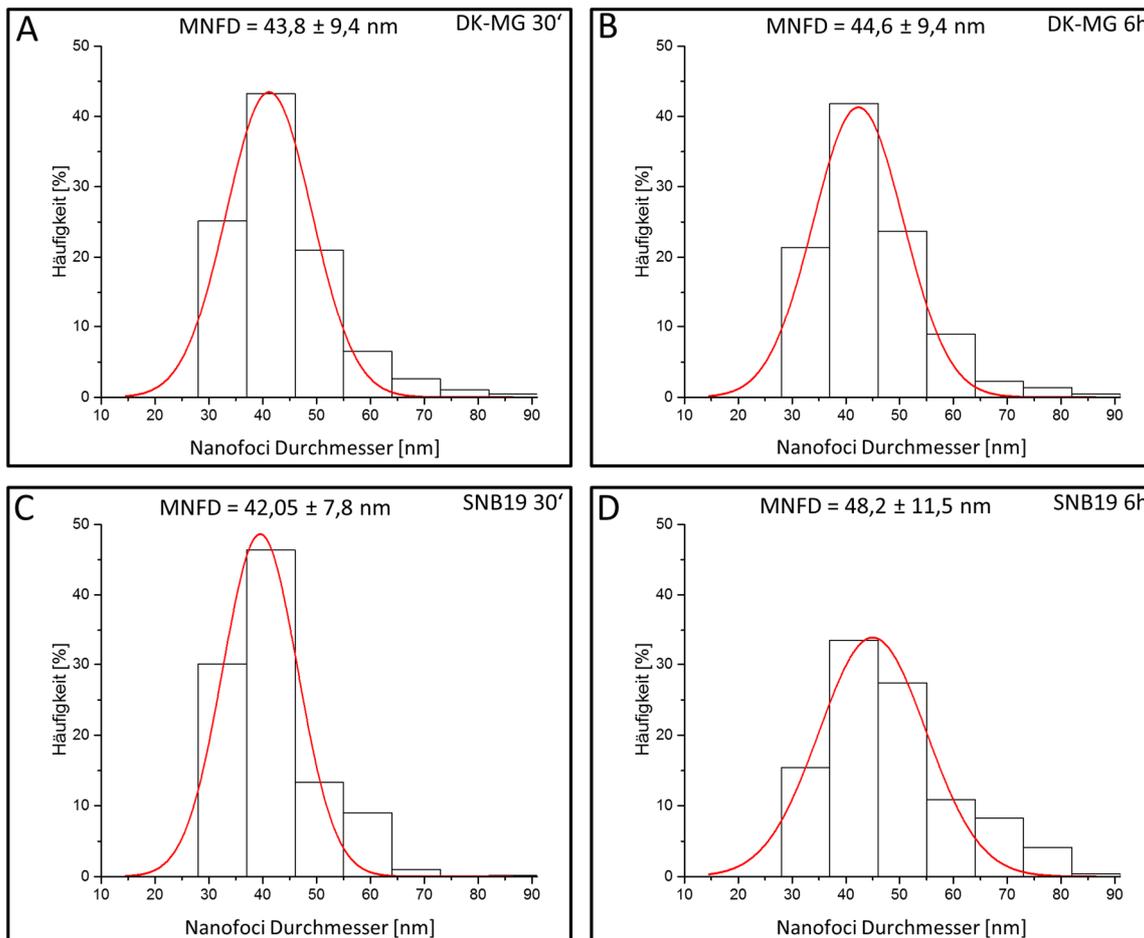


Abbildung 29: Verteilung der Nanofoci-Durchmesser von DK-MG- und SNB19-Zellen 30 min und 6 h nach Bestrahlung mit 2 Gy

Mit Hilfe des Nanofocicounters wurden aus *d*STORM-Rekonstruktionen der γ H2AX-Foci die enthaltenen Nanofoci Flächen bestimmt. Mit der Annahme von annähernd kreisförmigen Nanofoci wurde der Durchmesser errechnet. Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung [%] der Nanofoci gegen den Nanofoci-Durchmesser [nm] von DK-MG (A, B) und SNB19 (C, D) Zellen welche jeweils 30 min (A, C) oder 6 h (B, D) nach Bestrahlung fixiert und gefärbt wurden ($N \sim 40$ Foci). Die roten Linien stellen die Gaußverteilung des Datensatzes dar. Es wurde für jede Bedingung der Mittelwert der Nanofoci-Durchmesser „MNFD“ bestimmt und mit der Standardabweichung in Nanometer angegeben.

Der mittlere Nanofoci-Durchmesser (MNFD \pm SD) blieb bei DK-MG zwischen den Reparaturzeiten 30' und 6 h mit 43,8 \pm 9,4 nm und 44,6 \pm 9,4 nm nahezu unverändert. SNB19-Zellen weisen einen leichten Anstieg des MNFD von 42,05 \pm 8,1 nm bei 30' auf 48,2 \pm 11,5 nm bei 6 h nach Bestrahlung auf.

Des Weiteren wurden zusätzlich mit Hilfe des Nanofocicounters die durchschnittliche Nanofoci-Zahl pro Foci (NF/F \pm SE) ermittelt und in Abb. 30 als schraffierte Balken dargestellt. Bei DK-MG-Zellen nach 30' lag die NF/F Anzahl bei $16,51\pm 0,97$ und mit 6 h Reparaturzeit bei $20,4\pm 1,25$ NF/F. SNB19-Zellen wiesen 30' nach Bestrahlung $24,4\pm 0,61$ NF/F und nach 6 h Reparaturzeit $25,37\pm 1,53$ NF/F auf. Verglichen zu den in Sisario et al. Fig. S7A-F [105] manuell ausgezählten Daten (Abb. 30, einfarbige Balken) von $19,6\pm 0,8$ und $23,2\pm 0,9$ für DK-MG sowie $23,4\pm 1,1$ und $23,2\pm 1$ für SNB19 bei jeweils 30' und 6 h zeigt sich eine gute Übereinstimmung der manuellen und der automatischen Auszählung mit dem Nanofocicounter. Bei DK-MG-Zellen werden jedoch in beiden Reparaturzeiten bei der Nanofocicounter basierten Auszählung durchschnittlich weniger NF/F ermittelt.

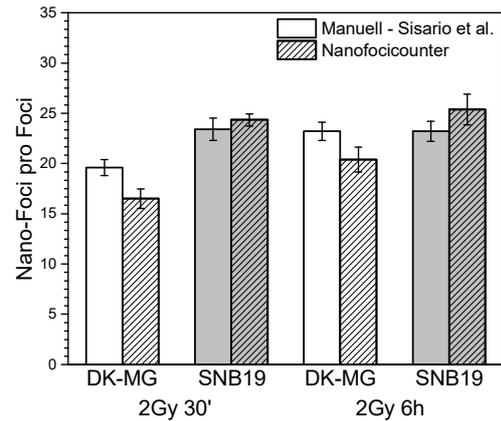


Abbildung 30: Auszählung der γ H2AX-Nanofoci pro Foci

Mit Hilfe des Nanofocicounters wurden die Nanofoci pro Foci ausgezählt (schraffierte Balken) und mit den entsprechenden manuell ausgezählten Daten aus Sisario et al. [105] (einfarbige Balken) verglichen

5. Diskussion

5.1 Untersuchung des Migrationsverhaltens und der F-Aktinstruktur der DK-MG- und SNB19-Zellen mittels modifizierter und neuer Methoden

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Effekt des dualen PI3K/mTOR Inhibitors PI-103 in Kombination mit dem Hsp90 Inhibitor AUY922 auf die Migration der Zellen getestet. Ziel war es durch Einflussnahme auf den PI3K-Pathway und der Hsp90-Klientenproteine die Migrationsfähigkeit der Glioblastomzelllinien DK-MG und SNB19 zu unterdrücken. Mit Hilfe der in dieser Arbeit neuentwickelten und modifizierten Methoden konnte ein genauerer Einblick in diese Eigenschaften der GBM gewonnen werden. Es stellte sich heraus, dass beide Zelllinien sich in ihrem Migrationsverhalten deutlich unterscheiden. DK-MG lief gerichtet mit einem polarem (vorne/hinten) Phänotypus während SNB19 sich multipolar mit mehreren Lamellipodien fortbewegte. Zudem wurde die Migration der DK-MG-Zellen durch den dualen PI-103 Inhibitor sehr effektiv unterdrückt wohingegen sich die SNB19-Zellen resistent gegen diese Behandlung zeigten. Hsp90-Inhibition resultierte jedoch in beiden Zelllinien in einer starken Inhibierung der Migration sowie in der Reorganisation des F-Aktinskelettes.

Für die Untersuchung des Migrationsverhalten in der Einzelzellumgebung, wurde eine bereits beschriebene [90] Methodik zur Einzelzellverfolgung, für die Anwendung in Phasenkontrastaufnahmen mit stark gespreiteten Zellen modifiziert. Im Vergleich zur manuellen Einzelzellverfolgung bietet dies den Vorteil, die Einzelzellverfolgung schneller und effizienter durchführen zu können. Eine erhöhte Probengröße bietet wiederum die Möglichkeit eine bessere statistische Grundlage durch eine Vervielfachung der zugrundeliegenden Datenpunkte zu erreichen [109]. Mit einer Geschwindigkeit von ~ 4.8 s pro Bild dauerte es für ein Video ~ 9 Minuten um die Zellspuren zu finden. Die Auswertung der Videos für alle Durchläufe, Bedingungen und Zelllinien (~ 220 Videos mit 18 h länge) benötigte insgesamt ~ 33 h Rechenzeit. Aufgeteilt auf das 4x gestartete TLA an einem Rechner konnte die gesamte Rechenzeit auf $\sim 8,5$ h begrenzt werden.

Neben der gesteigerten Geschwindigkeit bietet die automatische TLA-Auswertung zudem den Vorteil die benutzerabhängige Variabilität (Benutzer-Bias) weitestgehend zu vermeiden. Huth et al. [90] konnten am Beispiel der manuellen „Point&click“ Zellverfolgung [139–143] eine hohe und benutzerabhängige Variabilität feststellen. Abhängig von dieser Variabilität konnte eine Fehlkalkulationsrate von bis zu 410% ermittelt werden, welche durch die automatische TLA-Auswertung vermieden wird [90].

Obwohl beide Zelllinien sich in der Einzelzellumgebung mit einer ähnlichen Geschwindigkeit fortbewegen, wurde eine stärkere Richtungspersistenz der DK-MG-Zellen im Vergleich zu SNB19-Zellen festgestellt. Während DK-MG-Zellen eine polare Zellmorphologie mit einem Lamellipodium aufweisen demonstrieren SNB19-Zellen viele und spontan formende Lamellipodia, welche die Zelle zur multipolaren Bewegung antreiben. Zusätzlich weisen

DK-MG-Zellen Membranblebs in der Lauffront auf. Membranblebs wurden schon in vielen anderen Zelllinien, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, beschrieben [144]. In der Zellbewegung werden Membranblebs allerdings eher in der Migration von Zellen durch 3D-Gelmatrizen beobachtet und nur selten, wie hier, während der 2D-Bewegung auf einem Glassubstrat [68,144,145].

Zusätzlich wurde die Bewegung der Zellen im Zellmonolayer mittels des Wundheilungsassays untersucht, indem eine neue Zellflächen-Detektionsmethode für die automatisierte Wundheilungsassay-Auswertung entwickelt wurde. Im Gegensatz zu einer manuellen Auswertung [12,146] erlaubte diese Hochdurchsatzanalyse die Messung der Spaltschlussraten stark zu vereinfachen und zu beschleunigen. Zusätzlich konnte die Bestimmung der Wachstumsfläche/Spaltfläche für jeden einzelnen Zeitpunkt des Videos, entgegen der 3-Punktauswertung im manuellen Ansatz, durchgeführt werden [12].

Die Detektion der Lauffronten des Wundheilungsassays anhand ihrer Signaldynamik in der Praxis bisher als sehr robust erwiesen und war ohne Modifikation bei vielen und morphologisch sehr verschiedenen Zelltypen einsetzbar (Daten nicht gezeigt). Bisher war die Detektion von den statischen Signaleigenschaften zu einem Zeitpunkt (Frame) zur Erkennung der Zellfläche pro Frame abhängig [90]. Dies führte gerade zu Fehlern bei kontrastarmen Aufnahmen und war anfällig für Artefaktbildung.

Die automatische Auswertung des Wundheilungsassays zeigt in dieser Arbeit eine gute Übereinstimmung mit der manuellen Auswertung [12]. In beiden Methoden wurde eine Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit von Zellen nach Bestrahlung beobachtet. Dieser Effekt ist in der Literatur bereits beschrieben [147] und könnte mit einer Freisetzung von Exosomen durch die Zellen zusammenhängen. Dies konnte in GBM Zellen bereits von Arscott et al., 2013 [148] für die Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit verantwortlich gemacht werden.

Die markanten Unterschiede in der Richtungspersistenz und Migrationsgeschwindigkeit (Einzelzellverfolgung und Wundheilungsassay) beider Zelllinien können auf in Memmel et al. [12] beschriebene zelllinienspezifische Unterschiede im Expressionsprofil verschiedener relevanter Proteinwege zurückgeführt werden. Neben PTEN ist p53 ebenfalls entscheidend an der Kontrolle der Migration beteiligt. *p53* ist, wie *PTEN*, in den DK-MG-Zellen wildtypisch und in den SNB19-Zellen mutiert vorhanden. Allgemein geht ein p53-Funktionsverlust mit aggressiven und somit invasiven Tumoren einher [149–152]. Durch den Verlust der p53-Funktion kommt es durch die Aktivierung des PI3K Signalweges zu einer Hochregulierung der Rho GTPasen (RhoA, Cdc42 und Rac) [30]. Dies wurde durch die in Memmel et al. [12] gezeigten Rho-GTPasen-Levels in den Westernblotts zwischen den p53 wildtypischen DK-MG- und p53 mutierten SNB19-Zellen bestätigt (Appendix 7). Rho GTPasen nehmen eine zentrale Rolle in den verschiedenen Migrationsmodi, von Interaktionen mit anderen Zellen über

Amoeboid bleb getriebener, bis hin zu mesenchymal Lamellipodia getriebener Migration ein [67,84,153,154]. Insbesondere Rac und Cdc42 sind an der F-Aktinpolymerisierung in der Migrationsfront und damit der Zellpolarisierung beteiligt [145,155]. Eine Überregulierung von Rac und cdc42 in Kombination mit erhöhten Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PtdInsP₃), resultierend aus dem Verlust von *PTEN*, führt zu Einbüßen in der Zellpolarität und Ausprägung multipler Lamellipodia [73,145,156]. Des Weiteren ist die Rac vermittelte Protusion der führenden Kante gegen die RhoA/ROCK Signalübertragung vermittelte Aktomyosinretraktion der rückwärtigen Kante balanciert. Zusammen resultiert dies in einer zyklischen Balance die zu dem gleichzeitig ablaufenden Zyklus der Zellmigration beiträgt [67].

Die verbesserte zeitliche Auflösung der Hochdurchsatzanalyse der Wundheilungsassays, offenbarte einen zeitabhängigen verlangsamen Effekt der AUY922-Behandlung auf die Spaltschlussgeschwindigkeit. Dies trat sowohl einzeln als auch in Kombination mit PI-103 auf. Dieses Verhalten der SNB19-Zellen lässt sich an der, in den Phasenkontrastvideos und Aufnahmen sichtbaren, vermehrten Anzahl mitotischer Zellen festmachen. Die Zytotoxizität von AUY922 ist bereits in der Literatur beschrieben worden [157–159]. Ebenso ist bekannt, dass sowohl Apoptose als auch Mitose einen Einfluss auf die Spaltschlussrate haben kann [109,124]. In der Summe kann dies sogar bei völlig inhibierter Migration zu einer negativen Spaltschlussgeschwindigkeit über das gemessene Video führen (Abb. 14B, SNB19-Zellen unter AUY922-Behandlung mit automatischer Auswertung).

PI3K/mTOR Inhibierung wies auffallend nur bei den *PTEN/p53* wildtypischen DK-MG-Zellen einen starken inhibierenden Effekt auf die Zellmigration auf. Die DK-MG-Zellen verloren sowohl in den Wundheilungsassays als auch in der Einzelzellverfolgung (Abb. 10 & Abb. 14) praktisch ihre gesamte Migrationsfähigkeit, während die SNB19-Zellen sich in beiden Methoden unbeeindruckt von dieser Behandlung zeigten und somit keine signifikanten Änderungen der Migrationsgeschwindigkeit auftraten. Das Potential von PI-103 zur Inhibierung der Zellmigration konnte bereits von Ströbele et al. [160] anhand von zwei etablierten und drei primären Zelllinien gezeigt werden.

Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass alleinige Behandlung mit AUY922 die Migration beider Zelllinien stark unterdrücken kann [161]. Eine Hsp90 Inhibierung durch AUY922 ist somit unabhängig von dem *p53* und *PTEN* Status der Zellen. Die starke Inhibierung der Migrationsfähigkeit der Zellen scheint unter anderem von dem Rückgang der Hsp90-Klientenproteine [162] wie AKT/Raf/MEK/ERK vermittelt zu sein (Appendix 7). Die RhoA-/Rac-Aktivität wird für die Steuerung der F-Aktinstruktur in der führenden und nachziehenden Kante verantwortlich gemacht [67].

5.2 Nanometer-Struktur und zeitliche Dynamik der Doppelstrangbruch-reparatur-Foci

Im nächsten Teil dieser Arbeit wurden die DNA-Reparaturmechanismen der DK-MG- und SNB19-GBM-Zellen untersucht. Ein großes Problem in der Behandlung von GBM ist die sehr effektive und beschleunigte Reparatur von DNA-DSB [163,164]. Dies steht dem Behandlungserfolg entgegen [163,164]. Die genauen Mechanismen welche diesem Effekt zugrunde liegen bleiben bisher allerdings ungeklärt. Es wurde deshalb ein genauerer Blick auf die DSB-Reparaturkinetik in Bezug auf die Phosphorylierung von H2AX im Bereich um den DSB, den sogenannten γ H2AX-Foci, gelegt. Zusätzlich wurde die Verteilung von γ H2AX und der katalytischen Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PKcs) im Nanometerbereich untersucht. Mit Hilfe der hochauflösenden Mikroskopie-Technik *d*STORM wurde die Abhängigkeit des Beugungslimits (~ 200 nm) der beugungsbegrenzten Aufnahmen umgangen und die Reparaturfoci in bisher unerreichtem Detail dargestellt [105].

Die DSB-Reparaturkinetik von γ H2AX-Foci wurde mit Hilfe des neuentwickelten FocAn-3D-Algorithmus untersucht. Das Ziel in der Entwicklung von FocAn-3D war die Auswertung eines großen Datensatzes von 3D-Foci-Aufnahmen in akzeptabler Geschwindigkeit und möglichst ohne Benutzer-Bias. Dies erlaubt FocAn-3D die Auszählung von Foci in ganzen 3D-Nuklei und ist nicht, wie bereits beschriebene Methoden [40,97–104], auf 2D beschränkt. Die genannten 2D-Methoden sind in der Auswertung auf einen Schnitt durch den Nukleus beschränkt und können die Fociverteilung im ganzen Nukleus nicht verarbeiten. Es ist daher notwendig jeden der Nuklei in der respektiven Midsektion aufzunehmen. Dies führt bei unterschiedlich positionierten oder unterschiedlich großen Nuklei zu Problemen. FocAn-3D umgeht dieses Problem indem die gesamten Nuklei in 3D analysiert werden.

Zusätzlich besitzt FocAn-3D die Fähigkeit anhand des Hintergrundsignals der γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung Zellkerne automatisch in den Aufnahmen zu lokalisieren und die Foci entsprechend zuzuordnen. Bisher wurde für die Lokalisierung der Zellkerne eine zusätzliche Färbung benötigt [40,97–100,102–104]. Der zusätzliche Färbeschritt ist allerdings zum einen ein Kosten bzw. ein Zeitfaktor und zum anderen blockiert er andernfalls verfügbare Spektralbereiche. Für mehrfarbige Aufnahmen besitzt FocAn-3D die Möglichkeit in Bildhyperstacks (x, y, z, c) den Farbkanal (c) mit der γ H2AX Färbung für die Analyse anzugeben (Abb. 20C). Es ist somit keine Konvertierung der Daten oder Trennung der Farbkanäle für die Untersuchung von mehrfarbigen Bildern nötig.

Eine steigende Focidichte im Nukleus kann in den Aufnahmen zu Foci mit überlappendem Immunfluoreszenzsignal (cLSM) führen. Insbesondere der axiale Überlapp, welcher aufgrund der schlechteren axialen Auflösung mehr als doppelt so häufig auftritt, führt unberücksichtigt automatisch zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Focizahl. 2D-Methoden nutzen daher 2D-WST-Methoden, um angenäherte oder überlappende Foci trennen zu können [40,97–

100,102–104]. Im Vergleich mit 2D beschränkten Algorithmen kann FocAn-3D auf das volle Potential der 3D-Information der Bilder zurückgreifen. Dies erlaubt zusätzlich die Verwendung von einer Markerbasierten 3D-WST. Diese Methode ist nicht nur sensitiver für die Trennung von lateral überlappenden Foci, sondern auch in der Lage die häufiger vorkommenden axial überlappenden Foci, oder genauer die Kombination der beiden, effektiv und akkurat voneinander zu trennen [131,165].

Die zuverlässige Erkennung der γ H2AX-Foci mit FocAn-3D konnte durch den Abgleich von mit 2D/3D manueller Auszählung sowie den Abgleich mit FoCo [40] bestätigt werden (Abb. 24). FoCo ist ein bereits publiziertes [40] und etabliertes Programm für die Auszählung von Foci in 2D. Im Vergleich der vollen 3D-Datensätze konnte jedoch eine relative Differenz von $\sim 14\%$ zugunsten FocAn-3D nachgewiesen werden. Dieser Effekt lässt sich im Grunde mit zwei Hypothesen erklären. Zum einen könnte eine Überfragmentierung, besonders bei großen oder langgezogenen Foci, durch den 3D-WST vorliegen. Überfragmentieren im Allgemeinen ist ein bereits beschriebenes Problem von WST und kann auch bei 3D-WST mit falschen Maxima- oder Trennungsparemtern auftreten [132]. Die Überfragmentierung hätte zur Folge, dass einzelne Foci mehrfach erkannt werden. Dieser Effekt würde insbesondere mit steigender Focizahl und vielen großen überlappenden Foci zunehmen. Dies würde die steigende Abweichung im oberen Bereich erklären. Die zweite Möglichkeit ist eine Unterschätzung der Foci in der manuellen Auswertung, bedingt durch die erhöhte Anzahl an überschneidenden Foci in 3D-Aufnahmen mit hoher Focizahl pro Nukleus.

Infolge der gleichmäßigen Phosphorylierung von γ H2AX im Bereich von 2 Mbp bis 30 Mbp um eine DSB-Läsion ist eine kugelförmige γ H2AX-Focistruktur in 3D-cLSM-Aufnahmen zu erwarten [44]. Bedingt durch das lateral ($X/Y = \sim 180$ nm) gegen axial ($Z = \sim 500$ nm) begrenzte Auflösungsverhältnis des cLSM von etwa 1:2,7 [128], müssten sich die kugelförmigen γ H2AX-Foci als axial elongierte Ellipsoide darstellen. Es wurden allerdings auch γ H2AX-Foci mit einem Seitenverhältnis von bis zu 1:5,7 gefunden. Dies steht im Widerspruch zu dem Verhältnis (axial gegen lateral) für kugelförmige Foci (1:2,7). Die schlauchförmigen Foci traten ausschließlich entlang der Strahlungsrichtung des Linearbeschleunigers und damit in der axialen (Z) cLSM-Ebene elongiert auf. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich hierbei nicht nur um eine einzelne DSB-Läsion, sondern um eine Kaskade von Läsionen mit unbekannter Anzahl entlang der Strahlungsachse der Röntgenstrahlung handelt. Dies würde wiederum dem postulierten 1:1 Verhältnis der γ H2AX-Foci zu den tatsächlichen DSB Läsionen, welche in Fluoreszenzaufnahmen nur in 2D-Bildern untersucht werden, entgegensprechen [55].

Entgegen dieser Vermutung können, nach der 90° Drehung der Probenkammer, entlang der lateralen Y-Achse in den cLSM Aufnahmen keine Focischläuche entlang der Strahlungsachse (Y-Achse) aufgefunden werden (Abb. 19). Es treten wieder elongierte γ H2AX-Foci-Schläuche entlang der axialen cLSM-Z-Achse auf, welche somit orthogonal zur Strahlungsachse liegen. Es muss sich daher hier um auflösungsbedingte Überlappungen des Fluoreszenzsignals

handeln. Da die Auflösung des cLSM in Z entsprechend um das $\sim 2,7$ -fache schlechter ist, treten diese Überlappungen mit höherer Wahrscheinlichkeit in der axialen Ebene auf, sind allerdings bei steigender Focizahl auch in den lateralen Ebenen X/Y zu erwarten. Die axiale Länge der Focischläuche entsprach relativ genau der Länge von zwei γ H2AX-Ellipsoiden. Zusammengefasst legt dies eine axiale Signalüberlappung, bedingt durch die schlechtere axiale Auflösung des cLSMs, von zwei separaten DSB Läsionen nahe. Für die Entwicklung der Focianalysesoftware FocAn-3D und die quantitative Auswertung der Foci in 3D wurde dieser Effekt entsprechend berücksichtigt.

Die Aufnahmen zeigen zudem, dass große und langgezogene bzw. schlauchförmige einzelne Foci zu keiner Überfragmentierung durch die WST Aufteilung unterliegen (Abb. 21F). Daraus folgend lässt sich die, mit erhöhter Focizahl pro Nukleus steigende, Diskrepanz der 3D Auswertung (Abb. 24) auf die Schwierigkeit der akkuraten Separation von überlappenden Foci unter manueller Begutachtung und Auszählung zurückführen.

Ein typisches Problem bei der quantitativen Auswertung von Fluoreszenzbildern ist das Photobleichen der Farbstoffe, insbesondere für 3D-Aufnahmen mit einem großen axialen Z-Bereich [166,167]. Der Saturierungsschwellenwert driftet in zeitlich später aufgenommenen Z-Schnitten eines Z-Stapels unweigerlich zu geringeren Intensitäten. FocAn-3D ist in der Lage eine Schnitt für Schnitt Bildnormalisierung in Kombination mit den beschriebenen lokalen Auto-Schwellenwerten durchzuführen. Dies wird verwendet um die Saturierungsschwellenwerte anzugleichen, was Mess-Artefakten durch das Photobleichen entgegenwirkt.

Ein weiterer Vorteil von FocAn-3D ist die Benutzerfreundlichkeit bedingt durch eine geringe Parametrisierung in der Eingabeaufforderung. Es werden keine arbiträren Konstanten, wie unabhängige Schwellenwerte oder morphologische Parameter, vom Anwender abgefragt. Im Gegenteil, FocAn-3D benötigt ausschließlich vom Benutzer messbare Größen um die Parameter für die ablaufenden Operationen intern zu berechnen. Dies beinhaltet Parameter wie die Pixelgröße der Bilder oder Durchschnittswerte der Foci- und Nukleusdurchmesser. Durch diese Herangehensweise wird eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit erreicht, indem der subjektive Einfluss des Benutzers (Benutzer-Bias) auf die Auswertung der Daten verringert wird [90].

Zusätzlich besteht die Option die internen Parameter von FocAn-3D weiter zu modifizieren. Dies wird in dem „Advanced Setup“ ermöglicht (Abb. 20B) und erlaubt z.B. die Schwellenwerte Konstante c (Gleichung 12-14), zu modifizieren. Ebenso können dort andere Rauschunterdrückungsmethoden und eine zusätzliche Weichzeichnung aktiviert werden. Es lassen sich hier auch die Grundeinstellung des 3D Maximafinders und der 3D-WST ändern. Ziel des „Advanced Setup“ ist es die Möglichkeit zu eröffnen andere clusterformende Proteine der DNA-Reparaturmaschinerie auszuwerten. Diese Einstellungen eröffnen zusätzlich die

Möglichkeit sehr verrauschte Proben, z.B. bedingt durch Ansätze mit mehreren Farben oder suboptimalen Antikörpern, untersuchen zu können.

FocAn-3D wurde auf ein Zeitpanel (0-24 h) von DK-MG- und SNB19-Zellen nach Bestrahlung angewendet um Unterschiede in der γ H2AX Kinetik sichtbar zu machen. In Abb. 25 ist der Unterschied in der Reparaturkinetik zwischen DK-MG- und SNB19-Zellen zu erkennen. SNB19 weist sowohl eine schnellere Induktion als auch einen schnelleren Abbau der γ H2AX-Foci im Vergleich zu der langsameren Kinetik bei DK-MG auf.

Besonders Eindrucksvoll ist hier jedoch die Probengröße dieses Versuchs. Da jeder Punkt im Graphen ca. 80 Zellen entspricht wurden insgesamt ca. 640 Zellen pro Zelllinie bei \sim 4-5 Zellen pro Aufnahme mit je \sim 60 einzelnen Bildschnitten ausgewertet. Dies entspricht insgesamt in etwa \sim 8530 einzelnen Bildern. Eine manuelle Auszählung in diesem Umfang wäre praktisch nicht möglich. FocAn-3D benötigt für dieses Probenvolumen ca. \sim 18 h Rechenzeit an einem Mittelklasserechner (Beschrieben in 6.3. Hardwarevoraussetzungen).

Um die Struktur/Verteilung von γ H2AX und pDNA-PKcs im Nanometerbereich untersuchen zu können, wurden *d*STORM Aufnahmen dieser Proteine bei DK-MG- und SNB19-Zellen angefertigt. γ H2AX-Foci wiesen hier eine inhomogene Verteilung von Subclustern (Nanofoci) auf (Abb. 27A, D). Um diese Nanofoci genauer zu untersuchen, wurde ein Programm (Nanofocicounter – Schematisch in Abb. 28 dargestellt) zur Auszählung und Vermessung der Nanofoci pro Foci in *d*STORM-Bildern entwickelt. Im Vergleich, der in Sisario et al. [105] manuell ermittelten Nanofocizahlen mit der automatischen Zählung des Nanofocicounter, lagen die NF/F ca. 20% höher. Unter Begutachtung der für die Foci-Identifizierung mit dem Nanofocicounter erzeugten ROI's und dem Figure S7 aus der Publikation Sisario et al. [105] ist zu vermuten, dass die automatische Auswertung sich sensibler für kleinere Foci mit NF/F Zahlen <10 zeigt. Dies erklärt warum die automatische Auszählung niedriger ausfiel. SNB19-Zellen zeigen hingegen auch in der manuellen Auszählung in der Regel mehr als 10 NF/F auf, weshalb sich beide Auszählungsmethoden hier angleichen. Vermutlich liegt die höhere NF/F Zahl an der schnelleren γ H2AX-Foci-Induktion, welche in der Auswertung mit Focan-3D (Abb. 25) gezeigt werden konnte.

Mit Hilfe des Nanofocicounter konnte in dieser Arbeit ein mittlerer Nanofocidurchmesser (MNFD) (Abb. 29) von \sim 42-48 nm ermittelt werden was den in Sisario et al. [105] ermittelten Werten (\sim 45 nm) entspricht und diese somit bestätigt. Zieht man nun die Lokalisationsgenauigkeit von *d*STORM bei 12 nm in Kombination mit der Größe der verwendeten Antikörperkombination (primär und sekundär) mit ca. 15 nm in Betracht, so kann bei einem MNFD von \sim 44 nm in etwa auf die Größe eines Histons mit \sim 10 nm extrapoliert werden. Dies lässt damit den Schluss zu, dass die sichtbaren Nanofoci in den *d*STORM-Aufnahmen genau einem γ H2AX-Histon entsprechen.

Ein weiteres Indiz für diese Aussage ist die inhomogene Clusterverteilung der Nanofoci im Foci. In eukaryotischen Zellen liegen nur ca. ~10% der H2A Histone als H2AX vor [44,54]. In Sisario&Mommel et al. [105] konnte anhand einer nächsten Nachbarklassifikation gezeigt werden, dass die γ H2AX Nanofoci einen Abstand von ~100 nm aufweisen. Zieht man den ermittelten Abstand von Histon zu Histon bei eukaryotischen Zellen von ~11nm in Betracht, kann wieder das postulierte Verhältnis der H2AX zu H2A Histonen von 10% bestimmen werden [54,105].

Um die Interaktion von DNA-PKcs und γ H2AX genau zu untersuchen, wurden doppelt immunfluoreszent gefärbte Proben am cLSM untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass DNA-PKcs und γ H2AX eine eindeutige Kontralokalisation aufweist (Abb. 26A, C). Stellen im Nukleus an denen γ H2AX-Foci auftauchen, gehen deshalb mit einem Rückgang von DNA-PKcs einher. Bisherige Untersuchungen weisen allerdings auf eine abhängige Beziehung zwischen DNA-PKcs und γ H2AX hin [57,59,60]. Es ist bereits bekannt, dass DNA-PK in dem c-NHEJ mit der regulierenden DNA Bindungsuntereinheit KU interagiert somit den Zugang zur Bruchstelle reguliert. Die Regulierung von und durch DNA-PK geschieht vordergründlich durch die Phosphorylierung von DNA-PKcs an einer von bisher über ~60 bekannten Phosphorylierungsstellen [49,56,57,168–171]. Man unterscheidet hier besonders den PQR Cluster (aa2023-2056) und den ABCDE Cluster (aa2609-2647) [57]. Durch Blockierung der Phosphorylierung im ABCDE Cluster wird eine Konformationsänderung verhindert welche für die Verarbeitung der Bruchenden wichtig ist. Es wird folglich ein dominant negativer Effekt bezüglich der DNA-DSB-Reparatur erzielt [47,57]. Wird die Phosphorylierung im PQR Cluster geblockt, besonders an S2056 und dem 2609 Cluster, wird eine Konformationsänderung von DNA-PK verhindert. Diese Konfirmationsänderung ist verantwortlich für die Öffnung des Proteinkomplexes um anderen NHEJ Faktoren Zugang an die Bruchstelle zu ermöglichen [172]. Es ist somit nicht auszuschließen, dass durch die hier beschriebenen Konformationsänderungen während der Interaktion mit der DSB-Stelle und Interaktionen mit anderen Reparaturfaktoren die Bindungstasche aa2790-3065 des verwendeten DNA-PKcs Antikörpers blockiert wird. Dies würde wiederum zu der sichtbaren Kontralokalisation zwischen γ H2AX und DNA-PKcs führen.

Im nächsten Schritt wurde daher die Phosphorylierungsstelle Serin2065 von DNA-PKcs immunfluoreszent markiert. Serin2065 liegt im PQR Cluster von DNA-PKcs und ist für den Zugang andere NHEJ spezifischer Reparaturproteine verantwortlich. Es kommt zu der erwarteten Kolokalisation, in der jeder pDNA-PKcs Foci einen korrespondierenden γ H2AX-Foci besitzt. Es besitzt allerdings nicht jeder γ H2AX-Foci einen entsprechenden pDNA-PKcs Foci, insbesondere wenn verschiedene Reparaturzeiten betrachtet werden [105]. Dies kann zum einen an gering phosphorylierten γ H2AX-Foci liegen, welche nicht nur durch DSB, sondern auch durch andere DNA-Läsionen entstehen können [173]. Zudem kann DNA-PK zwar im Bereich der DNA Läsion gebunden sein, allerdings die Phosphorylierung an

S2065 und somit Öffnung der Bruchstelle noch nicht stattgefunden haben [174]. Des Weiteren ist bekannt, dass DNA-PK bevorzugt an DSB Bruchstellen mit hoher Komplexität, d.h. Brücke mit überhängender einzelsträngiger DNA in Variablen Längen und oxidierte Basenmodifikationen oder abasische Bereichen direkt vorgelagert zur DSB Läsion, vorkommt [53]. Komplexere DSB Läsionen wiederum werden im Vergleich zu einfachen DSB Läsionen langsamer abgebaut und so ist anzunehmen, dass sie sich mit erhöhter Reparaturzeit in der Zelle anreichern. Dies führt wiederum zu einer Anreicherung von Reparaturprotein [175] was die zunehmende Durchschnittsgröße sowohl der γ H2AX als auch der pDNA-PKcs Foci sowohl in cLSM Aufnahmen als auch in *d*STORM Aufnahmen erklärt [105].

In *d*STORM Aufnahmen Abb. 27B, E zeigt sich pDNA-PKcs, im Gegensatz zu γ H2AX, nicht als eine in Nanofoci organisierte Struktur, sondern eher als diffuses Signal, welches in irregulären Strukturen über die Fläche des Foci verteilt ist. Die Phosphorylierung von pDNA-PKcs an Serin 2056 ist nicht nur während der Reparatur, sondern auch noch nach der Dissoziation von DNA-PK vorhanden. Dies bedeutet, im Bereich der Läsion ist ein dynamischer Austausch von gebundenem und freiem DNA-PK vorhanden [176]. Das ungebundene pDNA-PKcs ist somit zufällig in Läsionsnähe verteilt und formt Signalwolken ohne Nanofoci-Clusterung, welche in den *d*STORM Aufnahmen sichtbar sind. Dies konnte auch in den RipleyK Analysen von Dmitri Sisario in Sisario et al. [105] gezeigt werden. Aufgrund des Fehlens einer definierten Substruktur, genauer der Nanofoci, konnte der Nanofocicounter für DNA-PK nicht angewendet werden.

6. Schlussfolgerung

Diese Arbeit zeigt die Vorteile und die Effektivität von automatisierter Mustererkennung für die Untersuchung der Zellmigration. Die modifizierten Einzelzellverfolgungs- und Wundheilungsassayalgorithmen waren in der Lage schnell und vollautomatisch die Zellen bzw. Zellfronten in jedem Frame eines Videos zu lokalisieren und deren Geschwindigkeiten zu bestimmen. Durch Anwendung dieser automatischen Methoden konnte somit der Benutzer-Bias weitestgehend vermieden und der Versuchsaufbau, bei geringerem zeitlichem Aufwand, erweitert werden. Beide Methoden ermöglichten, aufgrund ihrer guten zeitlichen Auflösung, eine Untersuchung der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeiten jedes Zeitpunktes über den gesamten Verlauf der Aufnahmen. Bisher wurde, insbesondere beim Wundheilungsassay, nur die Durchschnittsgeschwindigkeit über das gesamte Video ermittelt. Die neu entwickelte und auf die Signaldynamik der Zellen basierte Zellflächenerkennung des Wundheilungsassayalgorithmus, stellte sich zudem als besonders robust gegenüber Zellfragmenten und anderen Artefakten in den Videoaufnahmen heraus.

Mit Hilfe dieser automatischen Methoden konnte die duale PI3K/mTOR Inhibition als vielversprechender Ansatz zur Unterdrückung der Bewegung von GBM-Zellen bestätigt werden. Selbst bei fehlender Zellantwort auf die PI3K/mTOR Inhibierung konnte eine Inhibierung von Hsp90 die gewünschte Suppression der Zellmigration erreichen. Eine kombinatorische Behandlung mit PI3K/mTOR- und Hsp90-Inhibitoren stellt sich daher als aussichtsreiche therapeutische Strategie dar.

Neben der Entwicklung von Algorithmen zur Untersuchung der Zellbewegung konnte in dieser Arbeit des Weiteren ein Algorithmus für die Analyse von γ H2AX-Foci in 3D-Bildern entwickelt werden. Das entwickelte ImageJ Plugin FocAn-3D, stellte sich als schnelles und effizientes Werkzeug heraus. Es bietet eine nahezu benutzerunabhängige Analyse der Bilder an und ist in der Lage die Nuklei bereits anhand der Foci-Färbung zu erkennen. Es besitzt zusätzlich die Fähigkeit, aufgrund der 3D-Bildinformation, überlappende Nuklei und Foci mit hoher Genauigkeit zu trennen. Schnitt für Schnitt Bildnormalisation in Kombination mit lokalen Schwellenwertalgorithmen ermöglicht es Schwankungen im Signal auszugleichen. Die automatische Dateistapelverarbeitung, in Kombination mit der relativ geringen Rechenzeit, erlaubt zudem die Hochdurchsatzanalyse von vielen (>100) 3D-Bildstapeln an einem Tag. Die Reparaturkinetik bezogen auf die γ H2AX-Fociinduktion und -abbau der DK-MG- und SNB19-Zellen konnte mit FocAn-3D detailliert dargestellt werden. Ich komme somit zu dem Schluss, dass das benutzerfreundliche FocAn-3D-ImageJ-Plugin in der Lage ist eine zuverlässige und robuste Quantifizierung der Foci zu ermöglichen.

Zusätzlich zu der Quantifizierung der γ H2AX-Foci konnte die beugungsunbegrenzte Auflösung der dSTORM-Aufnahmen die Untersuchung der feinen Foci-Strukturen deutlich unter 100 nm ermöglichen. Solch detaillierten Einsichten in die Organisation der DSB-

Reparaturkomplexe sind besonders wichtig, sowohl für die Grundlagenforschung als auch die Radioonkologie, in welcher DNA-DSBs die treibende Kraft hinter der Zerstörung der Tumorzellen durch ionisierende Strahlung darstellen. Es ist daher von besonderem Interesse die feine lokale Struktur und die Interaktionen der Proteine, welche an der DNA Reparatur beteiligt sind, detailliert darzustellen. Die in dieser Arbeit erstellten Aufnahmen und statistischen Analysemethoden für die γ H2AX- und pDNA-PK-Verteilung stellen hierbei nur den ersten Schritt dar. Es ist folglich nötig weitere, insbesondere beugungsunbegrenzte, mehrfarbige Kollokalisationsversuche mit weiteren Reparaturproteinen wie KU70, KU80, Rad51 oder MRN durchzuführen, um deren genauere Interaktion besser zu verstehen. Dies verfolgt das Ziel neue Strategien zu entwickeln, um die hocheffiziente DNA-Reparatur möglichst spezifisch in den Tumorzellen zu stören und die Effektivität der Radiotherapie noch weiter zu verbessern.

Literatur

- [1] WHO | The data repository, WHO. (n.d.). <http://www.who.int/gho/database/en/> (Stand: December 3, 2018).
- [2] Was sind nichtübertragbare Krankheiten?, (2019). <http://www.euro.who.int/de/health-topics/noncommunicable-diseases/ncd-background-information/what-are-noncommunicable-diseases> (Stand: January 31, 2019).
- [3] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA. Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- [4] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, C. Fitzmaurice, et al., Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study, *JAMA Oncol.* 3 (2017) 524. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688.
- [5] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell.* 144 (2011) 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [6] L. Römer, C. Klein, A. Dehner, H. Kessler, J. Buchner, p53 – ein natürlicher Krebskiller: Einsichten in die Struktur und Therapiekonzepte, *Angew. Chem.* 118 (2006) 6590–6611. doi:10.1002/ange.200600611.
- [7] L. Ouyang, Z. Shi, S. Zhao, F.-T. Wang, T.-T. Zhou, B. Liu, J.-K. Bao, Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Prolif.* 45 (2012) 487–498. doi:10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.
- [8] N. Nishida, H. Yano, T. Nishida, T. Kamura, M. Kojiro, Angiogenesis in Cancer, *Vasc. Health Risk Manag.* 2 (2006) 213–219.
- [9] T.N. Seyfried, L.C. Huysentruyt, On the Origin of Cancer Metastasis, *Crit. Rev. Oncog.* 18 (2013) 43–73.
- [10] X. Han, X. Xue, H. Zhou, G. Zhang, A molecular view of the radioresistance of gliomas, *Oncotarget.* 8 (2017) 100931–100941. doi:10.18632/oncotarget.21753.
- [11] C. Alifieris, D.T. Trafalis, Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment, *Pharmacol. Ther.* 152 (2015) 63–82. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.005.
- [12] S. Memmel, D. Sisario, C. Zöllner, V. Fiedler, A. Katzer, R. Heiden, N. Becker, L. Eing, F.L.R. Ferreira, H. Zimmermann, M. Sauer, M. Flentje, V.L. Sukhorukov, C.S. Djuzenova, S. Memmel, D. Sisario, C. Zöllner, V. Fiedler, A. Katzer, R. Heiden, N. Becker, L. Eing, F.L.R. Ferreira, H. Zimmermann, M. Sauer, M. Flentje, V.L. Sukhorukov, C.S. Djuzenova, Migration pattern, actin cytoskeleton organization and response to PI3K-, mTOR-, and Hsp90-inhibition of glioblastoma cells with different invasive capacities, *Oncotarget.* 8 (2017) 45298–45310. doi:10.18632/oncotarget.16847.
- [13] R. Stupp, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J.B. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, R.O. Mirimanoff, Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 987–996. doi:10.1056/NEJMoa043330.
- [14] D.M. Trifiletti, C. Alonso, S. Grover, C.E. Fadul, J.P. Sheehan, T.N. Showalter, Prognostic Implications of Extent of Resection in Glioblastoma: Analysis from a Large Database, *World Neurosurg.* 103 (2017) 330–340. doi:10.1016/j.wneu.2017.04.035.
- [15] K. Kelley, J. Knisely, M. Symons, R. Ruggieri, Radioresistance of Brain Tumors, *Cancers.* 8 (2016). doi:10.3390/cancers8040042.
- [16] T.A. Ulrich, E.M. de Juan Pardo, S. Kumar, The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells, *Cancer Res.* 69 (2009) 4167–4174. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4859.

- [17] M. Robert, M. Wastie, Glioblastoma multiforme: a rare manifestation of extensive liver and bone metastases, *Biomed. Imaging Interv. J.* 4 (2008). doi:10.2349/bij.4.1.e3.
- [18] E.A. Maher, F.B. Furnari, R.M. Bachoo, D.H. Rowitch, D.N. Louis, W.K. Cavenee, R.A. DePinho, Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter, *Genes Dev.* 15 (2001) 1311–1333. doi:10.1101/gad.891601.
- [19] L.D. Lunsford, D. Kondziolka, Adverse long-term effects of brain radiotherapy in adult low-grade glioma patients, *Neurology.* 57 (2001) 2150–2151. doi:10.1212/WNL.57.11.2150-a.
- [20] The Cancer Genome Atlas Research Network, Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways, *Nature.* 455 (2008) 1061–1068. doi:10.1038/nature07385.
- [21] M. Tamura, J. Gu, K. Matsumoto, S. Aota, R. Parsons, K.M. Yamada, Inhibition of Cell Migration, Spreading, and Focal Adhesions by Tumor Suppressor PTEN, *Science.* 280 (1998) 1614–1617. doi:10.1126/science.280.5369.1614.
- [22] S. Zhang, D. Yu, PI(3)King Apart PTEN's Role in Cancer, *Clin. Cancer Res.* 16 (2010) 4325–4330. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2990.
- [23] P.L. Sulkowski, S.E. Scanlon, S. Oeck, P.M. Glazer, PTEN Regulates Nonhomologous End Joining By Epigenetic Induction of NHEJ1/XLF, *Mol. Cancer Res. MCR.* 16 (2018) 1241–1254. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0581.
- [24] H. Zhou, S. Huang, Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis, *Curr. Protein Pept. Sci.* 12 (2011) 30–42.
- [25] F. Kruiswijk, C.F. Labuschagne, K.H. Vousden, p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16 (2015) 393–405. doi:10.1038/nrm4007.
- [26] S. Martin, H. Janouskova, M. Dontenwill, Integrins and p53 pathways in glioblastoma resistance to temozolomide, *Front. Oncol.* 2 (2012) 157. doi:10.3389/fonc.2012.00157.
- [27] P.A.J. Muller, K.H. Vousden, J.C. Norman, p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion, *J. Cell Biol.* 192 (2011) 209–218. doi:10.1083/jcb.201009059.
- [28] A.S. Mak, p53 in cell invasion, podosomes, and invadopodia, *Cell Adhes. Migr.* 8 (2014) 205–214.
- [29] G. Gadea, L. Roger, C. Anguille, M. de Toledo, V. Gire, P. Roux, TNF α induces sequential activation of Cdc42- and p38/p53-dependent pathways that antagonistically regulate filopodia formation, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 6355–6364. doi:10.1242/jcs.01566.
- [30] L. Roger, G. Gadea, P. Roux, Control of cell migration: a tumour suppressor function for p53?, *Biol. Cell.* 98 (2006) 141–152. doi:10.1042/BC20050058.
- [31] C. Sawyers, Targeted cancer therapy, *Nature.* 432 (2004) 294–297. doi:10.1038/nature03095.
- [32] F. Meric-Bernstam, G.B. Mills, Overcoming implementation challenges of personalized cancer therapy, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9 (2012) 542–548. doi:10.1038/nrclinonc.2012.127.
- [33] Krebs behandeln, (n.d.). <https://www.krebsinformationsdienst.de/behandlung/index.php> (Stand: December 11, 2018).
- [34] M.E. Lomax, L.K. Folkes, P. O'Neill, Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy, *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* 25 (2013) 578–585. doi:10.1016/j.clon.2013.06.007.
- [35] M. Arkin, Protein–protein interactions and cancer: small molecules going in for the kill, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9 (2005) 317–324. doi:10.1016/j.cbpa.2005.03.001.
- [36] A. Pompos, M. Durante, H. Choy, Heavy Ions in Cancer Therapy, *JAMA Oncol.* 2 (2016) 1539–1540. doi:10.1001/jamaoncol.2016.2646.
- [37] J.S. Loeffler, M. Durante, Charged particle therapy--optimization, challenges and future directions, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10 (2013) 411–424. doi:10.1038/nrclinonc.2013.79.

- [38] T. Mitin, A.L. Zietman, Promise and pitfalls of heavy-particle therapy, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32 (2014) 2855–2863. doi:10.1200/JCO.2014.55.1945.
- [39] M.K. Bucci, A. Bevan, M. Roach, Advances in Radiation Therapy: Conventional to 3D, to IMRT, to 4D, and Beyond, *CA. Cancer J. Clin.* 55 (2009) 117–134. doi:10.3322/canjclin.55.2.117.
- [40] A. Lapytsko, G. Kollarovic, L. Ivanova, M. Studencka, J. Schaber, FoCo: a simple and robust quantification algorithm of nuclear foci, *BMC Bioinformatics.* 16 (2015) 392. doi:10.1186/s12859-015-0816-5.
- [41] A. Kinner, W. Wu, C. Staudt, G. Iliakis, γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 5678–5694. doi:10.1093/nar/gkn550.
- [42] P.A. Jeggo, M. Löbrich, DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact?, *Oncogene.* (2007). doi:10.1038/sj.onc.1210868.
- [43] R. Baskar, J. Dai, N. Wenlong, R. Yeo, K.-W. Yeoh, Biological response of cancer cells to radiation treatment, *Front. Mol. Biosci.* 1 (2014). doi:10.3389/fmolb.2014.00024.
- [44] E.P. Rogakou, D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, W.M. Bonner, DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5858–5868. doi:10.1074/jbc.273.10.5858.
- [45] H. Lans, J.A. Martejijn, W. Vermeulen, ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response, *Epigenetics Chromatin.* 5 (2012) 4. doi:10.1186/1756-8935-5-4.
- [46] A. Ciccia, S.J. Elledge, The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives, *Mol. Cell.* 40 (2010) 179–204. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.019.
- [47] J.A. Neal, S. Sugiman-Marangos, P. VanderVere-Carozza, M. Wagner, J. Turchi, S.P. Lees-Miller, M.S. Junop, K. Meek, Unraveling the complexities of DNA-PK autophosphorylation., *Mol. Cell. Biol.* (2014) MCB.01554-13. doi:10.1128/MCB.01554-13.
- [48] M.M. Vilenchik, A.G. Knudson, Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 12871–12876. doi:10.1073/pnas.2135498100.
- [49] D.W. Chan, B.P.-C. Chen, S. Prithivirajasingh, A. Kurimasa, M.D. Story, J. Qin, D.J. Chen, Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks, *Genes Dev.* 16 (2002) 2333–2338. doi:10.1101/gad.1015202.
- [50] R.S. Williams, J.S. Williams, J.A. Tainer, Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template, *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 85 (2007) 509–520. doi:10.1139/O07-069.
- [51] J. Yuan, R. Adamski, J. Chen, Focus on Histone variant H2AX: to be or not to be, *FEBS Lett.* 584 (2010) 3717–3724. doi:10.1016/j.febslet.2010.05.021.
- [52] D.J. Richard, K. Savage, E. Bolderson, L. Cubeddu, S. So, M. Ghita, D.J. Chen, M.F. White, K. Richard, K.M. Prise, G. Schettino, K.K. Khanna, hSSB1 rapidly binds at the sites of DNA double-strand breaks and is required for the efficient recruitment of the MRN complex, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 1692–1702. doi:10.1093/nar/gkq1098.
- [53] P. Reynolds, J.A. Anderson, J.V. Harper, M.A. Hill, S.W. Botchway, A.W. Parker, P. O'Neill, The dynamics of Ku70/80 and DNA-PKcs at DSBs induced by ionizing radiation is dependent on the complexity of damage, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 10821–10831. doi:10.1093/nar/gks879.
- [54] D.R. Pilch, O.A. Sedelnikova, C. Redon, A. Celeste, A. Nussenzweig, W.M. Bonner, Characteristics of γ -H2AX foci at DNA double-strand breaks sites, *Biochem. Cell Biol.* 81 (2003) 123–129. doi:10.1139/o03-042.

- [55] L.J. Kuo, L.-X. Yang, γ -H2AX - A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks, *In Vivo*. 22 (2008) 305–309.
- [56] J.A. Neal, V. Dang, P. Douglas, M.S. Wold, S.P. Lees-Miller, K. Meek, Inhibition of Homologous Recombination by DNA-Dependent Protein Kinase Requires Kinase Activity, Is Titratable, and Is Modulated by Autophosphorylation, *Mol. Cell. Biol.* 31 (2011) 1719–1733. doi:10.1128/MCB.01298-10.
- [57] X. Cui, Y. Yu, S. Gupta, Y.-M. Cho, S.P. Lees-Miller, K. Meek, Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 10842–10852. doi:10.1128/MCB.25.24.10842-10852.2005.
- [58] W. Jiang, J.L. Crowe, X. Liu, S. Nakajima, Y. Wang, C. Li, B.J. Lee, R.L. Dubois, C. Liu, X. Yu, L. Lan, S. Zha, Differential phosphorylation of DNA-PKcs regulates the interplay between end-processing and end-ligation during nonhomologous end-joining, *Mol. Cell.* 58 (2015) 172–185. doi:10.1016/j.molcel.2015.02.024.
- [59] N. Jette, S.P. Lees-Miller, The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 117 (2015) 194–205. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2014.12.003.
- [60] S.J. Collis, T.L. DeWeese, P.A. Jeggo, A.R. Parker, The life and death of DNA-PK, *Oncogene*. 24 (2005) 949–961. doi:10.1038/sj.onc.1208332.
- [61] D.M. Sabatini, mTOR and cancer: insights into a complex relationship, *Nat. Rev. Cancer.* 6 (2006) 729–734. doi:10.1038/nrc1974.
- [62] L. Neckers, P. Workman, Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet?, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18 (2012) 64–76. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1000.
- [63] Z.A. Knight, H. Lin, K.M. Shokat, Targeting the cancer kinome through polypharmacology, *Nat. Rev. Cancer.* 10 (2010) 130–137. doi:10.1038/nrc2787.
- [64] S. Faes, O. Dormond, PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 21138–21152. doi:10.3390/ijms160921138.
- [65] M. Onishi, T. Ichikawa, K. Kurozumi, I. Date, Angiogenesis and invasion in glioma, *Brain Tumor Pathol.* 28 (2011) 13–24. doi:10.1007/s10014-010-0007-z.
- [66] A. Deorukhkar, S. Krishnan, Targeting inflammatory pathways for tumor radiosensitization, *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 1904–1914. doi:10.1016/j.bcp.2010.06.039.
- [67] P. Friedl, K. Wolf, Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model, *J. Cell Biol.* 188 (2010) 11–19. doi:10.1083/jcb.200909003.
- [68] O.T. Fackler, R. Grosse, Cell motility through plasma membrane blebbing, *J. Cell Biol.* 181 (2008) 879–884. doi:10.1083/jcb.200802081.
- [69] V. Sanz-Moreno, C.J. Marshall, Rho-GTPase signaling drives melanoma cell plasticity, *Cell Cycle*. 8 (2009) 1484–1487. doi:10.4161/cc.8.10.8490.
- [70] K. Yoshida, T. Soldati, Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 3833–3844. doi:10.1242/jcs.03152.
- [71] J.P. Thiery, Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression, *Nat. Rev. Cancer.* 2 (2002) 442–454. doi:10.1038/nrc822.
- [72] Y. Hegerfeldt, M. Tusch, E.-B. Bröcker, P. Friedl, Collective Cell Movement in Primary Melanoma Explants: Plasticity of Cell-Cell Interaction, β 1-Integrin Function, and Migration Strategies, *Cancer Res.* 62 (2002) 2125–2130.
- [73] H.E. Johnson, S.J. King, S.B. Asokan, J.D. Rotty, J.E. Bear, J.M. Haugh, F-actin bundles direct the initiation and orientation of lamellipodia through adhesion-based signaling, *J. Cell Biol.* 208 (2015) 443–455. doi:10.1083/jcb.201406102.

- [74] F. Huber, J. Käs, B. Stuhmann, Growing actin networks form lamellipodium and lamellum by self-assembly, *Biophys. J.* 95 (2008) 5508–5523. doi:10.1529/biophysj.108.134817.
- [75] J.V. Small, Dicing with dogma: de-branching the lamellipodium, *Trends Cell Biol.* 20 (2010) 628–633. doi:10.1016/j.tcb.2010.08.006.
- [76] S. Tojkander, G. Gateva, P. Lappalainen, Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 1855–1864. doi:10.1242/jcs.098087.
- [77] S. Tojkander, G. Gateva, G. Schevzov, P. Hotulainen, P. Naumanen, C. Martin, P.W. Gunning, P. Lappalainen, A molecular pathway for myosin II recruitment to stress fibers, *Curr. Biol. CB.* 21 (2011) 539–550. doi:10.1016/j.cub.2011.03.007.
- [78] C. Le Clainche, M.-F. Carlier, Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 489–513. doi:10.1152/physrev.00021.2007.
- [79] L.B. Case, C.M. Waterman, Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch, *Nat. Cell Biol.* 17 (2015) 955–963. doi:10.1038/ncb3191.
- [80] M.A. Schwartz, Super-Resolution Microscopy: A New Dimension in Focal Adhesions, *Curr. Biol.* 21 (2011) R115–R116. doi:10.1016/j.cub.2010.12.025.
- [81] M.L. Gardel, B. Sabass, L. Ji, G. Danuser, U.S. Schwarz, C.M. Waterman, Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed, *J Cell Biol.* 183 (2008) 999–1005. doi:10.1083/jcb.200810060.
- [82] V. Swaminathan, J.M. Kalappurakkal, S.B. Mehta, P. Nordenfelt, T.I. Moore, N. Koga, D.A. Baker, R. Oldenbourg, T. Tani, S. Mayor, T.A. Springer, C.M. Waterman, Actin retrograde flow actively aligns and orients ligand-engaged integrins in focal adhesions, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (2017) 10648–10653. doi:10.1073/pnas.1701136114.
- [83] J. v. Small, S. Auinger, M. Nemethova, S. Koestler, K. n. Goldie, A. Hoenger, G. p. Resch, Unravelling the structure of the lamellipodium, *J. Microsc.* 231 (2008) 479–485. doi:10.1111/j.1365-2818.2008.02060.x.
- [84] J. Zhong, A. Paul, S.J. Kellie, G.M. O’Neill, Mesenchymal migration as a therapeutic target in glioblastoma, *J. Oncol.* 2010 (2010) 430142. doi:10.1155/2010/430142.
- [85] B. Short, Lamellipodial actin branches out, *J. Cell Biol.* 211 (2015) 6. doi:10.1083/jcb.21111fta.
- [86] H. Lodish, A. Berk, C.A. Kaiser, *Molecular Cell Biology*, 0006 ed., W H Freeman & Co, New York, 2007.
- [87] B.R. Sarangi, M. Gupta, B.L. Doss, N. Tissot, F. Lam, R.-M. Mège, N. Borghi, B. Ladoux, Coordination between Intra- and Extracellular Forces Regulates Focal Adhesion Dynamics, *Nano Lett.* 17 (2017) 399–406. doi:10.1021/acs.nanolett.6b04364.
- [88] S.K. Mitra, D.A. Hanson, D.D. Schlaepfer, Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 56–68. doi:10.1038/nrm1549.
- [89] S. Memmel, V.L. Sukhorukov, M. Höring, K. Westerling, V. Fiedler, A. Katzer, G. Krohne, M. Flentje, C.S. Djuzenova, Cell Surface Area and Membrane Folding in Glioblastoma Cell Lines Differing in PTEN and p53 Status, *PLoS ONE.* 9 (2014) e87052. doi:10.1371/journal.pone.0087052.
- [90] J. Huth, M. Buchholz, J.M. Kraus, M. Schmucker, G. von Wichert, D. Krndija, T. Seufferlein, T.M. Gress, H.A. Kestler, Significantly improved precision of cell migration analysis in time-lapse video microscopy through use of a fully automated tracking system, *BMC Cell Biol.* 11 (2010) 24. doi:10.1186/1471-2121-11-24.
- [91] O. Hilsenbeck, M. Schwarzfischer, S. Skylaki, B. Schauburger, P.S. Hoppe, D. Loeffler, K.D. Kokkaliaris, S. Hastreiter, E. Skylaki, A. Filipczyk, M. Strasser, F. Buggenthin, J.S. Feigelman, J. Krumsiek, A.J.J. van den Berg, M. Endeke, M. Etzrodt, C. Marr, F.J. Theis,

- T. Schroeder, Software tools for single-cell tracking and quantification of cellular and molecular properties, *Nat. Biotechnol.* 34 (2016) 703–706. doi:10.1038/nbt.3626.
- [92] P. Baniukiewicz, S. Collier, T. Bretschneider, QuimP: analyzing transmembrane signalling in highly deformable cells, *Bioinformatics.* 34 (2018) 2695–2697. doi:10.1093/bioinformatics/bty169.
- [93] M. Hayakawa, H. Kaizawa, H. Moritomo, T. Koizumi, T. Ohishi, M. Okada, M. Ohta, S. Tsukamoto, P. Parker, P. Workman, M. Waterfield, Synthesis and biological evaluation of 4-morpholino-2-phenylquinazolines and related derivatives as novel PI3 kinase p110 α inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 6847–6858. doi:10.1016/j.bmc.2006.06.046.
- [94] F.I. Raynaud, S. Eccles, P.A. Clarke, A. Hayes, B. Nutley, S. Alix, A. Henley, F. Di-Stefano, Z. Ahmad, S. Guillard, L.M. Bjerke, L. Kelland, M. Valenti, L. Patterson, S. Gowan, A. de H. Brandon, M. Hayakawa, H. Kaizawa, T. Koizumi, T. Ohishi, S. Patel, N. Saghir, P. Parker, M. Waterfield, P. Workman, Pharmacologic Characterization of a Potent Inhibitor of Class I Phosphatidylinositide 3-Kinases, *Cancer Res.* 67 (2007) 5840–5850. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4615.
- [95] P.A. Brough, W. Aherne, X. Barril, J. Borgognoni, K. Boxall, J.E. Cansfield, K.-M.J. Cheung, I. Collins, N.G.M. Davies, M.J. Drysdale, B. Dymock, S.A. Eccles, H. Finch, A. Fink, A. Hayes, R. Howes, R.E. Hubbard, K. James, A.M. Jordan, A. Lockie, V. Martins, A. Massey, T.P. Matthews, E. McDonald, C.J. Northfield, L.H. Pearl, C. Prodromou, S. Ray, F.I. Raynaud, S.D. Roughley, S.Y. Sharp, A. Surgenor, D.L. Walmsley, P. Webb, M. Wood, P. Workman, L. Wright, 4,5-Diarylisoxazole Hsp90 Chaperone Inhibitors: Potential Therapeutic Agents for the Treatment of Cancer, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 196–218. doi:10.1021/jm701018h.
- [96] M.R. Jensen, J. Schoepfer, T. Radimerski, A. Massey, C.T. Guy, J. Brueggen, C. Quadt, A. Buckler, R. Cozens, M.J. Drysdale, C. Garcia-Echeverria, P. Chène, NVP-AUY922: a small molecule HSP90 inhibitor with potent antitumor activity in preclinical breast cancer models, *Breast Cancer Res.* 10 (2008) R33. doi:10.1186/bcr1996.
- [97] S. Oeck, N.M. Malewicz, S. Hurst, J. Rudner, V. Jendrossek, The Focinator - a new open-source tool for high-throughput foci evaluation of DNA damage, *Radiat. Oncol.* 10 (2015) 163. doi:10.1186/s13014-015-0453-1.
- [98] W. Böcker, G. Iliakis, Computational Methods for analysis of foci: validation for radiation-induced gamma-H2AX foci in human cells, *Radiat. Res.* 165 (2006) 113–124.
- [99] A.N. Ivashkevich, O.A. Martin, A.J. Smith, C.E. Redon, W.M. Bonner, R.F. Martin, P.N. Lobachevsky, γ H2AX foci as a measure of DNA damage: a computational approach to automatic analysis, *Mutat. Res.* 711 (2011) 49–60. doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.12.015.
- [100] P.R. Barber, R.J. Locke, G.P. Pierce, K. Rothkamm, B. Vojnovic, Gamma-H2AX foci counting: image processing and control software for high-content screening, in: *Imaging Manip. Anal. Biomol. Cells Tissues V*, International Society for Optics and Photonics, 2007: p. 64411M. doi:10.1117/12.705217.
- [101] L. Hernández, M. Terradas, M. Martín, L. Tusell, A. Genescà, Highly sensitive automated method for DNA damage assessment: gamma-H2AX foci counting and cell cycle sorting, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 15810–15826. doi:10.3390/ijms140815810.
- [102] L. Jakl, P. Lobachevsky, L. Vokálová, M. Durdík, E. Marková, I. Belyaev, Validation of JCountPro software for efficient assessment of ionizing radiation-induced foci in human lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* 92 (2016) 766–773. doi:10.1080/09553002.2016.1222093.
- [103] A. Jucha, A. Wegierek-Ciuk, Z. Koza, H. Lisowska, A. Wojcik, M. Wojewodzka, A. Lankoff, FociCounter: a freely available PC programme for quantitative and qualitative analysis of gamma-H2AX foci, *Mutat. Res.* 696 (2010) 16–20. doi:10.1016/j.mrgentox.2009.12.004.

- [104] R. Runge, R. Hiemann, M. Wendisch, U. Kasten-Pisula, K. Storch, K. Zoephel, C. Fritz, D. Roggenbuck, G. Wunderlich, K. Conrad, J. Kotzerke, Fully automated interpretation of ionizing radiation-induced γ H2AX foci by the novel pattern recognition system AKLIDES®, *Int. J. Radiat. Biol.* 88 (2012) 439–447. doi:10.3109/09553002.2012.658468.
- [105] D. Sisario, S. Memmel, S. Doose, J. Neubauer, H. Zimmermann, M. Flentje, C.S. Djuzenova, M. Sauer, V.L. Sukhorukov, Nanostructure of DNA repair foci revealed by superresolution microscopy, *FASEB J.* (2018) fj.201701435. doi:10.1096/fj.201701435.
- [106] C.-C. Liang, A.Y. Park, J.-L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 329–333. doi:10.1038/nprot.2007.30.
- [107] J.-V. Small, K. Rottner, P. Hahne, K.I. Anderson, Visualising the actin cytoskeleton, *Microsc. Res. Tech.* 47 (1999) 3–17. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19991001)47:1<3::AID-JEMT2>3.0.CO;2-2.
- [108] S. Wolter, A. Löschberger, T. Holm, S. Aufmkolk, M.-C. Dabauvalle, S. van de Linde, M. Sauer, rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy, *Nat. Methods.* 9 (2012) 1040–1041. doi:10.1038/nmeth.2224.
- [109] C. Decaestecker, O. Debeir, P. Van Ham, R. Kiss, Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration, *Med. Res. Rev.* 27 (2007) 149–176. doi:10.1002/med.20078.
- [110] I. Manini, F. Caponnetto, A. Bartolini, T. Ius, L. Mariuzzi, C. Di Loreto, A.P. Beltrami, D. Cesselli, Role of Microenvironment in Glioma Invasion: What We Learned from In Vitro Models, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). doi:10.3390/ijms19010147.
- [111] G.S. Berns, M.W. Berns, Computer-based tracking of living cells, *142* (1982) 103–109. doi:10.1016/0014-4827(82)90414-1.
- [112] D.W. Capson, R.A. Maludzinski, I.A. Feuerstein, Microcomputer-based interactive tracking of blood cells at biomaterial surfaces, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 36 (1989) 860–864. doi:10.1109/10.30814.
- [113] A. Czirók, K. Schlett, E. Madarász, T. Vicsek, Exponential Distribution of Locomotion Activity in Cell Cultures, *Phys. Rev. Lett.* 81 (1998) 3038–3041. doi:10.1103/PhysRevLett.81.3038.
- [114] A. Hoppe, D. Wertheim, W.G. Jiang, R. Williams, K. Harding, Interactive image processing system for assessment of cell movement, *Med. Biol. Eng. Comput.* 37 (1999) 419–423. doi:10.1007/BF02513323.
- [115] J.H. Chon, A.D. Vizena, B.M. Rock, E.L. Chaikof, Characterization of single-cell migration using a computer-aided fluorescence time-lapse videomicroscopy system, *Anal. Biochem.* 252 (1997) 246–254. doi:10.1006/abio.1997.2321.
- [116] D. Dormann, T. Libotte, C.J. Weijer, T. Bretschneider, Simultaneous quantification of cell motility and protein-membrane-association using active contours, *Cell Motil. Cytoskeleton.* 52 (2002) 221–230. doi:10.1002/cm.10048.
- [117] C. De Hauwer, F. Darro, I. Camby, R. Kiss, P. Van Ham, C. Decaestecker, In vitro motility evaluation of aggregated cancer cells by means of automatic image processing, *Cytometry.* 36 (1999) 1–10.
- [118] S. Wäldchen, J. Lehmann, T. Klein, S. van de Linde, M. Sauer, Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy, *Sci. Rep.* 5 (2015) 15348. doi:10.1038/srep15348.
- [119] E. Meijering, I. Smal, O. Dzyubachyk, J.-C. Olivo-Marin, *Time-Lapse Microscopy Imaging*, 2008.
- [120] I. Simon, C.R. Pound, A.W. Partin, J.Q. Clemens, W.A. Christens-Barry, Automated image analysis system for detecting boundaries of live prostate cancer cells, *Cytometry.*

- 31 (1998) 287–294. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19980401)31:4<287::AID-CYTO8>3.0.CO;2-G.
- [121] P. Zamperoni, *Methoden der digitalen Bildsignalverarbeitung*, Vieweg+Teubner Verlag, 1989.
- [122] S. Chen, R.M. Haralick, Recursive erosion, dilation, opening, and closing transforms, *IEEE Trans. Image Process.* 4 (1995) 335–345. doi:10.1109/83.366481.
- [123] N.I. Fisher, *Statistical Analysis of Circular Data*, Cambridge University Press, 1995.
- [124] C.-C. Liang, A.Y. Park, J.-L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 329–333. doi:10.1038/nprot.2007.30.
- [125] S.V. Cruchten, W.V. den Broeck, Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis, *Anat. Histol. Embryol.* 31 (2002) 214–223. doi:10.1046/j.1439-0264.2002.00398.x.
- [126] M. Gupta, B. Doss, C.T. Lim, R. Voituriez, B. Ladoux, Single cell rigidity sensing: A complex relationship between focal adhesion dynamics and large-scale actin cytoskeleton remodeling, *Cell Adhes. Migr.* 10 (2016) 554–567. doi:10.1080/19336918.2016.1173800.
- [127] A. Nikolaev, E.S. Yang, The Impact of DNA Repair Pathways in Cancer Biology and Therapy, *Cancers.* 9 (2017). doi:10.3390/cancers9090126.
- [128] R. Heintzmann, G. Ficz, Breaking the resolution limit in light microscopy, *Brief. Funct. Genomics.* 5 (2006) 289–301. doi:10.1093/bfpg/ell036.
- [129] R. Gaetano, G. Masi, G. Poggi, L. Verdoliva, G. Scarpa, Marker-Controlled Watershed-Based Segmentation of Multiresolution Remote Sensing Images, *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.* 53 (2015) 2987–3004. doi:10.1109/TGRS.2014.2367129.
- [130] R.J. Lapeer, A.C. Tan, R.V. Aldridge, A combined approach to 3D medical image segmentation using marker-based watersheds and active contours: the active watershed method, in: *Med. Image Underst. Anal. MIUA 2002*, 2002: pp. 165–168.
- [131] S. Ray, R. Hagge, M. Gillen, M. Cerejo, S. Shakeri, L. Beckett, T. Greasby, R.D. Badawi, Comparison of two-dimensional and three-dimensional iterative watershed segmentation methods in hepatic tumor volumetrics, *Med. Phys.* 35 (2008) 5869–5881. doi:10.1118/1.3013561.
- [132] G. Lin, U. Adiga, K. Olson, J.F. Guzowski, C.A. Barnes, B. Roysam, A hybrid 3D watershed algorithm incorporating gradient cues and object models for automatic segmentation of nuclei in confocal image stacks, *Cytometry A.* 56A (2003) 23–36. doi:10.1002/cyto.a.10079.
- [133] M. Beyzadeoglu, G. Ozyigit, C. Ebruli, *Basic Radiation Oncology*, Springer Science & Business Media, 2010.
- [134] J. Ollion, J. Cochenec, F. Loll, C. Escudé, T. Boudier, TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization, *Bioinformatics.* 29 (2013) 1840–1841. doi:10.1093/bioinformatics/btt276.
- [135] P.M. Sharma, B. Ponnaiya, M. Taveras, I. Shuryak, H. Turner, D.J. Brenner, High Throughput Measurement of γ H2AX DSB Repair Kinetics in a Healthy Human Population, *PLoS ONE.* 10 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0121083.
- [136] N.T. Martin, S.A. Nahas, R. Tunuguntla, F. Fike, R.A. Gatti, Assessing ‘radiosensitivity’ with kinetic profiles of γ -H2AX, 53BP1 and BRCA1 foci, *Radiother. Oncol.* 101 (2011) 35–38. doi:10.1016/j.radonc.2011.05.065.
- [137] L.G. Mariotti, G. Pirovano, K.I. Savage, M. Ghita, A. Ottolenghi, K.M. Prise, G. Schettino, Use of the γ -H2AX Assay to Investigate DNA Repair Dynamics Following Multiple Radiation Exposures, *PLOS ONE.* 8 (2013) e79541. doi:10.1371/journal.pone.0079541.
- [138] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttelpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional

- Fluorescent Probes, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 6172–6176. doi:10.1002/anie.200802376.
- [139] S.E. Henrickson, T.R. Mempel, I.B. Mazo, B. Liu, M.N. Artyomov, H. Zheng, A. Peixoto, M.P. Flynn, B. Senman, T. Junt, H.C. Wong, A.K. Chakraborty, U.H. von Andrian, T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 282–291. doi:10.1038/ni1559.
- [140] P. Michl, A.R. Ramjaun, O.E. Pardo, P.H. Warne, M. Wagner, R. Poulson, C. D'Arrigo, K. Ryder, A. Menke, T. Gress, J. Downward, CUTL1 is a target of TGF β signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness, *Cancer Cell.* 7 (2005) 521–532. doi:10.1016/j.ccr.2005.05.018.
- [141] K. Wolf, Y.I. Wu, Y. Liu, J. Geiger, E. Tam, C. Overall, M.S. Stack, P. Friedl, Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 893–904. doi:10.1038/ncb1616.
- [142] B. Boldajipour, H. Mahabaleshwar, E. Kardash, M. Reichman-Fried, H. Blaser, S. Minina, D. Wilson, Q. Xu, E. Raz, Control of Chemokine-Guided Cell Migration by Ligand Sequestration, *Cell.* 132 (2008) 463–473. doi:10.1016/j.cell.2007.12.034.
- [143] Q. Tang, J.Y. Adams, A.J. Tooley, M. Bi, B.T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R.M. Locksley, M.F. Krummel, J.A. Bluestone, Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice, *Nat. Immunol.* 7 (2006) 83–92. doi:10.1038/ni1289.
- [144] J.-Y. Tinevez, U. Schulze, G. Salbreux, J. Roensch, J.-F. Joanny, E. Paluch, Role of cortical tension in bleb growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 18581–18586. doi:10.1073/pnas.0903353106.
- [145] R.J. Petrie, A.D. Doyle, K.M. Yamada, Random versus directionally persistent cell migration, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 538–549. doi:10.1038/nrm2729.
- [146] J.E.N. Jonkman, J.A. Cathcart, F. Xu, M.E. Bartolini, J.E. Amon, K.M. Stevens, P. Colarusso, An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy, *Cell Adhes. Migr.* 8 (2014) 440–451. doi:10.4161/cam.36224.
- [147] C. Wild-Bode, M. Weller, A. Rimmer, J. Dichgans, W. Wick, Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma, *Cancer Res.* 61 (2001) 2744–2750.
- [148] W.T. Arcott, A.T. Tandle, S. Zhao, J.E. Shabason, I.K. Gordon, C.D. Schlaff, G. Zhang, P.J. Tofilon, K.A. Camphausen, Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: implications in tumor biology and cell migration, *Transl. Oncol.* 6 (2013) 638–648.
- [149] U.K. Mukhopadhyay, P. Mooney, L. Jia, R. Eves, L. Raptis, A.S. Mak, Double game: Src-Stat3 versus p53-PTEN in cellular migration and invasion, *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 4980–4995. doi:10.1128/MCB.00004-10.
- [150] S.K. Lim, S.R.A. Llaguno, R.M. McKay, L.F. Parada, Glioblastoma multiforme: a perspective on recent findings in human cancer and mouse models, *BMB Rep.* 44 (2011) 158–164. doi:10.5483/BMBRep.2011.44.3.158.
- [151] T.F. Oliveira, T. Maués, M.S. Ramundo, A.M.S. Figueiredo, M.F.V. de Mello, K.B. El-Jaick, M. de L.G. Ferreira, A.M.R. Ferreira, TP53 gene expression levels and tumor aggressiveness in canine mammary carcinomas, *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc.* 29 (2017) 865–868. doi:10.1177/1040638717721730.
- [152] J.A. Kraus, N. Glesmann, M. Beck, D. Krex, T. Klockgether, G. Schackert, U. Schlegel, Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme, *J. Neurooncol.* 48 (2000) 89–94.
- [153] M. Fukata, M. Nakagawa, K. Kaibuchi, Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 590–597. doi:10.1016/S0955-0674(03)00097-8.

- [154] A.J. Ridley, Rho GTPase signalling in cell migration, *Curr. Opin. Cell Biol.* 36 (2015) 103–112. doi:10.1016/j.ceb.2015.08.005.
- [155] S. Etienne-Manneville, Cdc42 - the centre of polarity, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 1291–1300. doi:10.1242/jcs.01115.
- [156] M.C. Weiger, S. Ahmed, E.S. Welf, J.M. Haugh, Directional Persistence of Cell Migration Coincides with Stability of Asymmetric Intracellular Signaling, *Biophys. J.* 98 (2010) 67–75. doi:10.1016/j.bpj.2009.09.051.
- [157] N. Niewidok, L.-J. Wack, S. Schiessl, L. Stingl, A. Katzer, B. Polat, V.L. Sukhorukov, M. Flentje, C.S. Djuzenova, Hsp90 Inhibitors NVP-AUY922 and NVP-BEP800 May Exert a Significant Radiosensitization on Tumor Cells along with a Cell Type-Specific Cytotoxicity, *Transl. Oncol.* 5 (2012) 356–369.
- [158] L. Stingl, T. Stühmer, M. Chatterjee, M.R. Jensen, M. Flentje, C.S. Djuzenova, Novel HSP90 inhibitors, NVP-AUY922 and NVP-BEP800, radiosensitise tumour cells through cell-cycle impairment, increased DNA damage and repair protraction, *Br. J. Cancer.* 102 (2010) 1578–1591. doi:10.1038/sj.bjc.6605683.
- [159] J. Lian, D. Lin, X. Xie, Y. Xu, L. Xu, L. Meng, Y. Zhu, NVP-AUY922, a novel HSP90 inhibitor, inhibits the progression of malignant pheochromocytoma in vitro and in vivo, *OncoTargets Ther.* 10 (2017) 2219–2226. doi:10.2147/OTT.S130236.
- [160] S. Ströbele, M. Schneider, L. Schneele, M.D. Siegelin, L. Nonnenmacher, S. Zhou, G. Karpel-Massle, M.-A. Westhoff, M.-E. Halatsch, K.-M. Debatin, A Potential Role for the Inhibition of PI3K Signaling in Glioblastoma Therapy, *PLOS ONE.* 10 (2015) e0131670. doi:10.1371/journal.pone.0131670.
- [161] S. Hartmann, N. Günther, M. Biehl, A. Katzer, S. Kuger, E. Worschech, V.L. Sukhorukov, G. Krohne, H. Zimmermann, M. Flentje, C.S. Djuzenova, Hsp90 inhibition by NVP-AUY922 and NVP-BEP800 decreases migration and invasion of irradiated normoxic and hypoxic tumor cell lines, *Cancer Lett.* 331 (2013) 200–210. doi:10.1016/j.canlet.2012.12.027.
- [162] D. Picard, Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 59 (2002) 1640–1648.
- [163] S. Bao, Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, M.W. Dewhirst, D.D. Bigner, J.N. Rich, Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response, *Nature.* 444 (2006) 756–760. doi:10.1038/nature05236.
- [164] B. Mukherjee, B. McEllin, C.V. Camacho, N. Tomimatsu, S. Sirasanagandala, S. Nannepaga, K.J. Hatanpaa, B. Mickey, C. Madden, E. Maher, D.A. Boothman, F. Furnari, W.K. Cavenee, R.M. Bachoo, S. Burma, EGFRvIII and DNA Double-Strand Break Repair: A Molecular Mechanism for Radioresistance in Glioblastoma, *Cancer Res.* 69 (2009) 4252–4259. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4853.
- [165] A.J. Kuperavage, A.-A.-Z. Imran, P.R. Bakic, A. Maidment, D.D. Pokrajac, Validation of Cooper’s ligament thickness in software breast phantoms, in: *Med. Imaging 2017 Phys. Med. Imaging*, International Society for Optics and Photonics, 2017: p. 101325B. doi:10.1117/12.2254551.
- [166] P.S. Dittrich, P. Schwille, Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis. with one- and two-photon excitation, *Appl. Phys. B.* 73 (2001) 829–837. doi:10.1007/s003400100737.
- [167] J. Widengren, R. Rigler, Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy, *Bioimaging.* 4 (1996) 149–157. doi:10.1002/1361-6374(199609)4:3<149::AID-BIO5>3.0.CO;2-D.
- [168] S. Zhang, H. Yajima, H. Huynh, J. Zheng, E. Callen, H.-T. Chen, N. Wong, S. Bunting, Y.-F. Lin, M. Li, K.-J. Lee, M. Story, E. Gapud, B.P. Sleckman, A. Nussenzweig, C.C. Zhang, D.J. Chen, B.P.C. Chen, Congenital bone marrow failure in DNA-PKcs mutant

- mice associated with deficiencies in DNA repair, *J. Cell Biol.* 193 (2011) 295–305. doi:10.1083/jcb.201009074.
- [169] Q. Ding, Y.V.R. Reddy, W. Wang, T. Woods, P. Douglas, D.A. Ramsden, S.P. Lees-Miller, K. Meek, Autophosphorylation of the Catalytic Subunit of the DNA-Dependent Protein Kinase Is Required for Efficient End Processing during DNA Double-Strand Break Repair, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 5836–5848. doi:10.1128/MCB.23.16.5836-5848.2003.
- [170] J.A. Neal, K. Meek, Choosing the right path: Does DNA-PK help make the decision?, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 711 (2011) 73–86. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.02.010.
- [171] S. Soubeyrand, L. Pope, B. Pakuts, R.J.G. Haché, Threonines 2638/2647 in DNA-PK Are Essential for Cellular Resistance to Ionizing Radiation, *Cancer Res.* 63 (2003) 1198–1201.
- [172] A.J. Davis, S. So, D.J. Chen, Dynamics of the PI3K-like protein kinase members ATM and DNA-PKcs at DNA double strand breaks, *Cell Cycle.* 9 (2010) 2529–2536. doi:10.4161/cc.9.13.12148.
- [173] P. Rybak, A. Hoang, L. Bujnowicz, T. Bernas, K. Berniak, M. Zarębski, Z. Darzynkiewicz, J. Dobrucki, Low level phosphorylation of histone H2AX on serine 139 (γ H2AX) is not associated with DNA double-strand breaks, *Oncotarget.* 7 (2016) 49574–49587. doi:10.18632/oncotarget.10411.
- [174] D. Davidson, L. Amrein, L. Panasci, R. Aloyz, Small Molecules, Inhibitors of DNA-PK, Targeting DNA Repair, and Beyond, *Front. Pharmacol.* 4 (2013). doi:10.3389/fphar.2013.00005.
- [175] L.R. van Veelen, T. Cervelli, M.W.M.M. van de Rakt, A.F. Theil, J. Essers, R. Kanaar, Analysis of ionizing radiation-induced foci of DNA damage repair proteins, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 574 (2005) 22–33. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.01.019.
- [176] N. Uematsu, E. Weterings, K. Yano, K. Morotomi-Yano, B. Jakob, G. Taucher-Scholz, P.-O. Mari, D.C. van Gent, B.P.C. Chen, D.J. Chen, Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks, *J. Cell Biol.* 177 (2007) 219–229. doi:10.1083/jcb.200608077.

Abschlussarbeiten

Dmitri Sisario: „Einfluss der PI3K-, mTOR- und Hsp90-Inhibierung auf das Aktin-Zytoskelett und das Migrationsverhalten bestrahlter humaner Glioblastomzelllinien“ betreut von Prof. Dr. Djuzenova, Juli 2014

Eigene Publikationen

Aus dieser Doktorarbeit hervorgegangen:

Memmel S., Sisario D., Zöller C., Fiedler V., Katzer A., Heiden R., Becker N., Eing L., Ferreira F.L.R., Zimmermann H., Sauer M., Flentje M., Sukhorukov V.L., Djuzenova C.S., Migration pattern, actin cytoskeleton organization and response to PI3K-, mTOR-, and Hsp90-inhibition of glioblastoma cells with different invasive capacities, *Oncotarget*. 8 (2017) 45298–45310. doi:10.18632/oncotarget.16847

Ich entwickelte das Design, führte die Experimente (mit Ausnahme der Westernblot Experimente) und die Auswertung der Daten durch. Ich war an der Niederschrift des Manuskriptes beteiligt.

Sisario D., Memmel S., Doose S., Neubauer J., Zimmermann H., Flentje M., Djuzenova C.S., Sauer M., Sukhorukov V.L., Nanostructure of DNA repair foci revealed by superresolution microscopy, *FASEB J.* (2018) fj.201701435. doi:10.1096/fj.201701435.

Ich war maßgeblich beteiligt am Design und der Durchführung sowie der Auswertung der Experimente.

Memmel S., Sisario D., Zimmermann H., Sauer M., Sukhorukov V.L., Djuzenova C.S., Flentje M., FocAn: Automated 3D analysis of DNA repair foci in image stacks acquired by confocal fluorescence microscopy, in Submission eingereicht 12.03.2019 *BMC Bioinformatics*

Ich entwickelte die Software FocAn-3D und führte die Experimente sowie die Auswertung der Daten durch. Ich war an der Niederschrift des Manuskriptes beteiligt.

Nicht aus dieser Arbeit hervorgegangen:

Grabenbauer F., Katzer A., Sisario D., Memmel S., Flentje F., Sukhorukov VL., Cholpon S. Djuzenova, „MEK-inhibitor PD184352 enhances the radiosensitizing effect of the Hsp90 inhibitor NVP-AUY922: the role of cell type and drug-irradiation schedule“ *Oncotarget*

Djuzenova CS, Fiedler V, Memmel S, et al., „Actin cytoskeleton organization, cell surface modification and invasion rate of 5 glioblastoma cell lines differing in PTEN and p53 status“ *Experimental cell research*, Jan 2015

Shirakashi R, Yasui T, Memmel S and Sukhorukov VL, „Electro-microinjection into fish eggs with an immobile capillary electrode “*Sensors & Actuators: B. Chemical*, 2015

Memmel S, et al., „Cell Surface Area and Membrane Folding in Glioblastoma Cell Lines Differing in PTEN and p53 Status“, PLoS ONE, Jan. 2014.

Shirakashi R, Mischke M, Fischer P, Memmel S, Krohne G, Fuhr GR, Zimmermann H, Sukhorukov VL. Changes in the dielectric properties of medaka fish embryos during development, studied by electrorotation. Biochem Biophys Res Commun; 428: 127-131, 2012.

Posterpublikation

Memmel S, et al., Modified single-cell tracking approach for the assessment of individual tumor cells. STRAHLENTHERAPIE UND ONKOLOGIE Volume: 194 Page 166-167 Published JUL 2018

Appendix

I. TLA Wundheilungsassay Arbeitsablauf

- 1: (
- 2: Next_n_Img(1,0)
- 3: -
- 4: Next_n_Img(0,1)
- 5: ScaleImage(0.5)
- 6: Entropy(9)
- 7: Median(20)
- 8: Adjust
- 9: Self defined(0.22)
- 10: ScaleImage(org)
- 11: Closing(10)
- 12: Erosion(5)
- 13: Fill in holes(1000)
- 14: Delete small regions(8000)
- 15: Erosion(5)
- 16: Opening(4)
- 17: Delete small regions(15000)
- 18:)
- 19: *
- 20: (
- 21: #([2,17],-1,1)
- 22: Self defined(0.05)
- 23:)
- 24: -
- 25: (
- 26: Original
- 27: Subregion(1,1,2,2,0)
- 28: Self defined(0.1)
- 29:)

II. TLA Einzelzellverfolgung Arbeitsablauf

- 1: (
- 2: ScaleImage(0.5)
- 3: Entropy(7)
- 4: Median(5)
- 5: ScaleImage(org)
- 6: Median(11)
- 7: Self defined(0.6)
- 8: Closing(7)
- 9: Fill in holes(500)
- 10: Erosion(1)
- 11: Opening(9)
- 12: Delete small regions(500)
- 13: Erosion(5)
- 14:)
- 15: *
- 16: (
- 17: Adjust
- 18: Phase difference image(0.7)
- 19: Median(20)
- 20: Adjust
- 21: Median(11)
- 22: Extended h-Maxima(0.4)
- 23: Opening(9)
- 24: Dilation(15)
- 25: Delete small regions(1000)
- 26:)
- 27: Delete small regions(800)
- 28: Centroids

II.2) Kalman Filter

Bewegungsmodell Matrix A

1	0.2	0	0
0	1	0	0
0	0	1	0.2
0	0	0	1

State to measurement relation H

1	0	0	0
0	0	1	0

Process noise covariance Q

25	0	0	0
0	25	0	0
0	0	25	0
0	0	0	25

Measurement error covariance R

16	0
0	16

III.) Excelmakro für die Transformation der Daten vom TLA-Format zum Chemotaxis and Migration Tool Format

```

Sub TLAzuCaMT ()
'
' TLAzuPA Makro
'
'
Sheets("Tracking history").Select
ActiveWindow.SelectedSheets.Delete
Sheets("Track features").Select
ActiveWindow.SelectedSheets.Delete
ActiveWindow.ScrollWorkbookTabs Sheets:=--1
Sheets("Tabelle1").Select
ActiveWindow.SelectedSheets.Delete
Columns("H:H").Select
Selection.Cut
Columns("A:A").Select
Selection.Insert shift:=xlToRight
Range("A2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "1"
Range("A3").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "2"
Range("A4").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "3"
Range("A2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "1"
Range("A2:A4").Select
Range("B1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Track n°"
Range("C1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Slice n°"
Range("D1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "X"
Range("E1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Y"
Columns("F:G").Select
Selection.Delete shift:=xlToLeft
Range("F1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Distance"
Range("G1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Velocity"
Range("H1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Pixel Value"
Range("I1").Select
x = 1

Do While Cells(x, 4).Value <> ""
    If Cells(x, 4).Value = "-" Then
        Rows(Cells(x, 4).Row).Select
        Selection.Delete shift:=xlUp
        x = x - 1
    End If
    x = x + 1
Loop

Range("A2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "1"
Range("A3").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "2"

    Q = 2

Do While Cells(Q, 4).Value <> ""
    Q = Q + 1
Loop

Q = Q - 1

Range("A2:A3").Select
Selection.AutoFill Destination:=Range(Cells(2, 1), Cells(Q, 1)), Type:=xlFillDefault
Range("A2:A2301").Select
Range("C2294").Select
Cells.Select
Range("C2294").Activate
Selection.Replace What:="-", Replacement:="", LookAt:=xlPart, _
    SearchOrder:=xlByRows, MatchCase:=False, SearchFormat:=False, _
    ReplaceFormat:=False
y = 2

Do While Cells(y, 4).Value <> ""
    y = y + 1
Loop

y = y - 1
Range("I2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=PRODUCT(RC[-5]*1000)"
Range("I2").Select
Selection.AutoFill Destination:=Range(Cells(2, 9), Cells(y, 9)), Type:=xlFillDefault
Z = 2

Do While Cells(Z, 5).Value <> ""
    Z = Z + 1
Loop

Z = Z - 1
Range("J2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=PRODUCT(RC[-5]*1000)"
Range("J2").Select

```

```

Selection.AutoFill Destination:=Range(Cells(2, 10), Cells(Z, 10)), Type:=xlFillDefault
Columns("I:J").Select
Application.CutCopyMode = False
Selection.Copy
Columns("D:E").Select
Selection.PasteSpecial Paste:=xlPasteValues, Operation:=xlNone, SkipBlanks _
:=False, Transpose:=False
Columns("I:J").Select
Application.CutCopyMode = False
Selection.ClearContents
Columns("F:H").Select
Selection.ClearContents
ActiveWindow.SmallScroll Down:=-9
Range("D1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "X"
Range("E1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Y"
Range("L6").Select
Columns("D:E").Select
Selection.NumberFormat = "0"
Range("G3").Select
UserForm1.Show

```

End Sub

IV.) Excelmakro für die zeitaufgelöste Verarbeitung der Daten

```

Sub TLAdirect ()
Sheets("Tracking history").Select
ActiveWindow.SelectedSheets.Delete
Sheets("Track features").Select
ActiveWindow.SelectedSheets.Delete
ActiveWindow.ScrollWorkbookTabs Sheets:=-1
Sheets("Tabelle1").Select
ActiveWindow.SelectedSheets.Delete
'Sheets("Tabelle2").Select
'ActiveWindow.SelectedSheets.Delete
'Sheets("Tabelle3").Select
'ActiveWindow.SelectedSheets.Delete
Columns("H:H").Select
Selection.Cut
Columns("A:A").Select
Selection.Insert shift:=xlToRight
Range("A2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "1"
Range("A3").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "2"
Range("A4").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "3"
Range("A2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "1"
Range("A2:A4").Select
Range("B1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Track n°"
Range("C1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Slice n°"
Range("D1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "X"
Range("E1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Y"
Columns("F:G").Select
Selection.Delete shift:=xlToLeft
Range("F1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Euclidian Distance frame to frame"
Range("G1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Velocity"
Range("H1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Pixel Value"
Range("I1").Select
E = 2

Do While Cells(E, 2).Value = "1"
E = E + 1
Loop

E = E - 1
x = 1

Do While Cells(x, 4).Value <> ""
If Cells(x, 4).Value = "-" Then
Rows(Cells(x, 4).Row).Select
Selection.Delete shift:=xlUp
x = x - 1
End If
x = x + 1
Loop

Range("A2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "1"
Range("A3").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "2"

Q = 2

Do While Cells(Q, 4).Value <> ""
Q = Q + 1
Loop

Q = Q - 1
Range("A2:A3").Select
Selection.AutoFill Destination:=Range(Cells(2, 1), Cells(Q, 1)), Type:=xlFillDefault
Range("A2:A5000").Select

```

```

Range("C5000").Select
Cells.Select
Range("C5000").Activate
Selection.Replace What:="-", Replacement:="", LookAt:=xlPart, _
    SearchOrder:=xlByRows, MatchCase:=False, SearchFormat:=False, _
    ReplaceFormat:=False
UserForm3.Show
Range("M1:M1").Select
Selection.AutoFill Destination:=Range("M1:M" & Q), Type:=xlFillDefault
Range("N1:N1").Select
Selection.AutoFill Destination:=Range("N1:N" & Q), Type:=xlFillDefault
y = 2

Do While Cells(y, 4).Value <> ""
    y = y + 1
Loop

y = y - 1
Range("I2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=PRODUCT(RC[-5]*R[0]C[4])" 'X axis calibration
Range("I2").Select
Selection.AutoFill Destination:=Range(Cells(2, 9), Cells(y, 9)), Type:=xlFillDefault
Z = 2

Do While Cells(Z, 5).Value <> ""
    Z = Z + 1
Loop

Z = Z - 1
Range("J2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=PRODUCT(RC[-5]*R[0]C[3])" 'Y axis calibration
Range("J2").Select
Selection.AutoFill Destination:=Range(Cells(2, 10), Cells(Z, 10)), Type:=xlFillDefault
A = 2
B = 3

Do While Cells(A, 6).Value <> "" Or Cells(B, 6).Value <> ""
    A = A + 1
    B = B + 1
Loop

A = A - 1
B = B - 1
Sheets.Add After:=ActiveSheet
Sheets("Track positions").Select
Sheets("Track positions").Name = "Track positions"
Sheets("Tabelle1").Name = "Velo"
Range("K2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=PRODUCT((RC[-5]*R[0]C[2])/R[0]C[3])" 'Euclid axis and time calibration
Range("K2").Select
Selection.AutoFill Destination:=Range(Cells(2, 11), Cells(A, 11)), Type:=xlFillDefault
Range("M1").Select
ActiveCell = "Calibration"
Columns("I:K").Select
Application.CutCopyMode = False
Selection.Copy
Columns("D:F").Select
Selection.PasteSpecial Paste:=xlPasteValues, Operation:=xlNone, SkipBlanks _
    :=False, Transpose:=False
Columns("I:K").Select
Application.CutCopyMode = False
Selection.ClearContents
Columns("G:H").Select
Selection.ClearContents
ActiveWindow.SmallScroll Down:=-9
Range("D1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "X"
Range("E1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Y"
Range("F1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Euclidian velocity μm/s"
Range("L6").Select
    Columns("D:E").Select
    Selection.NumberFormat = "0"
Columns("M:M").Select
Selection.Clear
Range("A1").Select
UserForm1.Show
Sheets("Velo").Select
Range("H1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Slice n°"
Range("H2").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "1"
Range("H3").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "2"
Range("H2:H3").Select
Selection.AutoFill Destination:=Range("H2:H" & E), Type:=xlFillDefault
Sheets("Track positions").Select
Columns("A:F").Select
Selection.Copy
Sheets("Velo").Select
Range("A1").Select
ActiveSheet.Paste
T = 2 'Tabelle für Videos
Tr = 1 'Laufende Tracknummer
SP = Tr + 8 'Laufende Spaltennummer
S = 1 'Laufende Slicennummer START
SS = 2 'Ende des laufenden slices
SSS = 2
SA = 0
'J=10 K=11 L=12 M=13 N=14 O=15
Do While Cells(T, 2).Value = Tr Or Cells(T, 2).Value <> ""
    Do While Cells(S, 8).Value <> Cells(T, 3).Value
        S = S + 1

```

```
    Loop
SS = S
Do While Cells(SS, 8).Value = Cells(T, 3).Value
    SS = SS + 1
    T = T + 1
    Loop
If Tr = 1 Then
SS = SS + 1
Else
End If
SS = SS - S
If Tr > 2 Then
SSS = SSS + 1
Else
End If
SS = SA + SS
Range("F" & SSS, "F" & SS).Select
Selection.Copy
Range("I2").Select
Cells(SP)(S).Select
ActiveSheet.Paste
SSS = SS
If Tr = 1 Then
    SSS = SSS + 1
Else
End If
SA = SS
SP = SP + 1
Tr = Tr + 1
S = 1
Loop
Sheets.Add After:=ActiveSheet
Sheets("Tabelle2").Name = "VeloSteps"
Sheets("Velo").Select
Range(Cells(1, 8).Address(), Cells(SS, SP).Address()).Select
'S = S - 1
Selection.Cut
Sheets("VeloSteps").Select
Range("A1").Select
Selection.Insert

End Sub
```

V.) Sourcecode für Focan-3D

```
//Dialog
FileEx = "dzi";
var Cident = 0;
var Channel = "";
var MaxNs = "finitiy";
Dialog.create("Focan-3D v1.8.1");
Dialog.addMessage("For ImageJ v.1.51 or above, 64bit strongly recommended");
Dialog.addMessage(" ");
Dialog.addString("Filename extension", FileEx);
Dialog.addCheckbox("Multichannel / Multicolor image", false);
Dialog.addCheckbox("3D Foci watershed (slow!)", true);
Dialog.addCheckbox("Enable advanced setup options", false);
Dialog.addMessage(" ");
Dialog.addNumber("Pixelsize X / Y in nm:", 99.2333);
Dialog.addNumber("Pixelsize z in nm:", 250);
Dialog.addNumber("Nucleus watershed tolerance:", 2);
Dialog.addNumber("Basal Z projection Cutoff in slices:", 20);
Dialog.addMessage(" ");
Dialog.addNumber("Mean Foci diameter in px:", 15);
Dialog.addNumber("Minimal Foci diameter in px:", 2);
Dialog.addNumber("Mean Nucleus diameter in px:", 150);
Dialog.addNumber("Minimal Nucleus diameter in px:", 90);
Dialog.addMessage(" ");
Dialog.addMessage("Save routines");

Dialog.addCheckbox("Foci maps", true);
Dialog.addCheckbox("Global Watershed", true);
Dialog.addCheckbox("Global composite - Foci ROI red, signal grey", true);
Dialog.addCheckbox("Objects map per Nucleus", true);
Dialog.addCheckbox("Surface map per Nucleus", false);
Dialog.addCheckbox("Foci maxima seeds for 3D watershed if selected", true);
Dialog.addCheckbox("Show all steps (slow!)", false);
Dialog.show();

FileEx = Dialog.getString();
MultiChannel = Dialog.getCheckbox();
threeDws = Dialog.getCheckbox();
AdvSetup = Dialog.getCheckbox();

//Parameters
PxSizeXY = Dialog.getNumber();
PxSizeXY=PxSizeXY*0.001;
PxSizeZ = Dialog.getNumber();
PxSizeZ=PxSizeZ*0.001;
AdWashed = Dialog.getNumber();
Zpro = Dialog.getNumber();

//Foci
Mfd = Dialog.getNumber();
Mfdtt = Mfd*2;
Mfd = Mfd*PxSizeXY; //Foci diameter in micron
MinFd = Dialog.getNumber();
MinFv = 4/3*MinFd*MinFd*MinFd*3.14 //Volume Foci in Vox

//Nucleus
MNd = Dialog.getNumber();
MNdtt = MNd*2;
MinNd = Dialog.getNumber();
MinNs = 0.01*MinNd*MinNd*3.14/4; //Minimal diameter to surface

//Save routine
FociMaps = Dialog.getCheckbox();
Global_ws = Dialog.getCheckbox();
Global_comp = Dialog.getCheckbox();
Obj_map = Dialog.getCheckbox();
Sur_map = Dialog.getCheckbox();
F_seed_map = Dialog.getCheckbox();

//3D Watershed
WsXY = MinFd *2.5;
WsZ = MinFd *1.5;

Batch = Dialog.getCheckbox();

if (AdvSetup==true){
Dialog.create("Advanced setup options");
Dialog.addMessage("Nucleus segmentation noise reduktion:");
Dialog.addCheckbox("Noise - Despeckle:", false);
Dialog.addCheckbox("Preblur (Gaussian):", false);
Dialog.addNumber("Preblur (Gaussian) sigma:", 3);
Dialog.addMessage(" ");
Dialog.addMessage("Nucleus segmentation parameters:");
Dialog.addNumber("Nucleus threshold - MidGrey C-Value:", 0);
Dialog.addNumber("Postblur (Gaussian); sigma:", 15);
Dialog.addNumber("Minimum circularity between 0 and 1:", 0.5);
Dialog.addNumber("Maximum nucleus area cut off in Px (NaN = Infinity):", MaxNs);
Dialog.addMessage("Maximum nucleus area cut off needs to be larger than "+MinNs+"");
Dialog.addMessage(" ");
Dialog.addMessage("Foci parameters:");
Dialog.addNumber("AutoLocalMedian C_Value:", -40);
Dialog.addNumber("Maximum foci volume in voxel:", 50000);
if (threeDws==true) {
//3D Maxima
Dialog.addMessage(" ");
Dialog.addMessage("3D Maxima parameters for seed creation:");
Dialog.addMessage("Note: The 3d maxima parameters shown XY & Z are automatically \n
the minimal foci diameter");
Dialog.addNumber("3D Maxima radius in XY in Px:", WsXY);
Dialog.addNumber("3D Maxima radius in Z in Px:", WsZ);
Dialog.addNumber("Image Noise in grey values 0-256:", 10);
//3D Watershed
Dialog.addMessage(" ");
Dialog.addMessage("3D Watershed parameters:");
Dialog.addNumber("Seeds threshold:", 10);

```

```

        Dialog.addNumber("Image threshold:", 10);
        Dialog.addNumber("Radius:", 2);
    }

    Dialog.show();

    //Nucleus Operations
    Despeckle = Dialog.getCheckbox();
    PreBlur = Dialog.getCheckbox();
    PBSigma = Dialog.getNumber();
    MidGC = Dialog.getNumber();
    GBSigma = Dialog.getNumber();
    circ = Dialog.getNumber();
    MaxNsN = Dialog.getNumber();
    if (isNaN(MaxNsN)==true){
        MaxNsN = "finity";
    }else{
        MaxNs = MaxNsN;
    }
    //Foci Operations
    MedPar = Dialog.getNumber();
    MaxFv = Dialog.getNumber();
    if (AdvSetup==true){
        if (threeDws==true) {
            //3D Maxima
            WsXY = Dialog.getNumber();
            WsZ = Dialog.getNumber();
            noise = Dialog.getNumber();

            //3DWatershed Parameters
            SeedT = Dialog.getNumber();
        }
        //Seeds threshold
        ImageT = Dialog.getNumber();
        //Image threshold
        WRadius = Dialog.getNumber();
        //Watershed radius
    }
    } else {
        //Nucleus Operations
        Despeckle = false;
        PreBlur = false;
        MidGC = 0;
        GBSigma = 15;
        circ = 0.5;
        //Foci Operations
        MedPar = -40;
        MaxFv = 50000;
        //3D Maxima
        noise = 10;
        //3D Watershed
        SeedT = 10;
        ImageT = 10;
        WRadius = 2;
    }

    //Open files
    extension = ". "+FileEx+"";
    dir1 = getDirectory("Choose Source Directory ");
    n = 0;
    processFolder(dir1);

    function processFolder(dir1) {
        list = getFileList(dir1);
        for (i=0; i<list.length; i++) {
            if (endsWith(list[i], "/" )
                processFolder(dir1+list[i]);
            else if (endsWith(list[i], extension))
                processImage(dir1, list[i]);
        }
    }

    function processImage(dir1, name) {
        if (MultiChannel == true) {
            if (Cident == 1){
                //Multicolor, channel of interest = 1
                run("Bio-Formats Importer", "open="+dir1+name+" color_mode=Default split_channels view=Hyperstack
stack_order=XYCZT");
                selectWindow(""+name+" - C="+Channel+"");
                close("\\Others");
            }
        }
        //Multicolor Channel selection
        if (Cident == 0){
            run("Bio-Formats Importer", "open="+dir1+name+" color_mode=Default split_channels view=Hyperstack
stack_order=XYCZT");
            waitForUser("Multicolor channel selection", "Check wich Image Channel (C-) is of interest");
            Dialog.create("Multicolor channel selection");
            Dialog.addMessage("Choose the Channel of interest (Image title Ending)");
            Dialog.addNumber("Channel of interest C=", 0);
            Dialog.show();
            Channel = Dialog.getNumber();
            Cident++;
            selectWindow(""+name+" - C="+Channel+"");
            close("\\Others");
        }
    }

    //Normal Image opening routine
    } else {

```

```

        run("Bio-Formats Importer", "open=["+dir1+name+"] color_mode=Default split_channels view=Hyperstack
stack_order=XYZCT");
    }

    //picture normalisation
    run("Properties...", "unit=micron pixel_width="+PxSizeXY+" pixel_height="+PxSizeXY+" voxel_depth="+PxSizeZ+");
    run("8-bit");
    run("Grays");
    name=getTitle;
    dir = getDirectory("image");
    run("Duplicate...", "duplicate");
    selectWindow(""+name);
    run("Enhance Contrast...", "saturated=0 normalize process_all use");
    run("Duplicate...", "duplicate");
    selectWindow(""+name+"-2");

    //Nucleus segmentation
    if (Batch == 0) {
        setBatchMode(true);
    }
    if (PreBlur == 1) {
        run("Gaussian Blur...", "sigma="+PBsigma+" stack");
    }

    run("Auto Local Threshold", "method=[Mean] radius="+MNdtt+" parameter_1=0 parameter_2=0 white stack");
    //First ALT for plane segmentation
    if (Despeckle == true){
        run("Despeckle", "stack");
    }
    run("Gaussian Blur...", "sigma="+GBsigma+" stack");
    run("Scale...", "x=0.5 y=0.5 z=1.0 interpolation=Bilinear average process create title=scaledS");
    selectWindow(""+name+"-2");
    run("Close");
    selectWindow("scaledS");
    setMinAndMax(6, 256);
    run("Apply LUT", "stack");
    run("Auto Local Threshold", "method=MidGrey radius="+MNd+" parameter_1=+MidGC+" parameter_2=0 white stack");
    //second ALT for rough Nucleus segmentation
    run("Scale...", "x=2 y=2 z=1.0 interpolation=None average process create title=scaledL");
    selectWindow("scaledS");
    run("Close");
    selectWindow("scaledL");

    if (Batch == 0) {
        setBatchMode("exit & display");
    }

    //Z-Projection and nucleus Watershed
    rename(""+name+"-2");
    run("Invert", "stack");
    //run("Options...", "iterations=1 count=1 do=[Fill Holes] stack");
    run("Duplicate...", "duplicate");
    run("Z Project...", "start="+Zpro+" projection=[Min Intensity]");
    run("Options...", "iterations=10 count=2 do=Dilate");
    run("Adjustable Watershed", "tolerance="+AdWashed+" stack"); //tolerance = segmentation sensibility
    run("Analyze Particles...", "size="+MinNs+"-"+MaxNs+" circularity="+circ+"-1.00 clear add exclude"); //size
exclusion

    //Text in the watershed Images
    selectWindow("MIN_"+name+"-3");

    //ROI creation for nuclei
    countsROI=roiManager("count");
    if (roiManager("count")>0){
        text1=""+countsROI+" nuclei detected";
        setFont("SansSerif", 22, "antialiased"); //font, size and smoothing
        setColor("Red");
        run("RGB Color");
        drawString(text1, 20, 100);
    }

    selectWindow("MIN_"+name+"-3");
    saveAs("Tiff", ""+dir+name+" Watershed");
    run("Close");

    selectWindow(""+name);
    run("Duplicate...", "duplicate");
    selectWindow(""+name+"-4");
    roiManager("Select All");

    if (roiManager("count")>1){
        roiManager("Combine");
    } else {
        if (roiManager("count")==1){ //If only one nucleus is present, this will bypass the roiManager combine
            roiManager("Select", 0);
        }
    }

    run("Colors...", "foreground=red");

    if (roiManager("count")>0){
        run("Draw", "stack");
        saveAs("Tiff", ""+dir+name+" ROI");
        selectWindow(""+name+"-3");
        run("Close");
    }

    //Foci segmentation
    selectWindow(""+name);
    run("Duplicate...", "duplicate");

    if (Batch == 0) {
        setBatchMode(true);
    }

```

```

if (threeDws==true) {
    run("3D Maxima Finder", "radiusxy="+WsXY+" radiusz="+WsZ+" noise="+noise+"");
    selectWindow(""+name+"-3"); // select duplicate!!!
    run("Auto Local Threshold", "method=Median radius="+MFdtt+" parameter_1="+MedPar+" parameter_2=0 white stack");
    rename("Var"); //3D Watershed readout Problems
    run("3D Watershed", "seeds_threshold="+SeedT+" image_threshold="+ImageT+" image=Var seeds=peaks
radius="+WRadius+"");

    selectWindow("Var");
    saveAs("Tiff", ""+dir+name+"-Var");
    run("Close");

    selectWindow("peaks");
    if (F_seed_map==true){
        rename(""+name+"-3Dseeds");
        saveAs("Tiff", ""+dir+name+"-3Dseeds");
    }
    run("Close");

    selectWindow("watershed");
    run("8-bit");
    rename(""+name+"-3");
    run("Auto Local Threshold", "method=Sauvola radius=2 parameter_1=0 parameter_2=0 stack");
    run("Invert", "stack");
} else {
//standart w/o 3D Watershed
    run("Auto Local Threshold", "method=Median radius="+MFdtt+" parameter_1="+MedPar+" parameter_2=0 white stack");
}

if (Batch == 0) {
    setBatchMode("exit & display");
}

countsROI=roiManager("count");
//ROI readout and 3D particle analysis
for(ii=0; ii<countsROI; ii++) {
    if (Batch == 0) {
        setBatchMode(true);
    }
    selectWindow(""+name+"-3");
    roiManager("Select", ii);
    run("Duplicate...", "duplicate");
    setBackgroundColor(255, 255, 255);
    run("Clear Outside", "stack");
    run("3D Objects Counter", "threshold=255 slice=24 min.="+MinFv+" max.="+MaxFv+" exclude_objects_on_edges objects
surfaces statistics summary");
    if (Batch == 0) {
        setBatchMode("exit & display");
    }
//save routine
    selectWindow("Statistics for "+name+"-4");
    saveAs("text...", ""+dir+name+" Statistics"+ii+"");
    run("Close");

    selectWindow("Surface map of "+name+"-4");
    if (Sur_map==true){
        saveAs("Tiff", ""+dir+name+" Surface map"+ii+"");
    }
    run("Close");

    selectWindow("Objects map of "+name+"-4");
    if (Obj_map==true){
        saveAs("Tiff", ""+dir+name+" Objects map"+ii+"");
    }
    run("Close");

    selectWindow(""+name+"-4");
    run("Close");
}

selectWindow(""+name);
run("Invert", "stack");
run("Merge Channels...", "c1=["+name+"-3] c4=["+name+"] create keep");

selectWindow("Composite");
    saveAs("Tiff", ""+dir+name+" Composite"+ii+"");
run("Close");

selectWindow(""+name+"-3");
run("Close");

selectWindow(""+name+"-2");
run("Close");

selectWindow(""+name+"-1");
run("Close");

selectWindow(""+name);
run("Close");

selectWindow(""+name+" ROI.tif");
run("Close");

roiManager("Save", ""+dir+name+"ROI.zip");
}
else{ //when there are 0 nuclei detected
    if (countsROI == 0){
        run("Bio-Formats Importer", "open=["+dir1+name+" Watershed.tif] color_mode=Default split_channels
view=Hyperstack stack_order=XYCZT");
        close("\\Others");
        text1="No nucleus area recognized! Either circularity threshold too high,";

```

```
        text2="nucleus area too small/big or basal z-projection threshold too low!";
        setFont("SansSerif", 22, " antialiased"); //font, size and smoothing
        setColor("Red");
        run("RGB Color");
        drawString(text1, 20, 100);
        drawString(text2, 20, 130);
        saveAs("Tiff", ""+dir+name+" Watershed");
        run("Close");
        run("Close All");
    }
}
selectWindow("ROI Manager");

if (roiManager("count")>0){
    roiManager("Delete");
}

run("Close");
run("Close All");
countsROI = "";
}
if (isOpen("Results")) {
    selectWindow("Results");
    run("Close");
}
Dialog.create("Foci analysis finished");
//when the macro has processed all Images in the given Folder
Dialog.addMessage("Analysis complete!");
Dialog.show();
```

VI) Sourcecode für den Nanofocicounter (basiert auf FocAn-3D)

```

//Variables
run("Close All");
FileEx = "png";
BlurSigma = "8";
MinPd = "1"
MaxPd = "100000"

//Open files
extension = "."+FileEx+"";
dir1 = getDirectory("Choose Source Directory ");
n = 0;
processFolder(dir1);

function processFolder(dir1) {
    list = getFileList(dir1);
    for (i=0; i<list.length; i++) {
        if (endsWith(list[i], "/"))
            processFolder(dir1+list[i]);
        else if (endsWith(list[i], extension))
            processImage(dir1, list[i]);
    }
}

//Focidetection
function processImage(dir1, name) {
    open(""+dir1+name+""");
    run("8-bit");
    run("Duplicate...", " ");
    run("Enhance Contrast...", "saturated=0 normalize");
    setThreshold(0,80);
    run("Convert to Mask");
    run("Invert");
    run("Auto Local Threshold", "method=Mean radius=50 parameter_1=0 parameter_2=0 white");
    run("Gaussian Blur...", "sigma=10");
    run("Gaussian Blur...", "sigma=10");
    run("Enhance Contrast...", "saturated=0 normalize");
    setThreshold(0, 20);
    run("Convert to Mask");
    run("Invert");
    run("Adjustable Watershed", "tolerance=0.7");
    run("Analyze Particles...", "size=3500-Infinity show=Masks display add exclude"); //Foci size exclusion
    rename("1");
    run("Merge Channels...", "c1=[1] c4=["+name+"] keep");
    saveAs("Tiff", ""+dir1+name+" composite");
    run("Close");
    selectWindow("1");
    saveAs("Tiff", ""+dir1+name+" first segment");
    run("Close");
    run("Close");
    selectWindow("Results");
    run("Close");
}

//Rois
countsROI=roiManager("count");
for(ii=0; ii<countsROI; ii++) {
    selectWindow(""+name+""");
    roiManager("Select", ii);
    run("Duplicate...", "duplicate");
    setBackgroundColor(255, 255, 255);
    run("Clear Outside", "stack");
    saveAs("tiff", ""+dir1+name+" "+ii+""");
    run("Duplicate...", " ");
    run("Subtract...", "value=80");
    run("Enhance Contrast...", "saturated=0 normalize");
    run("Duplicate...", " ");
    run("Duplicate...", " ");
    run("Invert");
    run("Auto Local Threshold", "method=MidGrey radius=10 parameter_1=5 parameter_2=0 white"); //nanofoci
}

segmentation
    run("Options...", "iterations=1 count=3 do=Dilate");
    run("Adjustable Watershed", "tolerance=0.1");
    run("Analyze Particles...", "size=4-Infinity show=Masks display exclude"); //size exclusion in px
    selectWindow("Mask of "+name+" "+ii+"-3.tif");
    run("Merge Channels...", "c1=[Mask of "+name+" "+ii+"-3.tif] c4=["+name+" "+ii+"-2.tif] create");
    selectWindow("Results");
    saveAs("text...", ""+dir1+name+" Statistics"+ii+""");
    run("Close");
    selectWindow("Composite");
    saveAs("png", ""+dir1+name+" "+ii+"composite");
    run("Close");
    selectWindow(""+name+" "+ii+"-1.tif");
    run("Close");
    selectWindow(""+name+" "+ii+"-3.tif");
    run("Close");
    selectWindow(""+name+" "+ii+" .tif");
    run("Close");

}

roiManager("Save", ""+dir1+name+"ROI.zip");
roiManager("Delete");

run("Close All");
}

Dialog.create("Foci analysis finished");
Dialog.addMessage("Analysis complete!");
Dialog.show();

```

VII) Repräsentative Westernblotts von verschiedenen Marker Proteinen

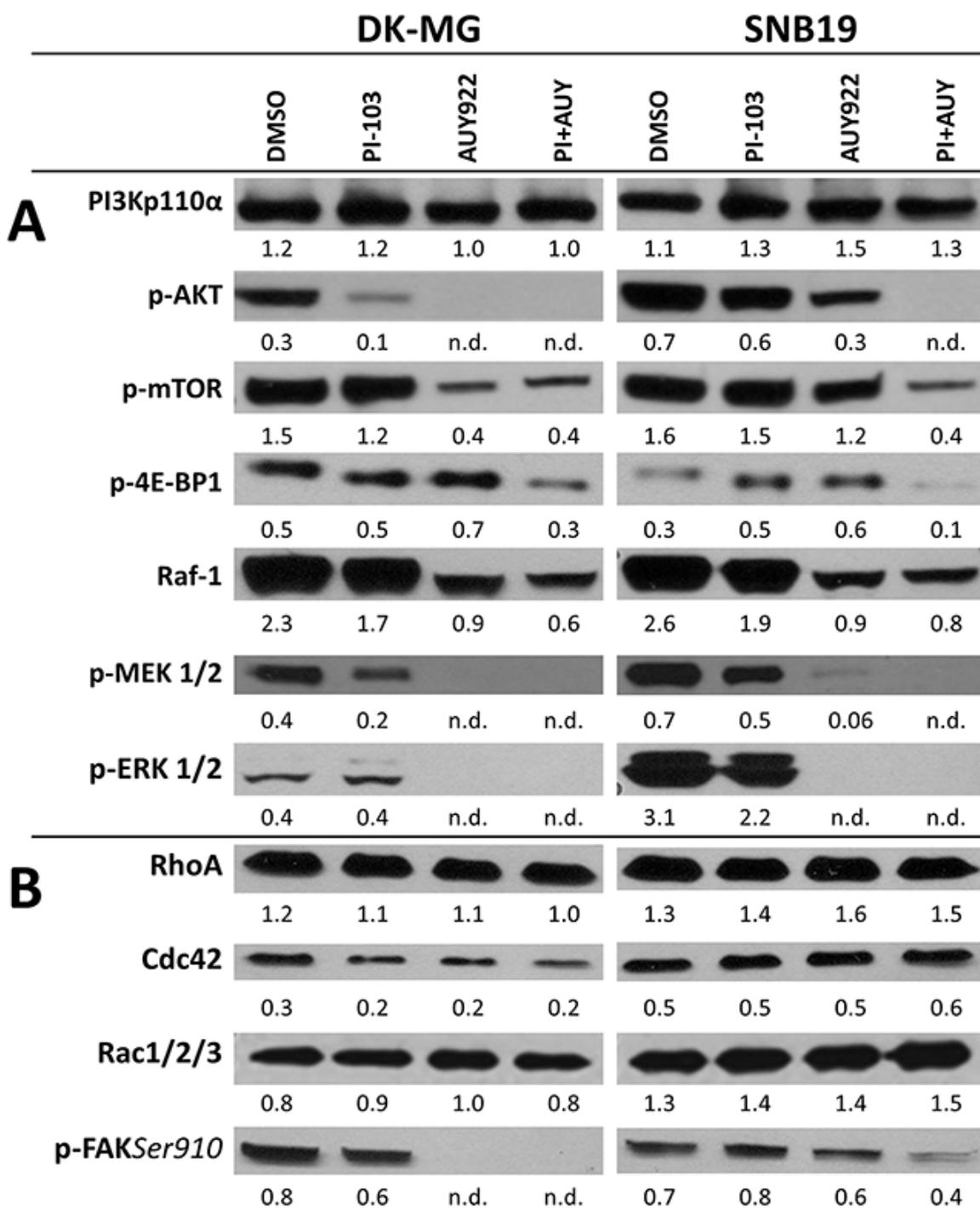


Abbildung 31: Repräsentative Westernblotts von verschiedenen Markerproteinen in DK-MG- und SNB19-Zellen

Die Zellen wurden für 24 h entweder mit DMSO (Kontrolle) oder den angegebenen Inhibitoren behandelt. Teil A zeigt Proteine des PI3K- und Erk-pathways und Teil B Proteine der Rho GTPase (RhoA, Cdc42 und Rac1/2/3) und des fokalen Adhäsionskomplexes (pFAK(Ser910)). Jede Proteinbande wurde auf die Intensität der entsprechenden β -Aktin Ladekontrolle normalisiert. Die Nummern geben die Protein/ β -Aktin Verhältnisse an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

Die dargestellten Westernblotts wurden von Astrid Katzer und Vanessa Fiedler angefertigt

([12]; Memmel et al., *Oncotarget* 8 (2017) 45298–45310 Figure 4). [CC BY 3.0]

Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Automatisierte Algorithmen zur Analyse der Migration und der strahleninduzierten DNA-Schäden humaner Glioblastomzellen nach kombinierter PI3K/mTOR/Hsp90-Inhibierung“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Würzburg, den _____

Signature PhD-student

Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich in Verlaufe dieser Arbeit direkt oder indirekt unterstützt haben.

Ich bedanke mich insbesondere bei...

- meiner Betreuerin Professor Dr. Tcholpon Djuzenova, die mit ihrem Engagement, ihren Anregungen und auch ihrer Kritik wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.
- dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Würzburg Herrn Prof. Dr. Michael Flentje, der diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat.
- dem Inhaber des Lehrstuhls für Biotechnologie und Biophysik der Universität Würzburg Markus Sauer, für die unschätzbare Kooperation und die Möglichkeit einen Großteil meiner Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen sowie die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Arbeit.
- Priv.-Doz. Dr. Vladimir Soukhoroukov für die vielen Anregungen und Diskussionen, die Unterstützung im Verlaufe dieser Arbeit sowie die Betreuung meiner Bachelor und Masterarbeit in Vorbereitung auf diese Dissertation.
- Astrid Katzer und Vanessa Fiedler für die tatkräftige Unterstützung im Zelllabor, die gute Zusammenarbeit im Verlaufe dieser Arbeit und die fachkundige Hilfe in sämtlichen Laborfragen.
- Dmitri Sisario und Lorenz Eing für die gute Zusammenarbeit und anregenden Diskussionen, sowie gute und produktive Atmosphäre im Büro.
- Lisa Behringer-Pließ, Petra Geßner, Albert Gessner, Marcus Behringer, Oliver Reichert und Willibald Bauer für die Unterstützung in der Zellkultur, Mikroskopie und allen anderen technischen Problemen im Verlaufe der letzten ~8 Jahre am Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik

Des Weiteren möchte ich mich bei allen weiteren MitarbeiterInnen der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Würzburg und des Lehrstuhls für Biotechnologie und Biophysik der Universität Würzburg für die nette und produktive Arbeitsatmosphäre bedanken.

Zum Abschluss möchte ich mich bei meiner gesamten Familie bedanken, die mich über die Jahre meines Studiums nicht nur mit ausreichend Essen und Kuchen (<3 Mama) sondern auch in allen weiteren Belangen unterstützt haben.