

**Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus**

**Wirkungsverstärkung von  
Vincristin und Paclitaxel  
auf Glioblastomzellen  
durch TTFields**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Anna Maria Herbinger**

**aus Leonberg**

**Würzburg, Januar 2023**



**Referent:** apl. Prof. Dr. rer. nat. Carsten Hagemann

**Korreferentin:** Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Carola Förster

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 10.10.2023

**Die Promovendin ist Ärztin**

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Glioblastom	
1.1.1	Grundlagen und Epidemiologie	1
1.1.2	Klassifizierung und Molekulargenetik	1
1.1.3	Diagnostik und Klinik	8
1.1.4	Therapie	9
1.2	Vincristin	15
1.3	Paclitaxel	16
1.4	Tumor Treating Fields (TTFields)	
1.4.1	Aufbau und Anwendung als Therapiesystem	17
1.4.2	Wirkmechanismus	19
1.5	Fragestellung der Arbeit	27
2	Materialien- und Methoden	
2.1	Materialien	
2.1.1	Geräte und Materialien	28
2.1.2	Software	29
2.1.3	Chemikalien	29
2.1.4	Zelllinien	30
2.2	Lösungen	
2.2.1	Zellkulturmedium	30
2.2.2	Einfriermittel	30
2.2.3	DMSO-Kontrollmedien	
2.2.3.1	xCELLigence-Versuche	31
2.2.3.2	TTFields-Versuche	31
2.2.4	Zytostatika-Lösungen für TTFields-Versuche	
2.2.4.1	Vincristin	32
2.2.4.2	Paclitaxel	32
2.3	Methoden	
2.3.1	Zellkultur	
2.3.1.1	Zellen splitten	32
2.3.1.2	Zellen auftauen und einfrieren	33

2.3.2	Zellzahlbestimmung	
2.3.2.1	Scepter Zellzählgerät	33
2.3.2.2	Zellen zählen	34
2.3.2.3	Berechnung von Zellsuspensionen	34
2.3.3	EC <sub>50</sub> -Bestimmung	
2.3.3.1	Definition EC <sub>50</sub> -Wert	35
2.3.3.2	xCELLigence	
2.3.3.2.1	Funktionsprinzip	35
2.3.3.2.2	Versuchsdurchführung xCELLigence	
2.3.3.2.2.1	Vorversuche	37
2.3.3.2.2.2	Zellzahlbestimmung	37
2.3.3.2.2.3	Beschichtungstests	38
2.3.3.2.2.4	EC <sub>50</sub> - Bestimmung	38
2.3.3.2.2.5	Mikroskopie	39
2.3.4	TTFIELDS inovitro™ Laborforschungssystem	
2.3.4.1	Gerät und technische Daten	40
2.3.4.2	Vorversuch Vergleich TTFIELDS-Wirkung auf Thermanox und Glas	41
2.3.4.3	Versuchsdurchführung	41
2.3.5	Statistische Auswertung	43
3	Ergebnisse	
3.1	Etablierung und Optimierung des Testsystems	
3.1.1	xCELLigence-Vorversuche	
3.1.1.1	Zellzahlbestimmung	44
3.1.1.2	Beschichtungstests	45
3.1.2	TTFIELDS-Vorversuche	
3.1.2.1	Vergleich TTFIELDS-Wirkung auf Thermanox und Glas	46
3.2	Bestimmung der EC <sub>50</sub> -Werte mit dem xCELLigence Instrument	47
3.3	Messung der Behandlungseffektivität	
3.3.1	Effekt von TTFIELDS und Vincristin- beziehungsweise Paclitaxel-Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf die Proliferation von U87- bzw. GaMG-Zellen	50
4	Diskussion	55

5	Zusammenfassung	60
6	Zusatzabbildungen	
6.1	Absolute Zellzahlen der TTFIELDS-Versuche	
6.1.1	U87 + Vincristin	61
6.1.2	GaMG + Vincristin	61
6.1.3	U87 + Paclitaxel	62
6.1.4	GaMG + Paclitaxel	62
7	Literaturverzeichnis	63
8	Webverzeichnis	94

#### Appendix

I	Abkürzungsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Danksagung	
V	Lebenslauf	

# **1 Einleitung**

## **1.1 Glioblastom**

### **1.1.1 Grundlagen und Epidemiologie**

Obwohl weniger als 2% aller Tumordiagnosen das zentrale Nervensystem (ZNS) betreffen, bleibt die des malignen Hirntumors aufgrund der meist hohen Aggressivität und Mortalität eine der am meisten gefürchteten (Hofer et al., 2021; Simon, 2018).

Die Zahl an Gliomerkrankungen liegt in Europa bei etwa 6 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner:innen pro Jahr und einem mittleren Erkrankungsalter von 63 Jahren bei Männern beziehungsweise 66 Jahren bei Frauen in Deutschland (Hofer et al., 2021; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021). Für das Glioblastom (GBM) im Speziellen liegt die Inzidenz im nordamerikanischen und europäischen Raum im Durchschnitt bei etwa 3 pro 100000 Einwohner:innen pro Jahr (Ohgaki & Kleihues, 2005; Ostrom et al., 2019; Wick, 2021). Mit 67,8% aller bösartigen Hirntumoren in Deutschland bei Frauen beziehungsweise 69,3% bei Männern ist das GBM damit der häufigste hirneigene Tumor bei Erwachsenen und tritt insgesamt etwas häufiger bei Männern auf (Robert-Koch-Institut, 2021; Simon, 2018).

In den meisten Fällen treten gliale Tumoren sporadisch auf, doch es zeigt sich in 5-10% der Fälle auch eine familiäre Häufung, teilweise auch im Rahmen seltener genetischer Syndrome wie dem Lynch- oder Li-Fraumeni-Syndrom (Simon, 2018).

Obwohl sich das Gesamtüberleben in den letzten Jahren durch neue Therapieansätze etwas verbessern konnte, gehört das GBM mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 5-10% weiterhin zu den Tumorarten mit einer der ungünstigsten Prognosen (Kessler et al., 2018a; Ostrom et al., 2019; Simon, 2018; Stupp et al., 2017a; Wick, 2021).

### **1.1.2 Klassifizierung und Molekulargenetik**

Die ersten Versuche einer Klassifizierung für Tumoren des ZNS reichen weit zurück. Der Begriff „Gliom“, als Abgrenzung von Tumoren, die aus den glialen Stützzellen des Hirngewebes entstehen, wurde als solcher bereits erstmals 1863 von Rudolph Virchow in Berlin eingeführt. Dieser nahm auch als erster überhaupt eine Einteilung von

Hirntumoren vor, die lange als Grundlage für weitere Klassifikationen diente (Virchow, 1863). Erste spezifische Klassifizierungen von Gliomen wurden im Jahr 1926 in den USA von Harvey Cushing und Percival Bailey eingeführt. Sie nahmen dabei eine weitere Unterteilung von Gliomen vor, wie zum Beispiel in die Gruppe der Astrozytome, zu denen sie auch das von ihnen damals erstmals so benannte Glioblastoma multiforme einordneten (Bailey & Cushing, 1927). Damit lösten sie den bis dahin üblichen Begriff Spongioblastoma multiforme ab, der 1914 durch Frank Burr Mallory eingeführt worden war (Mallory, 1914), sich aber nicht weiter durchsetzen konnte.

Die Namensgebung stützen sie dabei auf die Annahme, die Entwicklung der Tumoren vollziehe sich aus unreifen Vorstufen glialer Zellen und der makroskopisch, sowie auch histopathologisch sehr „vielförmigen“ Gestalt durch hohe Zellzahlen anaplastischer Gliazellen mit hohen Mitoseraten und Kernatypien (Bailey & Cushing, 1927).

Seit der neu überarbeiteten vierten WHO-Klassifikation 2016 wird das frühere Beiwort „multiforme“ allerdings nicht mehr verwendet, die Abkürzung GBM wurde jedoch weiter beibehalten (Young et al., 2015; Louis et al., 2021).

Im Jahr 1957 wurde durch den Neurologen und Neuropathologen Klaus-Joachim Zülch die erste Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) für Tumoren des ZNS herausgegeben und in den letzten Jahrzehnten mehrfach überarbeitet und neu aufgelegt. 2021 wurde die aktuell fünfte Edition der WHO-Klassifikation der Hirntumoren herausgegeben (Louis et al., 2021). Ein wesentliches Prinzip ist dabei bis heute die Graduierung der verschiedenen Tumoren in vier Dignitätsstufen, wobei die römischen Zahlen in der aktuellen Klassifizierung durch arabische Zahlen ersetzt wurden (Brat et al., 2020; Hofer et al., 2021; Louis et al., 2021; Tabelle 1). Hierbei entspricht Grad 1 benignen, Grad 2 semibenignen und die Grade 3 und 4 entsprechen malignen Tumoren. Das GBM wird als Grad 4 Tumor eingestuft, was definitionsgemäß einem undifferenzierten und hochmalignen Tumor mit sehr schnellem Wachstum und äußerst ungünstiger Prognose entspricht (Louis et al., 2007, 2016, 2021). Während die bisherigen Versionen der WHO-Klassifikation hauptsächlich auf histopathologischen Gesichtspunkten beruhten, berücksichtigt die aktuellste Edition der WHO-Klassifikation nun vor allem auch die in den letzten Jahren

zahlreichen neu gewonnenen Erkenntnisse über relevante molekulargenetische Aspekte (Louis et al., 2021). Daher spielt die rein histologische Gradierung angesichts dieser neuen Erkenntnisse auch in der aktuellen Klassifizierung in Bezug auf die Abschätzung der Prognose keine so bedeutende Rolle mehr (Hofer et al., 2021).

Tabelle 1: WHO-Graduierung von ZNS-Tumoren (Louis et al., 2007, 2016, 2021); WHO= World Health Organisation, ZNS= Zentrales Nervensystem

WHO Grad	Dignität	Eigenschaften	Prognose	Beispiele
1	benigne	hochdifferenziert, sehr langsames Wachstum	kurative Therapie durch operative Entfernung möglich	Pilozytisches Astrozytom, Schwannom
2	semi-benigne	hochdifferenziert, langsames aber infiltratives Wachstum und Rezidivneigung	gute Prognose bei entsprechender Therapie mit Überleben über 5 Jahre, ggf. Übergang in höhere Malignitätsgrade	Diffuses Astrozytom, Oligodendrogliom, Ependymom
3	maligne	wenig differenziert, schnelles Wachstum	ungünstige Prognose mit verkürzter Lebenszeit, medianes Überleben 2-3 Jahre	Anaplastisches Astrozytom/ Oligodendrogliom/ Ependymom
4	hoch-maligne	undifferenziert, sehr schnelles Wachstum, zu Nekrosen neigend	sehr ungünstige Prognose mit signifikant verkürzter Lebenszeit, meist keine effektive Therapie	Glioblastom, Medulloblastom

Zudem fließen die mittlerweile insgesamt sieben Empfehlungen des c-IMPACT-NOW-Konsortiums (Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy – Not Officially WHO) ergänzend mit in die aktuellste Klassifizierung ein (Brat et al., 2018, 2020; Ellison et al., 2019, 2020; Hofer et al., 2021; Louis et al., 2018a, 2018b, 2020; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

Auch die S2k-Leitlinie für Gliome der deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN, Wick, 2021), sowie die evidenzbasierte Leitlinie zur Diagnose und Behandlung von diffusen Gliomen im Erwachsenenalter der europäischen Vereinigung für Neuro-Onkologie (European Association of Neuro-Oncology-EANO, Weller et al., 2021, 2022a, 2022b) wurden 2021 neu aufgelegt und berücksichtigen aktuelle Entwicklungen der molekulargenetischen Diagnosemöglichkeiten. Inwiefern dies womöglich auch die

epidemiologischen Fallzahlen und Prognosefaktoren beeinflussen wird, die aktuell noch rein auf der Grundlage histologischer Einteilungen erhoben wurden und somit aufgrund heterogener molekularer Muster nur noch begrenzte Aussagekraft besitzen, bleibt abzuwarten (Ostrom et al., 2019; Wick, 2021).

Früher wurde eine klinische Einteilung in primäre, also de novo entstandene, und seltenere sekundäre GBM, die sich aus vorbestehenden Astrozytomen niedrigeren Grades häufiger bei vergleichsweise etwas jüngeren Patient:innen entwickelten, vorgenommen. Auch auf molekularer Ebene unterschieden sich die beiden Formen vor allem darin, dass bei sekundären GBM deutlich häufiger eine Mutation des Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)-Gens auftrat, während dies bei primären GBM nur sehr selten der Fall war (Ohgaki & Kleihues, 2013; Simon, 2018). Daher unterteilt die nun aktuelle WHO-Klassifikation mittlerweile diffuse astrozytäre oder oligodendrogliale Gliome primär nach dem Mutationsstatus des IDH-1 und -2-Gens, wobei zwischen IDH-mutierten und IDH-Wildtyp Tumoren unterschieden wird. GBM sind dabei nun immer dem IDH-Wildtyp zugehörig, während IDH-mutierte Astrozytome nicht mehr wie in früheren Klassifikationen zu den GBM gezählt werden, sondern nun als eigenständige Gruppe unter „Astrozytom, IDH-mutiert, ZNS WHO Grad 2-4“ eingeteilt werden (Brat et al., 2020; Hofer et al., 2021; Louis et al., 2021; Abb. 1). In den meisten Fällen handelt es sich dabei um eine Missense-Mutation im Codon 132 bei IDH 1 oder etwas seltener im Codon 172 bei IDH 2 (Brat et al., 2020; Louis et al., 2021; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021). Durch die veränderte Funktion der IDH, einem Enzym des Citratzyklus, kommt es dadurch statt der normalen Umwandlung von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat zu einer Überproduktion und Anhäufung von 2-Hydroxyglutarat. Dieses konkurriert dann mit  $\alpha$ -Ketoglutarat um zahlreiche Bindungsstellen von  $\alpha$ -Keto-glutarat-abhängigen Dioxygenasen und inaktiviert diese (Simon, 2018; Waitkus et al., 2016). Zu diesen Enzymen zählt zum Beispiel auch das normalerweise die Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid, DNA) demethylierende Enzym ten-eleven translocation 2 (TET2), dessen Inaktivierung wiederum zu einer Hypermethylierung zahlreicher Gene, wie unter anderem auch des Promotors der O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), führt und wiederum eine bedeutende prognostische Rolle

spielt (García et al., 2018; Simon, 2018; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021). Vor allem bei IDH-mutierten Astrozytomen kann außerdem ein Verlust der nukleären  $\alpha$ -thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (ATRX)-Gen-Expression nachgewiesen werden, welches für ein Protein codiert, das die telomere DNA stabilisiert (Abb. 1). In Verbindung mit einer häufig zusätzlich auftretenden Mutation des Tumorsuppressorgens TP53, entfällt dann diese Stabilisierung und es entstehen fehlerhafte DNA-Stränge mit verlängerten Telomeren (Killela et al., 2013; Louis et al., 2016, 2018; Simon, 2018; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

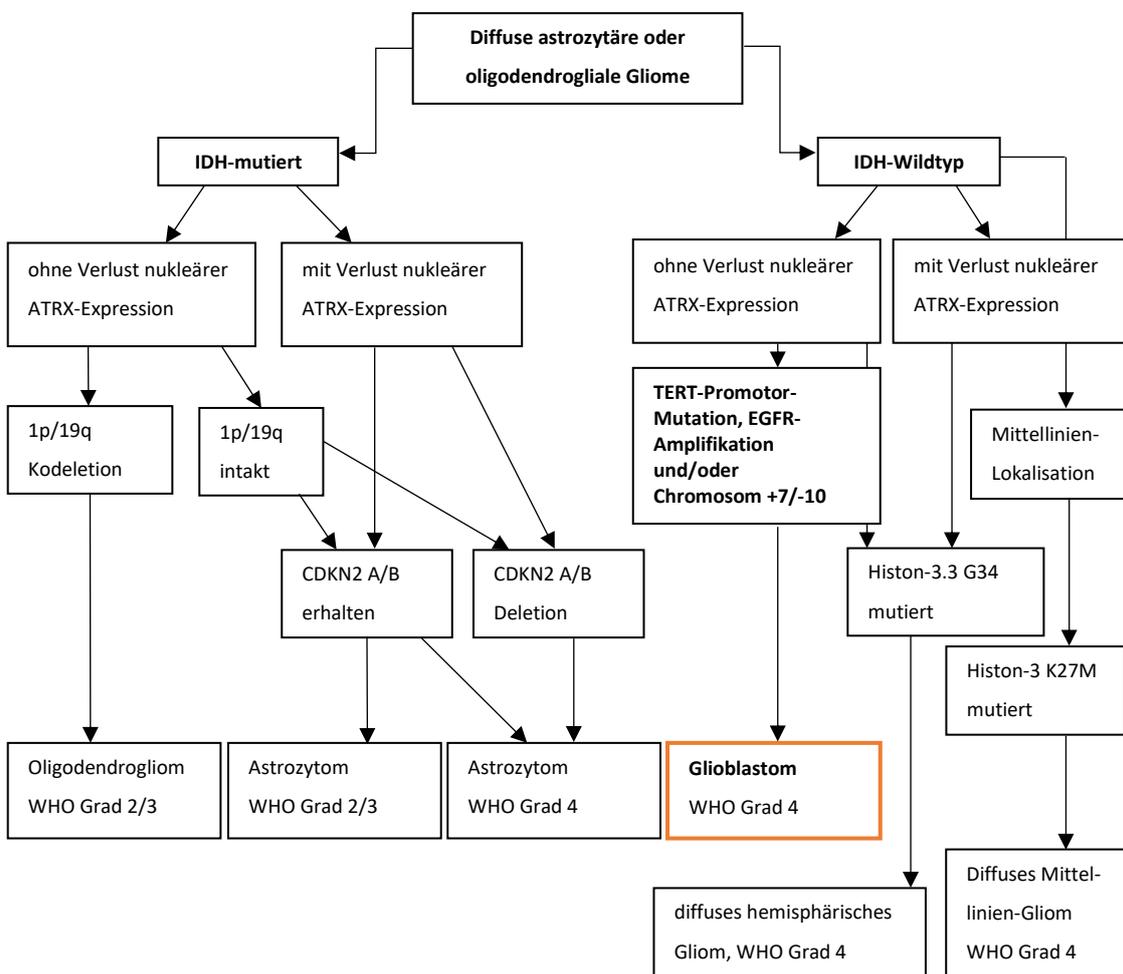


Abbildung 1

Integrierter Diagnosealgorithmus anhand der WHO-Klassifikation für diffuse Gliome im Erwachsenenalter und Empfehlungen des cIMPACT-NOW-Konsortiums, modifiziert nach Weller et al., 2021, 2022a, 2022b & Wick 2021 (open access/CC BY 4.0, Lizenz-Link siehe Abbildungsverzeichnis); ATRX=  $\alpha$ -thalassemia/mental retardation syndrome X-linked-Gen, CDKN2A/B= Cyclin-dependent kinase-inhibitors 2 A/B-Gene, EGFR= Epidermal growth factor receptor-Gen, IDH= Isocitrat-Dehydrogenase-Gen, TERT= Telomerase reverse transcriptase-Gen, WHO= World Health Organisation

Um schließlich bei den Gliomen ohne ATRX-Expressionsverlust die Gruppe der Oligodendrogliome, also Tumoren, die aus den ebenfalls zu den Gliazellen zählenden Oligodendrozyten entstanden sind, abgrenzen zu können, kann über die Deletion der Chromosomenarme 1p und 19q in Zusammenhang mit einer IDH-Mutation die Diagnosestellung erfolgen (Louis et al., 2018, 2021; Simon, 2018; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021; Abb. 1). Sollten 1p und 19q intakt sein, entscheidet letztlich noch die Frage, ob die zyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren 2A und B (cyclin-dependent kinase-inhibitors 2A/B, CDKN2A/B)-Gene erhalten sind über die Zugehörigkeit zum WHO-Grad der Astrozytome (Louis et al., 2016, 2021; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021; Zacher et al., 2017; Abb. 1).

Um zur Diagnose GBM zu gelangen, rücken allerdings noch weitere charakterisierende genetische Merkmale in den Fokus (Abb. 1). So haben etwa 80% eine Mutation im sogenannten Telomerase reverse transcriptase (TERT)-Gen, welches für das Enzym Telomerase, kodiert. Durch Mutationen des Promotors kann es bei Gliomen zu einer höheren Expression kommen, wodurch es zum verminderten Abbau der Telomeren und damit verzögerten Alterung der Zellen, sowie gesteigerten Proliferation kommt (Killela et al., 2013; Simon et al., 2015; Simon 2018; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021). Außerdem treten Amplifikationen des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR)-Gens bei circa 60% der GBM auf. Dadurch werden intrazelluläre Signalwege angeregt, die zur Proliferation und Apoptoseresistenz führen (Hegi et al., 2012; Simon, 2018; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

Weiterhin kommen bei GBM häufig Veränderungen auf den Chromosomen 7 und 10 vor. So werden auf Chromosomen 7 vor allem Gene, die das Tumorstadium steigern, aktiviert und auf Chromosom 10 eher proliferationsunterdrückende Gene, wie zum Beispiel das phosphatase deleted on chromosome 10 (PTEN)-Gen, gehemmt (Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

Schließlich können dann noch anhand spezifischer Lokalisationen und Histon-Mutationen das diffuse Mittelliniengliom, welches hauptsächlich bei Kindern und Jugendlichen vorkommt und trotz IDH-Wildtyp ein Verlust der ATRX-Expression

aufweist (Simon, 2018; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021; Abb. 1), sowie das diffuse hemisphärische Gliom, als spezielle Subgruppierungen abgegrenzt werden (Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021; Abb. 1).

Für die histologische Zuteilung und Gradierung von Hirntumoren werden zusätzlich vor allem die Polymorphie der Zellen und Zellkerne, eine Erhöhung der Zelldichte und der Mitoserate, mikrovaskuläre Proliferationen und das Auftreten von Nekrosen beurteilt (Louis et al., 2007, 2016; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

Über eine Markierung der Ki67-Antigenrate kann zudem eine Aussage über die Stärke der Proliferation des Tumors getroffen werden (Wick, 2021).

Als weitere histologische Arten des GBM werden außerdem noch das Riesenzell-GBM, Gliosarkom und epitheloide GBM unterschieden (Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021). Während das sich durch das Vorliegen von mehrkernigen Riesenzellen auszeichnende Riesenzellglioblastom einen etwas besseren prognostischen Verlauf zeigt (Simon, 2018), haben Gliosarkome, welche sowohl aus glialen, als auch bindegewebigen sarkomatösen Anteilen bestehen, ein besonders aggressives Wachstumsverhalten (Karsy et al., 2012; Simon, 2018).

Insgesamt wird durch diese neue Art der Klassifizierung schließlich eine integrierte Diagnosestellung ermöglicht, in der neben der Gradeinteilung und histologischen auch neue molekulargenetische Kriterien einfließen (Hofer et al., 2021).

Die Diagnose eines GBM, ist also zusammenfassend dann zu stellen, wenn ein Astrozytom vom IDH-Wildtyp ohne ATRX-Verlust oder Histon-H3-Mutation vorliegt und zusätzlich mindestens entweder Nekrosen und Proliferation von Gefäßen, eine Amplifikation des EGFR-Gens, ein Gewinn von Chromosom 7 bei komplettem Verlust von Chromosom 10 oder eine TERT-Promotor-Mutation vorliegen (Hofer et al., 2021; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

Tumoren, bei denen der molekulargenetische Status unbekannt ist oder nicht weiter bestimmt werden kann, werden nach der aktuellen Klassifikation als „not otherwise specified (NOS)“ bezeichnet. Sollten zwar Daten vorliegen, die aber in der aktuellen Klassifikation keiner spezifischen Gruppe zugeordnet werden können, spricht man von „not elsewhere classified (NEC)“ (Louis et al., 2018, 2021).

### 1.1.3 Diagnostik und Klinik

Erste Symptome, die unter einer GBM-Erkrankung auftreten können, sind von sehr variabler Ausprägung und hauptsächlich auch abhängig von der genauen Lokalisation des Tumors. So können bereits kleine Herde in relevanten Gebieten früh auffällig werden oder bei Erstdiagnose bereits fortgeschrittene Befunde auftreten, wobei GBM auch sehr schnell innerhalb weniger Wochen bildmorphologisch neu entstehen können (Körber et al., 2019; Simon, 2018; Wick, 2021).

Häufig sind vor allem krampfartige epileptische Anfälle, die bei bis zur Hälfte der Patient:innen als erstes Symptom auftreten. Außerdem gehören zu weiteren häufigeren möglichen ersten verdächtigen Symptomen neurologische Ausfälle, Veränderungen der Persönlichkeit und erhöhte Hirndruckzeichen wie Übelkeit und Erbrechen, sowie Kopfschmerzen, bis hin zu Eintrübungen des Bewusstseins (Simon, 2018; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

Bei Verdacht auf Vorliegen einer intrakraniellen Raumforderung erfolgt in der Regel standardmäßig zunächst eine Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT), beziehungsweise, sofern dies nicht möglich oder verfügbar ist, mittels Computertomographie (CT), ohne und mit Kontrastmittelgabe (Simon, 2018; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021). Ein girlandenförmiger kontrastmittelanreichernder Randsaum, unscharfe Abgrenzungen, zentrale Nekrosenbildung und ein perifokales Begleitödem sind häufig vorkommende bildmorphologische Kriterien und führen schließlich zur Verdachtsdiagnose eines GBM (Pope et al., 2005; Simon, 2018). Ein GBM liegt meist supratentoriell, nur in etwa 3% der Fälle infratentoriell und nur sehr selten im Bereich des Hirnstamms oder spinal. In der Regel zeigt sich ein tief intraparenchymales Wachstum in der weißen Substanz. Meist treten die Tumoren einseitig auf, eine Ausbreitung entlang spezifischer „myelinisierter Pfade“, wie zum Beispiel dem Corpus callosum, wird aufgrund des charakteristischen Erscheinungsbildes als Schmetterlingsgliom bezeichnet. Nur selten präsentiert sich das GBM multizentrisch, also mit mehreren Herden in unterschiedlichen Lappen oder Gehirnhälften (Simon, 2018). Des Öfteren handelt es sich dabei eher um einen multifokalen Befund, bei dem scheinbar isolierte Herde über nicht kontrastmittelanreicherndes Tumorgewebe in

Verbindung stehen (Simon, 2018; Thomas et al., 2013). Eine extrakranielle Metastasierung tritt beim GBM nur in sehr seltenen Fällen auf (Lun et al., 2011; Stupp et al., 2012). Nur über die Bildgebung können allerdings Differentialdiagnosen wie Metastasen anderer Tumoren zunächst nicht sicher ausgeschlossen und die Dignität nicht eindeutig geklärt werden. Daher ist eine anschließende bioptische Gewebeanalyse zur exakten Diagnose und weiteren Therapieplanung zwingend erforderlich und ermöglicht bei über 90% der Patient:innen eine sichere Diagnosestellung über sich anschließende histologische und molekularpathologische Untersuchungen (Grasbon-Frodl et al., 2007; Zacher et al., 2017; Simon, 2018; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

Zum Ausschluss eines entzündlichen Geschehens kann zudem eine Liquordiagnostik differentialdiagnostisch hilfreich sein (Wick, 2021). Zudem konnte bereits zellfreie Tumor-DNA sowohl im Plasma, als auch Liquor nachgewiesen werden, allerdings stellt deren Analyse zum aktuellen Zeitpunkt noch keinen klinischen Nutzen als Alternativdiagnostik oder gar Möglichkeit zur Früherkennung dar (Miller et al., 2019; Nassiri et al., 2020; Wick, 2021; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b). Des Weiteren gilt es hierbei auch zu beachten, dass eine Lumbalpunktion bei erhöhtem Hirndruck, welcher durch eine intrakranielle Raumforderung gegeben sein könnte, gegebenenfalls bei betroffenen Patient:innen gar nicht durchgeführt werden darf (Wick, 2021).

#### 1.1.4 Therapie

Die aktuell angewandte Standardtherapie bei der Erstdiagnose eines GBM ist multimodal und beruht auf den drei Säulen Operation, Chemo- und Strahlentherapie (Simon, 2018; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

Nach bioptischer Diagnosesicherung erfolgt zunächst, sofern möglich, die Indikation zur Tumorresektion. Aufgrund des diffusen infiltrierenden Wachstumsverhaltens über das makroskopisch Sichtbare hinaus, ist eine vollständige Resektion in der Regel allerdings nicht möglich (Osswald et al., 2015; Sahm et al., 2016; Wick, 2021).

Jedoch kann allein die Verringerung der Tumormasse zu einer Lebensverlängerung und Reduktion der Symptomlast führen. So konnte belegt werden, dass das Ausmaß

der Resektion mit einer verbesserten Prognose korreliert und unter der sich anschließenden adjuvanten Therapie mit einem verlängerten Gesamtüberleben einhergeht (Eyüpoglu et al., 2013; Pichlmeier et al., 2008; Simon, 2018; Stummer et al., 2012). Um eine verbesserte Orientierung zur Auswahl des optimalen Zugangswegs zu erhalten und nachweislich eine Verbesserung des Resektionsausmaßes ohne zusätzliche neurologische Defizite zu erzielen, wird für die operative Planung heutzutage standardisiert die sogenannte Neuronavigation angewandt, bei der präoperativ angefertigte Bildgebung auf den aktuellen Situs während der Operation übertragen wird (De Witt Hamer et al., 2012; Simon, 2018). Außerdem ermöglicht der seit 2016 zugelassene fluoreszierende Farbstoff 5-Aminolävulinsäure (5-aminolevulinic acid, 5-ALA, Handelsname Gliolan®), welcher den Patient:innen oral vor Operationsbeginn verabreicht wird, durch die intraoperative optische Visualisierung der Tumorzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie ein nochmals verbessertes und gezielteres Resektionsausmaß (Simon, 2018; Stummer et al., 2006; Zhao et al., 2013). Primäres Ziel der Resektion bleibt die makroskopische Komplettresektion, also kein bildmorphologischer Tumornachweis mehr im postoperativen MRT, da dies insgesamt mit einem verbesserten Gesamtüberleben einhergeht. Dies konnte durch die 5-ALA-Technik zwar verbessert werden, dennoch gelingt eine Komplettresektion auch unter modernsten Operationsmethoden heute nur in etwa 30-40% der Fälle (McGirt et al., 2009; Sanai et al., 2011; Simon, 2018; Stummer et al., 2008; Wick, 2021).

Im Sinne des standardgemäßen multimodalen Therapieansatzes erfolgt dann postoperativ eine lokale fraktionierte Strahlentherapie mit insgesamt 60Gy á 1,8-2 Gy pro Sitzung (Laperriere et al., 2002; Simon, 2018; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021). Eine Hypofraktionierung der Dosis bei einer Gesamtdosis von 40Gy kann bei älteren Patient:innen und schlechter Prognose bei ähnlicher Effektivität und besserer Verträglichkeit ebenso in Erwägung gezogen werden (Perry et al., 2017; Roa et al., 2004; Simon, 2018; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

Bei jüngeren Patient:innen vor dem 70. Lebensjahr und guter allgemeiner Verfassung erfolgt begleitend dazu eine kombinierte Chemotherapie nach dem sogenannten Stupp-Schema. Diese adjuvante Radiochemotherapie besteht neben der Bestrahlung

mit einer Gesamtdosis von 60Gy fraktioniert in 30 Dosen á 2Gy mit einem Abstand von 2-4 Wochen nach der Operation über insgesamt 6 Wochen aus einer begleitenden täglichen Gabe von Temozolomid (TMZ, Handelsname Temodal®) in einer Dosierung von 75mg pro m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Daraufhin erfolgt eine Therapiepause von 4 Wochen, bevor weitere 6 Zyklen á 28 Tage mit je 5 TMZ-Behandlungstagen mit 150 ansteigend bis 200mg pro m<sup>2</sup> Körperoberfläche folgen (Stupp et al., 2005). Eine Intensivierung dieser Dosierung konnte gegenüber der standardisierten Dosis keinen weiteren Vorteil erbringen (Gilbert et al., 2013).

Erprobt hatte dieses Therapieschema eine randomisierte klinische Studie der Europäischen Organisation für Krebsforschung und -behandlung (European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTC) und der Studiengruppe des nationalen Krebsinstituts in Kanada (National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, NCIC). Dabei waren insgesamt 573 erstdiagnostizierten GBM-Patient:innen zwischen 18 und 70 Jahren eingeschlossen worden. Es konnte schließlich ein signifikant besseres Gesamtüberleben von im Median 14,6 Monaten im Vergleich zur alleinigen Operation und Strahlentherapie mit nur 12,1 Monaten erreicht werden. Die 2-Jahres-Überlebensrate verbesserte sich dadurch auf 26,5% statt 10,4% ohne TMZ-Therapie, was sich schließlich auch beim 5-Jahres-Überleben zeigte und daher als neuer Standard etabliert wurde, zumal sich durch die zusätzliche Gabe von TMZ keine Verschlechterung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität gezeigt hatte (Stupp et al., 2005, 2009; Taphoorn et al., 2005).

Bei TMZ handelt es sich um ein Zytostatikum aus der Klasse der Alkylanzien, welches durch seine geringe Größe und Lipophilie die Bluthirnschranke vergleichsweise gut durchdringen kann. In der Zelle wird es bei physiologischem pH-Wert in seinen aktiven Metaboliten Metozolomid umgewandelt. Dessen Hauptwirkung führt über eine Alkylierung unter anderem von Guanin-Resten der DNA an der Position O<sup>6</sup> statt zu einer korrekten Bindung von Guanin und Cytosin zu einer fehlerhaften Guanin-Thymin-Bindung. Durch aktivierte DNA-Mismatch-Reparaturenzyme kommt es beim Versuch die Fehlpaarung zu beheben, zu DNA-Schäden wie Einzel- und Doppelstrangbrüchen und in der Folge zur Zell-Apoptose (Agarwala et al., 2000; Jiapaer et al., 2018; Kroner et

al., 2020; Schreck & Grossman, 2018). Als Nebenwirkungen werden unter der TMZ-Therapie häufig Übelkeit, Erbrechen, Obstipation, Kopfschmerzen, Müdigkeit, sowie hämatologische Veränderungen beschrieben (Kroner et al., 2020; Simon, 2018). Für das Ansprechen auf die Therapie mit TMZ spielt dabei der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors eine entscheidende Rolle. So konnte eine Studie von Hegi et al. zeigen, dass Patient:innen mit MGMT-Methylierung und einer Kombinationstherapie aus Bestrahlung und TMZ ein verbessertes Gesamtüberleben von 21,7 Monaten, gegenüber 15,3 Monaten in der Gruppe der Patient:innen, die nur bestrahlt worden war, erzielten. Dieser Benefit durch die zusätzliche Therapie mit TMZ war in der Gruppe der Patient:innen mit nicht methyliertem Promotor nicht signifikant (Hegi et al., 2005). Dies wurde damit begründet, dass eine geringere MGMT-Expression aufgrund eines hypermethylierten Promotors im Allgemeinen zu einem besseren Ansprechen auf TMZ führt, da die Expression des MGMT-Genproduktes physiologischerweise mit einer besseren DNA-Reparaturfähigkeit einhergeht und so zu einer Art „TMZ-Resistenz“ führt (Weller et al., 2010).

Da in der Studie von Stupp et al. von 2005 jedoch nur Patient:innen bis zum 70. Lebensjahr eingeschlossen worden waren, blieb der therapeutische Nutzen bei älteren GBM-Patient:innen zunächst offen. Studien von 2011 durch Reifenberger et al. und 2012 durch Malmström et al. (Nordic) und Wick et al. (NOA-08) zeigten, dass bei älteren Patient:innen der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors als Marker für die Entscheidung, ob eine Chemotherapie mit alkylierenden Substanzen wie TMZ eingesetzt werden sollte, gerade auch wenn eine kombinierte Radiochemotherapie nicht möglich ist, genutzt werden kann. Eine alleinige Strahlentherapie wurde dabei als indiziert angesehen, wenn keine Methylierung des MGMT-Promotors vorliegt oder der Methylierungsstatus nicht bekannt ist (Malmström et al., 2012; Reifenberger et al., 2011; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick et al., 2012, 2021). Perry et al. konnten 2007 belegen, dass eine TMZ-Gabe in Kombination mit einer hypofraktionierten Radiatio auch bei älteren Patient:innen mit MGMT-Methylierung gegenüber alleiniger Bestrahlung von Vorteil ist. Jedoch ergab sich, wenn auch geringer ausgeprägt, ebenso ein Überlebensvorteil für Patient:innen ohne MGMT-Mutation, sodass die alleinige

Entscheidung einer TMZ-Gabe bei älteren Patient:innen nur über den Status der MGMT-Methylierung fraglich bleibt (Perry et al., 2017; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

Außerdem korreliert auch die Stärke des Methylierungsgrades, also der Anteil methylierter CpG-Inseln des MGMT-Promotors, mit einer steigenden Ansprechrate auf TMZ und ist ab 30% Methylierung mit dem besten Gesamtüberleben verbunden (Brigliadori et al., 2016). Während jedoch zunächst die Annahme bestand, dass sich der Methylierungsstatus im Verlauf nicht mehr verändert und daher nur einmalig bei Stellung der Erstdiagnose erhoben werden sollte, konnte dies zwischenzeitlich durch verschiedene Studien widerlegt und gezeigt werden, dass zuvor methylierte GBM im Verlauf der Therapie oder wenn sie rezidivieren nicht mehr methyliert waren oder umgekehrt, wobei ersteres öfter der Fall war (Brandes et al., 2010; Jung et al., 2010, Feldheim et al., 2019). Zudem kann es wahrscheinlich sogar zu verschiedenen Ausprägungen der Methylierung in verschiedenen Regionen innerhalb desselben Tumors nach Therapie kommen (Feldheim et al., 2019; Parkinson et al., 2008). Die genaueren Gründe für diese Veränderungen sind allerdings weiterhin noch nicht vollständig geklärt und inwiefern dies diagnostische Konsequenzen wie etwa durch eine wiederholte Testung der MGMT-Methylierung im Verlauf der Therapie oder im Rezidivfall haben könnte, beziehungsweise ob sich daraus vielleicht sogar ein therapeutischer Ansatz durch zusätzliche Verabreichung von MGMT-Inhibitoren, wie zum Beispiel O<sup>6</sup>-Benzylguanin (Pegg et al., 1993; Quinn et al., 2005, 2009; Weingart et al., 2007) oder Disulfiram (Paranjpe et al., 2014), ergeben könnte, ist aktuell noch nicht hinreichend beforscht.

Insgesamt hat TMZ seit der Etablierung des Stupp-Schemas zudem auch die zuvor oft eingesetzten Nitrosoharnstoffe wie Lomustin (Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea, CCNU) weitestgehenden abgelöst. Jedoch finden diese zum Teil noch weiterhin beim rezidivierten GBM Anwendung (Schmidt et al., 2006; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021). Außerdem konnte in neuen Studien beim Einsatz einer Kombinationstherapie von TMZ mit Lomustin eine Verlängerung des mittleren Gesamtüberlebens gegenüber der alleinigen TMZ-Therapie in einer Studienkohorte

von Patient:innen mit methyliertem MGMT-Promotor erreicht werden und stellt gegebenenfalls einen weiteren neuen Therapieansatz in Aussicht (Herrlinger et al., 2019). Auch ein lokaler Therapieansatz mit dem Nitrosoharnstoff Carmustin (Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea, BCNU) erbrachte bei Gliompatient:innen vom Grad 3-4 mittels postoperativ in die Resektionshöhle eingesetzter Implantate (Handelsname Gliadel®) einen leichten Vorteil im Gesamtüberleben, konnte sich jedoch insgesamt, auch wegen verbundener Komplikationen wie vermehrten Wundheilungsstörungen, nur wenig durchsetzen und findet heute nur noch selten klinische Anwendung, zumal sich der Wirkungseffekt für Grad 4 Tumoren alleine nicht mehr als signifikant erwiesen hatte (Brem et al., 1995; Simon, 2018; Westphal et al., 2003; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

Im Falle eines GBM-Rezidivs ist im Gegensatz zur Primärtherapie weiterhin kein Standard etabliert. Hier muss individuell entschieden werden, ob eine erneute Operation, Strahlentherapie oder Chemotherapie in Betracht kommt (Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021). Für die Chemotherapie kommen dabei entweder erneut TMZ oder, wie bereits erwähnt, Nitrosoharnstoffe (PCV-Schema, siehe 1.2) infrage, da im Falle eines Rezidivs bislang keine unterschiedliche Wirksamkeit gezeigt werden konnte. Allerdings konnte durch die Therapie mit TMZ zwar kein Vorteil im Gesamt-, dafür aber im progressionsfreien Überleben, und eine verbesserte Lebensqualität erzielt werden (Brada et al., 2010; Hart et al., 2013; Osoba et al., 2000; Yung et al., 2000). Ob eine erneute Therapie mit TMZ anschlägt, hängt dabei wahrscheinlich unter anderem von der Dauer der ersten Therapie und dem Zeitpunkt des Auftretens des Rezidives ab (Wick et al., 2009; Perry et al., 2010).

Für den ebenfalls für die Rezidivtherapie in einigen Ländern außerhalb Deutschlands zugelassenen Antikörper gegen vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (vascular endothelial growth factor, VEGF) Bevacizumab konnte insgesamt kein Überlebensvorteil nachgewiesen werden (Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

Inwiefern diese neuen Erkenntnisse über molekulargenetische Aspekte in der GBM-Diagnostik gegebenenfalls in Zukunft auch für die Therapie durch individuellere Optionen mit gezielteren und verbesserten Wirkspektren relevant werden könnten,

müssen weitere Entwicklungen zeigen (Simon, 2018). Auch eine supportive Therapie durch medikamentös-symptomatische Behandlung, psychoonkologische Unterstützung oder die Anbindung an ein Palliativteam, gehört schließlich noch zum Gesamtkonzept der multimodalen Therapie und kann zum Erhalt der Lebensqualität beitragen (Simon, 2018; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

## **1.2 Vincristin**

Vincristin (VIN) ist ein Vincaalkaloid, welches aus der Pflanze *Catharanthus roseus* gewonnen werden kann und intravenös verabreicht wird (Gidding et al., 1999; Kroner et al., 2020; Below & Das, 2022). In der Regel wird es heutzutage nur noch als Kombinationschemotherapie angewendet und kommt bei Erwachsenen, außer bei der akuten lymphatischen Leukämie, Non-Hodgkin-/Hodgkin-Lymphomen, Lungen- und Mamma-Karzinomen, unter anderem auch bei ZNS-Tumoren zum Einsatz (Below & Das, 2022; Gidding et al., 1999).

Das Zytostatikum VIN wirkt als Mitosehemmer in der Metaphase, indem es an das Protein Tubulin bindet, damit eine Störung der Polymerisierung der Mikrotubuli auslöst und durch die fehlende Bildung des Spindelapparates die Zellteilung stört (Gidding et al., 1999; Jordan, 2012; Kroner et al., 2020; Below & Das, 2022).

Zudem wird der Metaphasen- oder auch Spindelkontrollpunkt (spindle assembly checkpoint, SAC) aktiviert und ein Zellzyklusarrest ausgelöst. Allerdings konnte auch bereits gezeigt werden, dass die Kombination mit einem Inhibitor des SAC die Wirkung von VIN verstärken kann, da trotz fehlerhaftem Spindelfaseraufbau der Zellzyklus fortgesetzt wird und es zu einer Fehlverteilung der Chromosomen kommt (Tannous et al., 2013). VIN ist unter anderem Teil des sogenannten PCV-Schemas, einer Kombinationschemotherapie aus dem lipophilen Zytostatikum Procarbazin (P), dem Nitrosoharnstoff CCNU/Lomustin (C) und dem hydrophilen VIN (V). Bei den beiden erstgenannten Zytostatika handelt es sich um Substanzen, welche durch eine DNA-Alkylierung zu DNA-Schäden wie Quervernetzungen, Strangbrüchen und Mutationen führen und somit die Abläufe der DNA-Replikation stören können (Kroner et al., 2020; Schlegel et al., 2003).

Eine nitrosoharnstoffbasierte Therapie wurde für GBM hauptsächlich vor der Einführung des Stupp-Schemas 2005 eingesetzt und findet heute meist nur noch in der Rezidivtherapie Anwendung (Kappelle et al., 2001; Schlegel et al., 2003; Weller et al., 2021, 2022a, 2022b; Wick, 2021).

Die Kodeletion von Chromosom 1p/19q in Kombination mit einer IDH -Mutation scheint hierbei ein prädiktiver Marker für das Therapieansprechen auf das PCV-Schema zu sein. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine Kombinationsbehandlung mit Strahlen- und Chemotherapie nach dem PCV- Schema im Vergleich zur Strahlentherapie alleine bei Patient:innen mit anaplastischen oligodendroglialen Tumoren mit 1p/19q-Kodeletion zu einem deutlich verlängerten Überleben führte (Schlegel et al., 2003; Van Den Bent et al., 2013; Cairncross et al., 2013).

Neben den Nebenwirkungen, wie vor allem der Neurotoxizität, limitiert allerdings auch die geringe Bluthirnschrankengängigkeit insgesamt die Anwendung von VIN in der Gliomtherapie (Hofer et al., 2021). Weitere Nebenwirkungen, die unter der Therapie mit VIN relativ häufig auftreten können, sind periphere und autonome Neuropathien, Alopezie, Suppression des Knochenmarks, Phlebitis, orale Mukositis und Kieferschmerzen (Gidding et al., 1999; Kroner et al., 2020).

### **1.3 Paclitaxel**

Paclitaxel (PTX) ist ein Zytostatikum der Gruppe der Taxane und wird hauptsächlich aus der Rinde der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) extrahiert, beziehungsweise heutzutage partialsynthetisch hergestellt (Weaver, 2014; Kroner et al., 2020).

Im Gegensatz zu VIN wirkt PTX als Mikrotubulistabilisierer, indem es die Zusammenlagerung der Tubulindimere über die Bindung an  $\beta$ -Tubuline fördert und damit die Depolymerisation der Mikrotubuli hemmt (Nogales, 2000; Abal et al., 2003). Außerdem kommt es zu einer Ausbildung abnormaler Bündelstrukturen der Mikrotubuli und multiple Aster werden erzeugt. Insgesamt führt dies schließlich zu einer Hemmung der dynamischen Reorganisation des mikrotubulären Netzwerkes, was als Voraussetzung für eine vitale Interphase und mitotische Zellfunktion gegeben sein muss (Jordan et al., 1993, 1996; Terzis et al., 1997).

Auch bei PTX kommt es schließlich zu einer Aktivierung des SAC, weshalb die Zelle in einen mitotischen Arrest gerät und abstirbt (Kelling et al., 2003; Abal et al., 2003). Angewendet wird PTX als intravenöses Chemotherapeutikum unter anderem bei Ovarial-, Mamma- und nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, sowie dem AIDS-assoziiertem Kaposi-Sarkom (Weaver, 2014; Alqahtani et al., 2019; Kroner et al., 2020). Der Einsatz zur Therapie bei ZNS-Tumoren ist allerdings wegen nur sehr schlechter Überwindung der Bluthirnschranke aufgrund des hohen Molekulargewichts von 850 Dalton bisher stark limitiert (Fetell et al., 1997). Erste Ansätze lokaler Applikationsformen, bei denen die Bluthirnschranke umgangen wird, zeigen allerdings Wirkung (Lidar et al., 2004; Walter et al., 1994). Zu den häufigsten Nebenwirkungen, die unter PTX-Gabe auftreten können, zählen neben der hauptsächlich dosislimitierenden Knochenmarksuppression, eine periphere Neuropathie, Alopezie, Arthralgien oder Myalgien, Nagel-Veränderungen, sowie Überempfindlichkeitsreaktionen (Kroner et al., 2020).

## **1.4 Tumor Treating Fields (TTFields)**

### **1.4.1 Aufbau und Anwendung als Therapiesystem**

Einen der neuesten vielversprechenden Ansätze in der GBM-Therapie stellt der Einsatz sogenannter Tumor Treating Fields (TTFields) dar. Bei diesen Tumortherapiefeldern handelt es sich um alternierende Wechselstromfelder geringer Stärke mit 1-3V/cm und einer intermediären Frequenz von 100-300kHz, wobei für GBM eine Frequenz von 200kHz die beste Wirkung zeigte (Giladi et al., 2015; Porat et al., 2017). Die biologischen Wirkeffekte elektrischer Felder auf Zellen war vor allem für niedrige und hohe Frequenzen schon länger bekannt, während elektrischen Feldern mittlerer Frequenz zunächst wenig Bedeutung zugemessen wurde und erst in neuster Zeit die antimitotische Wirkung bekannt und therapeutisch relevant wurde (Davies et al., 2013; Giladi et al., 2015; Kirson et al., 2004, 2007). TTFields wurden 2011 erstmals von der U.S. Food & Drug Administration (FDA) zur alleinigen Anwendung bei rezidierten GBM und 2015 schließlich auch für die Therapie bei erstdiagnostizierten GBM bei Patient:innen über 18 Jahren in Kombination mit einer TMZ-Erhaltungstherapie

zugelassen (FDA 2011, 2015). Hersteller des Therapiesystems OPTUNE® ist die Firma Novocure. Es handelt sich um ein ambulantes und insgesamt nicht invasives Verfahren, indem Keramikgelpads (INE Transducer Arrays), durch welche die Wechselstromfelder appliziert werden, direkt auf die rasierte Kopfhaut der Patient:innen aufgeklebt werden (Abb. 2 A). Durch den Anschluss an ein tragbares batteriebetriebenes Gerät, welches als Rucksack oder Umhängetasche mitgeführt werden kann, sind die Patient:innen bei laufender Therapie damit völlig frei beweglich (Abb. 2 B). Die INE-Elektroden sollten zweimal wöchentlich gewechselt werden, was in der Regel nach Einweisung selbstständig durch die Patient:innen zu Hause erfolgen kann (Murphy et al., 2016; Novocure, 2021a, 2021b).

Für eine optimale Wirkung bedarf es jedoch einer hohen Mitarbeit seitens der Patient:innen, da empfohlen wird, die TFields mindestens 18h am Tag zu applizieren, was einer Compliance von 75% im Monat entspricht. Die Compliance sollte mindestens 50% betragen, um überhaupt einen Vorteil im Gesamtüberleben gegenüber der alleinigen TMZ-Therapie erzielen zu können. So konnte gezeigt werden, dass der Effekt für ein verlängertes Gesamtüberleben umso besser ist, je länger die TFields appliziert werden und mit einer Compliance von über 90% im Monat schließlich die größtmöglichen Effekte erreicht werden können (Kanner et al., 2014; Toms et al., 2019). Auch die Einführung einer neuen zweiten und wesentlich leichteren Generation von Optune-Geräten soll zu einer besseren Compliance beitragen (Kinzel et al., 2019). Mittlerweile wird auch in der aktuellsten S2k-Leitlinie für Gliome der DGN empfohlen GBM-Patient:innen die TFields als Therapieoption anzubieten (Wick, 2021).

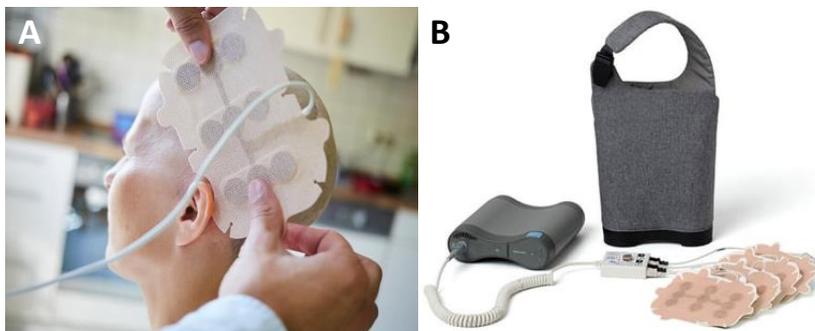


Abbildung 2

A: Anbringen der INE-Elektroden auf der rasierten Kopfhaut und B: Optune-Gerät mit Konnektor und Arrays, Aufnahmen aus der Novocure Bildergalerie, Verwendungsgenehmigung von Novocure vorliegend

### 1.4.2 Wirkmechanismus

Um den Wirkmechanismus der TTFIELDS verstehen zu können, muss zunächst der Ablauf des Zellzyklus betrachtet werden, der die allgemeine Grundlage für Zellteilung und Zellvermehrung darstellt.

Der Zellzyklus kann in eine Interphase und Mitose (M)- Phase aufgeteilt werden. Letztere ist wesentlich kürzer und stellt die eigentliche Zellteilung dar.

Die Interphase wiederum lässt sich in die drei Abschnitte G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>-Phase unterteilen (Buselmaier, 2012; Lüllmann-Rauch, 2012). In den G-Phasen, von englisch „gap“ für Lücke, befindet sich die Zelle hauptsächlich im Wachstum und der vorbereitenden Produktion von Proteinen und Enzymen für die bevorstehende Zellteilung (G<sub>1</sub>). Außerdem wird die DNA auf mögliche Fehler abgesucht und diese gegebenenfalls repariert (G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub>). In der dazwischenliegenden Synthese (S)-Phase findet die eigentliche Verdopplung der DNA statt, sodass am Ende ein doppelter Chromosomensatz zur Aufteilung auf zwei identische Tochterzellen vorliegt.

Teilt sich eine Zelle dauerhaft oder vorübergehend nicht mehr, spricht man von der G<sub>0</sub>-Phase (Buselmaier, 2012; Lüllmann-Rauch, 2012).

Um den korrekten Ablauf des Zellzyklus zu gewährleisten, existieren drei Kontrollstationen, die die teilende Zelle passieren muss, um den nächsten Abschnitt zu erreichen. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei vor allem Zyklone und zyclin-abhängige Proteinkinasen (cyclin-dependent protein kinases, Cdk). Dabei wird über die Cdk die Aktivität der Zyklone bestimmt, indem diese phosphoryliert und an die Cdk gebunden werden. So wird am G<sub>2</sub>-Kontrollpunkt das Eintreten in die Mitose vor allem über die gesteigerte Produktion von Zyclin B gesteuert, welches wiederum zur vermehrten Bildung phosphorylierender Proteinkinasen führt, die dann entscheidende Proteine zur Einleitung der Mitose aktivieren (Buselmaier, 2012).

In der Mitose selbst wird durch den Kontrollpunkt SAC dann die korrekte Trennung der Chromatiden sichergestellt, indem die Metaphase pausiert, die korrekte Bindung des Spindelapparates an die Chromosomen überprüft (Musacchio & Salmon 2007) und über Dephosphorylierung Proteinkinasen wiederum inaktiviert werden (Buselmaier, 2012). Sollten diese Vorgänge nicht korrekt ablaufen, wird dies durch den SAC erkannt

und die Zellteilung gestoppt (Joglekar, 2016; Kessler et al., 2018). Wenn am G<sub>1</sub>-Kontrollpunkt schließlich noch überprüft wurde, ob die DNA keine Mutationen aufweist und die Mitose korrekt abgelaufen ist, wird über G<sub>1</sub>-Zykline der Zyklin B Abbau inaktiviert und die S-Phase eingeleitet (Buselmaier, 2012).

Die eigentliche Zellteilung selbst läuft dann in der Mitose in sechs verschiedenen Abschnitten ab. In der Prophase finden eine Aufspiralisierung und Kondensation der Chromosomen statt. Die beiden Schwesterchromatiden werden dabei über den brückenbildenden Proteinkomplex Cohesin zusammengehalten. Allerdings trennt sich diese Verbindung während der Kondensation partiell auf, verbleibt aber noch verfestigt am Zentromer. Außerdem bilden sich die Spindelpole aus, es kommt zur Bildung von Mikrotubuli und Ausbildung der Mitosespindel (Buselmaier, 2012; Lüllmann-Rauch, 2012). Im Übergang zur Metaphase wird in der Prometaphase noch die Kernhülle aufgelöst. In der Metaphase selbst werden die Chromosomen dann über die Spindelfasern in der Äquatorialebene angeordnet und damit die Metaphaseplatte gebildet (Buselmaier, 2012; Lüllmann-Rauch, 2012). In der darauffolgenden Anaphase wird die verbliebene Verbindung der Schwesterchromatiden durch die Separase gelöst, die Chromatiden werden getrennt und über die Spindelfasern durch Verkürzung der Mikrotubuli über Depolymerisation zu den jeweiligen Zellpolen gezogen (Buselmaier, 2012; Lüllmann-Rauch, 2012). Es folgt die Telophase, in der nun die Mitosespindel aufgelöst, die Chromatiden wieder entspiralisiert und dekondensiert werden und eine neue Kernhülle entsteht (Buselmaier, 2012; Lüllmann-Rauch, 2012). In der Zytokinese wird schlussendlich über die Bildung eines Schnürringes bestehend aus Aktin- und Myosinfilamenten die Zelle in die beiden Tochterzellen getrennt und alle weiteren Zellbestandteile werden aufgeteilt (Buselmaier, 2012; Lüllmann-Rauch, 2012). Da die Mitosephase an sich nur einen sehr kurzen Zeitraum im gesamten Zellzyklus einnimmt, sind histologisch typische Mitosefiguren selbst in aktiv proliferierendem Gewebe eher selten zu sehen. Vermehrt zeigen sie sich allerdings in Embryonalgewebe und vor allem auch in malignen Tumoren (Lüllmann-Rauch, 2012). Viele Chemotherapeutika, insbesondere die Gruppe der Mitosehemmstoffe, sowie bisher angenommen auch die TTFelds, zielen als antimitotische Therapeutika darauf

ab, den Ablauf der Mitose und Zellteilung zu stören. Sie können daher umso effektiver wirken, je höher die Anzahl an Mitosen ist, und nutzen somit den gerade in tumorösem Gewebe meist gesteigerten Zellumsatz (Buselmaier, 2012; Shahaf et al., 2018; Rominiyi et al., 2021a, 2021b).

Kirson et al postulierte im Jahr 2007, dass die Wirkung der TTFIELDS höchstwahrscheinlich auf zwei Haupteffekten mit den sich in Mitose befindlichen Zellen beruht (Kirson et al., 2007, Abb. 3). In allen vitalen Zellen kann es durch die Beschaffenheit der Zellstrukturen zur Ausbildung von natürlichen elektrischen Feldern kommen, die eine Stärke zwischen 0 und 10V/cm besitzen können (Kirson et al., 2007; Tuszyński et al., 2016). In der Metaphase der Mitose kommt es normalerweise zur Ausbildung des für den korrekten Ablauf der Mitose essenziellen Spindelapparates aus Mikrotubuli durch Tubulindimere, die einen großen Dipolmoment aufweisen. Durch das Anlegen der TTFIELDS wird in dieser Zyklusphase ein homogenes elektrische Feld generiert und polare Moleküle werden Rotationskräften ausgesetzt. Dipole oszillieren dann synchron mit dem Feld, wodurch es zur Störung des dynamischen Prozesses aus Polymerisation und Depolymerisation der Tubulindimere zur Mikrotubulibildung, damit Ausbildung des Spindelapparates und somit schließlich zum Metaphasenarrest kommt (Kirson et al., 2007; Gera et al., 2015b; Rominiyi et al., 2021a, 2021b; Abb. 3 A). Dabei ist die Wirkung der TTFIELDS insgesamt umso stärker, je stärker das Dipolmoment der Moleküle ausgeprägt ist (Gera et al., 2015). Ein großes Dipolmoment besitzt außerdem auch der mitotische Septinkomplex, der für die richtige Position der Teilungsfurche und den Ablauf der korrekten Teilung in zwei Tochterzellen zuständig ist. Seine korrekte Ausrichtung an der Zellmittellinie in der Anaphase wird durch die TTFIELDS dadurch ebenfalls gestört (Gera et al., 2015; Rominiyi et al., 2021a, 2021b). Diese Effekte können im weiteren Verlauf dann schließlich zu einer insgesamt verlängerten Mitose, einer fehlerhaften Chromosomenverteilungen mit Entstehung aneuploider genomisch instabiler Tochterzellen und schließlich dem mitotischem Zelltod führen (Giladi et al., 2015b; Kirson et al., 2007).

Schaffen es die Zellen unter den angelegten Wechselstromfeldern trotzdem die Metaphase zu überwinden, bewirken die TTFIELDS zudem in der Anaphase durch die

Ausbildung einer Sanduhrform der Zelle zur bevorstehenden Zytokinese die Ausbildung eines inhomogenen elektrischen Feldes. Auf polarisierte Moleküle wird damit eine Nettokraft in Richtung höherer Felddichte ausgeübt und es kommt zur sogenannten Dielektrophorese mit Konzentrierung der Makromoleküle und Organellen in Richtung der mitotischen Furche. Dies wiederum führt zur fehlerhaften Lage und Funktion der kontraktilen Elemente, sowie ektopischer Furchenbildung und Bläschenbildung der Membran, endet letztlich in einem Arrest der Zellen in G0/G1 und kann ebenfalls einen programmierten Zelltod auslösen (Kirson et al., 2007; Gera et al., 2015; Abb. 3 B). Li et al. konnten allerdings 2020 diese ursprünglich angenommen Wirkhypothesen in ihrer theoretischen Studie nur begrenzt bestätigen (Li et al., 2020). Sie und weitere Studien postulieren als wahrscheinlicheren Wirkmechanismus eine durch die TFields bedingte Veränderung des Zellmembranpotentials, wodurch Ionenkanäle so beeinflusst werden, dass es zu einem erhöhten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle kommt. Diese erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentration in der Zelle beeinflusst dann die Spindelfaserbildung und stört schließlich den mitotischen Ablauf (Neuhaus et al., 2019; Li et al., 2020). Neben dieser Hypothese werden weitere Modelle die durch Membrandestabilisierung und -deformierung oder Elektroporation zu einer erhöhten reversiblen Permeabilität der Zellmembran und damit zum Beispiel zu einer verbesserten Aufnahme von 5-ALA oder Chemotherapeutika führen können, diskutiert (Aguilar et al., 2021; Chang et al., 2018; Moser et al., 2022; Abb. 3 C).

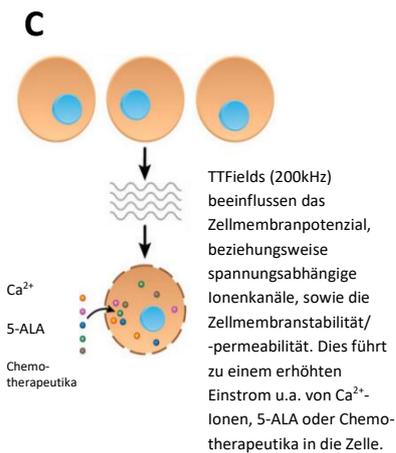
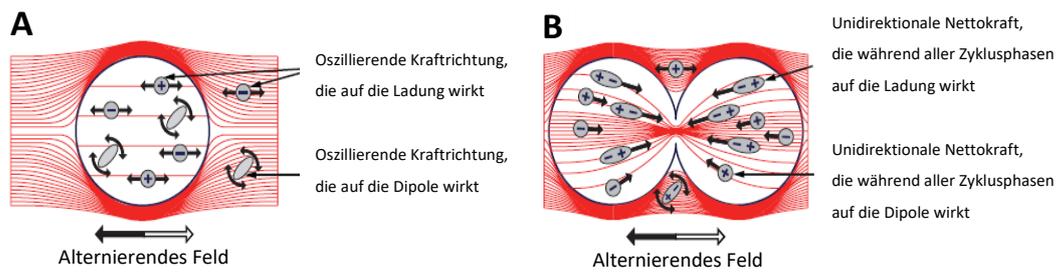


Abbildung 3

Wechselstromfeldverteilung in und um sich nicht teilende und sich teilende Zellen. A: Homogenes Feld bei sich nicht teilenden Zellen, Dipole oszillieren synchron mit dem Feld; B: Inhomogenes Feld bei sich teilenden Zellen, Dipole werden durch Dielektrophorese in Richtung höchster Intensität zur Teilungsfurche gezogen (modifiziert nach Kirson et al., 2007, open access (PNAS open access option)); C: Einfluss der TTFelds auf das Zellmembranpotenzial, beziehungsweise spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanäle, sowie die Zellmembranstabilität/-permeabilität (modifiziert nach Aguilar et al., 2021, open access/CC BY 4.0, Lizenz-Link siehe Abbildungsverzeichnis);

5-ALA= 5-Aminolävulinsäure , TTFelds= Tumor Treating Fields

Ein bekannter Wirkeffekt antimittotischer Wirkstoffe wie zum Beispiel auch von Vinkaalkaloiden oder PTX ist zudem die Aktivierung des SAC, was daher unter anderem zunächst auch als weiterer Wirkeffekt der TTFelds vermutet wurde. Dieser sorgt normalerweise dafür, dass bei einer fehlerhaften Anordnung der Chromosomen kein irreversibler Übergang von der Meta- zur Anaphase mehr stattfinden kann. Die Folge des entstehenden Zellzyklusarrestes kann wiederum ein fehlerhafter Ablauf der Zellteilung mit abnormaler Chromosomenverteilung, mehrkerniger Zellbildung und schließlich Absterben der Zelle sein (Gera et al., 2015; Giladi et al., 2015; Joglekar, 2016; Manchado et al., 2012; Matson & Stukenberg, 2011; Penna et al., 2017; Rominiyi et al., 2021a, 2021b; Weaver & Cleveland, 2005).

Jedoch ist dieser Zellzyklusarrest zeitlich begrenzt und auch ein Umgehen der Mitose durch ein sogenanntes „mitotic slippage“ ist möglich, woraus polyploide Zellen entstehen und es durch mitotische Katastrophe oder Seneszenz zwar wiederum zum Zelltod kommen kann, einige Zellen jedoch danach erneut beginnen zu aneuploiden Nachkommen zu proliferieren (Nakayama & Inoue, 2016; Cheng & Crasta, 2017;

Kessler et al., 2018; Rominiyi et al., 2021a, 2021b). Erstaunlicherweise konnte jedoch mittlerweile gezeigt werden, dass durch ein Umgehen des SAC durch die Kombination mit dem SAC-Inhibitor IN-3 die Wirkung antimitotischer Wirkstoffe wie VIN (Tannous et al., 2013) oder auch TTFIELDS (Kessler et al., 2018) verstärkt werden kann. Außerdem konnten in den letzten Jahren neben den antimitotischen Haupteffekten zahlreiche weitere neue Erkenntnisse über zusätzliche direkte und indirekte Wirkungsweisen der TTFIELDS gewonnen werden, welche unter anderem Rominiyi et al. (Rominiyi et al., 2021a, 2021b), Guo et al. (Guo et al., 2022), Moser et al. (Moser et al., 2022) oder Shams und Patel (Shams & Patel, 2022) in ihren Review-Artikeln zusammenfassen. So wurden unter anderem auch Effekte durch Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden und weiterer Zytoskelettstrukturveränderungen (Tuszynski et al., 2016), sowie ein Einfluss auf DNA-Reparaturmechanismen, autophagy Effekte, antimigratorische Effekte und immunogene Wirkungen nachgewiesen, wobei letztlich der volle Umfang aller Wirkmechanismen bis heute nicht vollständig erforscht ist (Rominiyi et al., 2021a, 2021b; Moser et al., 2022; Guo et al., 2022; Shams & Patel, 2022). So könnte zudem auch der durch die TTFIELDS erzeugte Zellstress eine negative Auswirkungen auf die Zellproliferation haben (Gera et al., 2015; Zhu & Zhu, 2017). Zudem konnte Giladi et al. 2017 zeigen, dass die Wirkung einer Bestrahlungstherapie von Gliomzellen im Anschluss durch die Anwendung von TTFIELDS vermutlich durch eine Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen verstärkt werden kann (Giladi et al., 2017). Des Weiteren inhibieren TTFIELDS die Angiogenese und bewirken dadurch eine Minderdurchblutung von Tumorzellen (Ho Kim et al., 2016, Guo et al., 2022). Außerdem konnte mittlerweile gezeigt werden, dass sich unter der Anwendung von TTFIELDS die Bluthirnschrankendurchlässigkeit erhöht (Keßler et al., 2019; Salvador et al., 2020, 2022; Moser et al., 2022, Guo et al., 2022; Shams & Patel, 2022). In vitro wurden TTFIELDS bereits als Einzel- oder Kombinationstherapien unter anderem mit TMZ, PTX, Doxorubicin, Cyclophosphamid und Dacarbazin getestet und gezeigt, dass es zelllinienabhängig zu additiven oder auch synergistischen Effekten in Kombination mit Strahlen- oder Chemotherapie kommen kann (Kirson et al., 2009; Silginer et al., 2017). Obwohl PTX durch die mikrotubulistabilisierende Wirkungsweise

gegensätzlich zum destabilisierenden Effekt der TFields fungiert, konnte bereits in ersten Studien ein verstärkender Effekt in Kombination mit TFields unter anderem bei Ovarialkarzinomzellen, als auch beim nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt werden (Voloshin et al., 2016; Giladi et al., 2014). Es wird angenommen, dass der kombinierte Effekt der Doppelbehandlung darauf zurückzuführen ist, dass die Tubulindimere, die selbst ein großes Dipolmoment aufweisen, als gemeinsamer Angriffspunkt fungieren. Durch die Stabilisierung der Mikrotubuli durch das PTX kommt es zu einer Vergrößerung der Dipolmomente, an denen die TFields somit länger Ihre Wirkung entfalten können und es daher insgesamt zu einer Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber den TFields durch das PTX kommt (Kirson et al., 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Durchgängigkeit von PTX über die Bluthirnschranke durch die Kombination mit TFields ermöglicht werden kann (Moser et al., 2022; Salvador et al., 2020, 2022). Auch eine Wirksamkeit der TFields und Resensibilisierung von Tumorzellen, die auf herkömmliche Chemotherapien nicht mehr ansprechen, konnte belegt werden und wird vermutlich durch Veränderung des Zytoskeletts und der Mikrotubuli, sowie Verteilung der Mitochondrien erklärt (Schneiderman et al., 2010; Silginer et al., 2017).

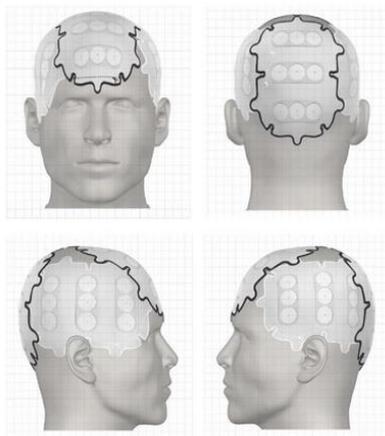


Abbildung 4  
Firmeneigene Planungssoftware  
NovoTAL™, Aufnahmen von Novocure,  
Verwendungsgenehmigung von  
Novocure vorliegend

Die TFields-Wirkintensität ist von der Frequenz, den elektrischen Eigenschaften der Zellen, sowie auch von der örtlichen Ausrichtung der Zellen zum elektrischen Feld abhängig. Sich rechtwinklig zur Feldrichtung teilende Zellen sind keinen dielektrischen Kräften ausgesetzt. Daher werden die INE-Elektroden nach einem individuellen Anordnungsdiagramm angebracht, welches durch eine spezielle Software von Novocure (NovoTAL™) zur Behandlungsplanung je nach Größe und Lage des Tumors eigens erstellt wird, sodass möglichst viele Tumorzellen erreicht und die

Intensität der TFields in der Tumorregion verbessert werden kann (Chaudhry et al., 2015; Kirson et al., 2009; Murphy et al., 2016; Abb. 4).

Klinisch handelt es sich beim Einsatz der TTFields im Allgemeinen um eine sehr nebenwirkungsarme und wenig einschränkende Therapie, da aufgrund der rein lokalen Abgabe und frequenzspezifischen Behandlung ein geringes Toxizitätsprofil vorliegt und gesundes ruhendes Gewebe nicht betroffen ist. Lediglich eine gelegentlich auftretende Kontakt-Dermatitis wird durch den Einsatz der Pflaster auf der rasierten Kopfhaut teilweise beobachtet (Kirson et al., 2007, 2009; Salzberg et al., 2008, Novocure 2021a, 2021b). Kontraindikationen bei denen das Gerät nicht eingesetzt werden darf, sind implantierte medizinische Geräte wie zum Beispiel Hirn-/Rückenmark-/Vagusnerv-stimulatoren, Defibrillatoren, Herzschrittmacher, Schädelknochendefekte, Geschossfragmente im Schädel, signifikante neurologische Erkrankungen wie Demenz, progressive degenerative neurologische Erkrankungen, Vorliegen einer Meningitis oder Enzephalitis, ein Hydrocephalus mit erhöhtem intrakraniellen Druck, in der Schwangerschaft, bei einer Allergie auf leitfähige Hydrogele, sowie unter 18 Jahren (Novocure, 2021a).

Durch den Einsatz von TTFields bei GBM-Patient:innen zusätzlich zur bisherigen Standardtherapie, konnten bereits signifikante Unterschiede sowohl in der progressionsfreien Zeit, als auch im Gesamtüberleben durch verschiedene Studien belegt werden (Stupp et al., 2017a, 2017b; Rulseh et al., 2012; Kirson et al., 2007; Zhu & Zhu, 2017). So erzielte bereits die „EF-11“ Studie von Stupp et al. 2012 bei der Behandlung des rezidierten Glioblastoms mit einer TTFields-Einzeltherapie im Vergleich zu einer Chemotherapie bei beiden Optionen ein medianes Überleben von circa 6 Monaten. Somit konnten beide Ansätze als gleichwertige Einzeltherapieoption beim rezidierten GBM betrachtet werden, mit dem zusätzlichen Vorteil des geringeren Nebenwirkungsprofils der TTFields gegenüber einer Chemotherapie (Stupp et al., 2012; Hottinger et al., 2016). Die Auswertung erster klinischer Daten aus den USA von 2001-2013 über den Einsatz von TTFields bei rezidiertem GBM konnte dann auch ein deutlich längeres Gesamtüberleben unter TTFields-Therapie nachweisen (Mrugala et al., 2014). In der prospektiven internationalen randomisierte Phase III Langzeit-Multizenterstudie „EF-14“ von Stupp et al., bei der insgesamt 695 Patient:innen im Zeitraum von 2009-2014 zum Vergleich von TTFields in Kombination

mit TMZ gegenüber alleiniger TMZ-Therapie eingeschlossen wurden, konnte schließlich eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens um im Durchschnitt 3,7 Monate, sowie der Gesamtüberlebenszeit um durchschnittlich 4,9 Monate auf 20,9 Monate im Vergleich zur alleinigen TMZ-Therapie mit einem Gesamtüberleben von 16 Monaten bei erstdiagnostiziertem GBM erreicht werden. Außerdem überlebten 13% der mit der Kombinationstherapie behandelten Patient:innen 5 Jahre, was nur bei 5% der Patient:innen unter alleiniger Temozolomidtherapie der Fall war (Stupp et al., 2017a).

## **1.5 Fragestellung der Arbeit**

Die Behandlungsoptionen eines GBM sind bislang sehr limitiert. In dieser Arbeit wurden die Zytostatika VIN und PTX, welche die Stabilisierung der Mikrotubuli beeinflussen, in Kombination mit TTFields getestet und untersucht, ob es additive oder sogar synergistische Effekte gibt. Dazu wurden zunächst die  $EC_{50}$ -Konzentrationen für die GBM-Zelllinien U87 und GaMG mit dem xCELLigence-Gerät bestimmt und anschließend definierte Zahlen von GBM-Zellen in unterschiedlichen Kombinationen behandelt. Die Analyse einer eventuellen Wirkungssteigerung wurde durch die Bestimmung der Zellzahlen nach den verschiedenen Behandlungsansätzen durchgeführt.

## 2 Materialien- und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Materialien

Tabelle 2: Geräte und Materialien

Gerät/ Material	Hersteller
Brutschrank Function line 37°C	Heraeus Instruments
Deckgläser Glas, rund 20mm	Hartenstein
Eppendorfgefäße (1ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf
E-Plate® für xCELLigence, Glas	ACEA Biosciences (seit 09/2020 Agilent Technologies)
Fluoreszenzmikroskop Leica DMI3000 B	Leica
Forma Series II Water Jacket, CO <sub>2</sub> Inkubator 18°C	Thermo Scientific
Freezing Container	Nalgene
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Fryka-Kältetechnik
Glaspipetten	Hartenstein
Inkubator Heracell 240i	Thermo Scientific
inovitro™ Laborforschungssystem	Novocure
Kolbenhubpipetten (diverse Größen)	Eppendorf und HTL Discovery Comfort
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Lichtmikroskop	Hund-Wetzlar
Multipette	Eppendorf
Nunc™ Thermanox™ Deckgläser, 22mm	Thermo Scientific
Pipettierhilfe, Accurpette	Integra Bioscience und VWR
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner bio-one
Scepter™ 2.0 Cell Counter	Merck Millipore
Vakuum-Pumpe/ Kompressor	Welch Vacuum, Thomas Industries
Vortexer Vortex Genie2	Scientific industrie
Wasserbad	Hartenstein
6-Well-Platten	Corning Incorporated

xCELLigence RTCA DP Instrument	ACEA Biosciences (seit 09/2020 Agilent Technologies)
Zellkulturflaschen (75cm <sup>2</sup> )	Corning Incorporated
Zentrifuge Mega Star 3.0R	VWR

## 2.1.2 Software

Tabelle 3: Software

Software	Entwickler
Corel Draw X3	Corel Corporation
inovitro™ Systemsoftware	Novocure
GraphPad Prism 6	GraphPad Software
Microsoft Excel	Microsoft Corporation
Picasa	Google Inc./LifeScape
RTCA Data-Analysis Software Version 1.0	ACEA Biosciences (seit 09/2020 Agilent Technologies)

## 2.1.3 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
Collagen A 1mg/ml	Merck Millipore
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Ethanol (70%, vergällt)	Roth
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco by Life Technologies
Fibronectin, 0,05mg/ml	Sigma
Laminin Maus, 1,6mg/ml	Merck Millipore
Nicht essenzielle Aminosäuren (non-essential amino acids, NEAA)	Gibco by Life Technologies
Paclitaxel (PTX)	LC Laboratories
Penicillin/Streptomycin (10000U/ml Penicillin, 10,00µg/ml Streptomycin)	Gibco by Life Technologies

Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS, Dulbecco, w/o Ca <sup>2+</sup> w/o Mg <sup>2+</sup> )	Merck Millipore
Trypsin/ Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Lösung (0,25%/0,02% (w/v) in PBS)	Merck Millipore
Ultra Pure Water	Biochrom
Vincristinsulfat/Vincristin (VIN)	Sigma-Aldrich
Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) mit 1g/l D-Glucose, L-Glutamin, Natriumpyruvat, Phenolrot	Gibco by Life Technologies

## 2.1.4 Zelllinien

Tabelle 5: Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Gewebe	Zelltyp	Alter	Geschlecht	Wachstum	Firma
GaMG	Homo sapiens	Gehirn	Glioblastom	42	weiblich	Monolayer	DSMZ
U87	Homo sapiens	Gehirn	Glioblastom	44	weiblich	Monolayer	CLS

## 2.2 Lösungen

### 2.2.1 Zellkulturmedium

Zum DMEM wurde pro 500ml Flasche 50ml hitzeinaktiviertes FKS, 2ml Penicillin/Streptomycin und 10ml NEAA zugesetzt.

### 2.2.2 Einfriermittel

Zum Einfrieren der Zellen wurde eine Einfrierlösung aus 50% Zellkulturmedium, 40% FKS und 10% DMSO hergestellt.

### 2.2.3 DMSO-Kontrollmedien

#### 2.2.3.1 xCELLigence-Versuche

Um bei den xCELLigence Versuchen zur Ermittlung der EC<sub>50</sub>-Werte für VIN beziehungsweise PTX, einen zusätzlichen Effekt des Lösemittels DMSO auf die Zellen auszuschließen, wurde für jeden Versuch jeweils ein Kontrollmedium mit DMSO angesetzt, welches dieselbe DMSO-Menge wie die entsprechend höchsteingesetzte Zytostatikadosierung bei der jeweiligen Testung enthielt.

Entsprechend der maximalen Konzentration, wurde hierzu für die VIN-Versuchsreihe zunächst eine Verdünnung von 1µl DMSO auf 1000µl Medium erstellt. Für beide Zellreihen entsprachen dann 25µl dieser DMSO-Lösung pro Well der DMSO-Menge der maximal eingesetzten Konzentration von 1,25µM VIN (1:1000 von Stock, 200µl Gesamtvolumen pro Well).

Bei der Testung von PTX wurde 1µl DMSO in 100ml Zellkulturmedium verdünnt und davon 5,32µl pro Well entsprechend 0,63µM maximal verwendeter PTX-Konzentration (1:100 der Vorverdünnung) zugegeben.

#### 2.2.3.2 TFields-Versuche

Auch bei den TFields-Versuchen wurde, um einen zusätzlichen toxischen Effekt auf die Zellen durch die verwendeten Mengen des eingesetzten DMSO ausschließen zu können, dieses als Kontrolle zu den Kontroll- und TFields-Ansätzen zugesetzt.

Entsprechend wurden hierfür 1,1µl DMSO auf 55ml Zellkulturmedium für die Zellreihe U87 beziehungsweise 0,11µl auf 55ml für die Zellreihe GaMG bei den VIN-Versuchen zugegeben (2.2.4.1).

Bei den Versuchen mit PTX entsprach 1,41µl DMSO auf 55ml Zellkulturmedium für beide Zellreihen der maximal enthaltenen DMSO-Menge (2.2.4.2).

## 2.2.4 Zytostatika-Lösungen für TTFIELDS-Versuche

### 2.2.4.1 Vincristin

Für die VIN-Stocklösung wurden 10mg Vincristinsulfat in 1ml DMSO gelöst und somit eine 10mM Stocklösung erzeugt. Diese wurde zunächst 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt, sodass eine 1mM Lösung entstand.

Für die TTFIELDS-Versuche mit U87-Zellen war eine 200nM Lösung erforderlich.

Dies entsprach 11µl der 1mM VIN-Lösung auf 55ml Zellkulturmedium.

Für die Experimente mit GaMG war eine stärkere Verdünnung auf 20nM erforderlich.

Dafür wurde die 1mM Lösung nochmals 1:10 mit Zellkulturmedium auf 0,1mM verdünnt und davon wurden 11µl in 55ml Zellkulturmedium zugegeben.

### 2.2.4.2 Paclitaxel

Es wurden 200mg PTX in 1ml DMSO zur Herstellung einer 234mM Stocklösung gelöst.

Nach einer weiteren Vorverdünnung im Verhältnis 1:100 in DMSO, um ein Ausfällen zu verhindern, erfolgte ein weiterer Verdünnungsschritt von 1:100 in Zellkulturmedium, was eine 23,42µM Lösung ergab.

Um die benötigte 60nM-Lösung für die TTFIELDS-Versuche zu erhalten waren 141µl dieser PTX-Lösung in 55ml Zellkulturmedium erforderlich.

## 2.3 **Methoden**

### 2.3.1 Zellkultur

#### 2.3.1.1 Zellen splitten

Die verwendeten Zelllinien wurden in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Um dauerhaft günstige Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurden die Zellen bei 70-90% Konfluenz gesplittet. Dazu wurde zunächst das Zellkulturmedium abpipettiert und ein Waschgang mit 5ml PBS durchgeführt. Anschließend wurde 2ml Trypsin hinzugegeben und die Flasche für 15min inkubiert. Nach der enzymatischen Ablösung und gegebenenfalls noch vorsichtigem mechanischem Lösen der Zellen durch Beklopfen der Flasche, wurde die

Reaktion dann durch Zugabe von 8ml Zellkulturmedium abgestoppt und im Verhältnis 1:5 gesplittet, indem 2ml der Zelllösung in den Flaschen belassen und der Überstand verworfen wurde. Schließlich wurden die gesplitteten Flaschen nach Zugabe von 15ml frischem Zellkulturmedium wieder in den Inkubator gegeben.

### 2.3.1.2 Zellen auftauen und einfrieren

Zum Auftauen wurden die in den Kryogefäßen tiefgefrorenen Zellen, die zuvor aus den -196°C Stickstofftanks entnommen worden waren, zunächst im 37°C Wasserbad erwärmt, anschließend in eine 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 15ml Zellkulturmedium überführt und schließlich im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie oben beim Splitten beschrieben behandelt. Allerdings wurde mit 4ml Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen wurden bei 800xg für 5min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet langsam in 1ml Einfrieremittel resuspendiert. Zum langsamen Einfrieren wurden die Proben schließlich über Nacht im Freezing Container bei -80°C inkubiert und anschließend in einem Stickstofftank gelagert.

### 2.3.2 Zellzahlbestimmung

#### 2.3.2.1 Scepter Zellzählgerät

Um eine gewünschte Zellzahl zu erhalten, wurden Zellzahlen mit dem Scepter™ 2.0 Cell Counter bestimmt (Abb. 5 A). Das tragbare Zellzählgerät beruht auf dem Prinzip der Widerstandsmessung. Unter Verwendung von 60µm Sensoren (Abb. 5 B) können Partikel zwischen 6 und 36µm erfasst werden. Nach Aufnahme von 50µl Messvolumen passieren die Partikel eine Öffnung im Sensor und führen zu einer Zunahme des elektrischen Widerstandes. Die dadurch nach dem Ohm'schen-Gesetz ( $U = R \times I$ ) ebenfalls

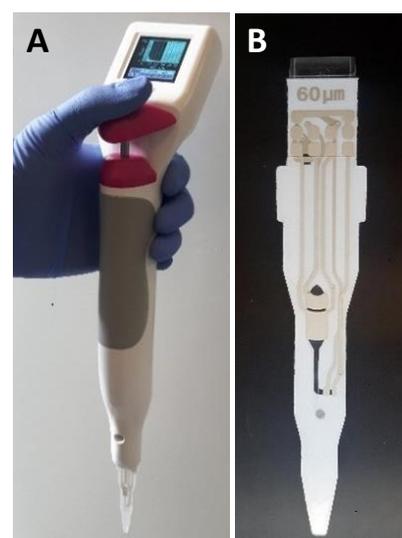


Abbildung 5  
A: Scepter™ 2.0 Cell Counter; B: 60µM Sensor; eigene Aufnahmen

steigende elektrische Spannung kann detektiert und letztlich die gezählte Partikelzahl in einem Histogramm graphisch aufgetragen und abgelesen werden (Merck Millipore, 2011).

### 2.3.2.2 Zellen zählen

Um die Zellzahl der geernteten Zellsuspensionen zu bestimmen, wurden pro Probe 500µl in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Spitze des Messgeräts wurde dann mit heruntergedrücktem Kolben in die Probe eingetaucht und zum Aufnehmen der Probe der Druck auf den Kolben langsam reduziert. Nach abgeschlossener Messung ertönte ein Signal und das Messgerät wurde wieder entnommen.

Um schließlich nur den vitalen Messbereich mit in die Zellzahl einzuschließen, wurde das Histogramm noch zelllinienspezifisch entsprechend eingegrenzt („Gate low/high“, Tabelle 6). Daraufhin konnte dann das Messergebnis direkt aus dem aufgetragenen Histogramm auf dem Display abgelesen werden.

Tabelle 6: Gates

Zelllinie	Gate low	Gate high
U87	10,09	21,00
GaMG	15,03	25,00

### 2.3.2.3 Berechnung von Zellsuspensionen

Um eine Zellsuspension mit bestimmter Zellzahl zu erhalten, wurden die Zellen wie in 2.3.1.1 beschrieben abgelöst. Allerdings wurde nichts von der Zellsuspension verworfen, sondern die Zellzahl mit dem Scepter™ 2.0 bestimmt und mit nachfolgender Formel berechnet, wie viel Zellsuspension jeweils benötigt wurde, um gewisse Zellzahlen in einem bestimmten Volumen zu erhalten:

$$\frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{\text{gezählte Zellzahl}} \times \text{Volumen}$$

### 2.3.3 EC<sub>50</sub>- Bestimmung

#### 2.3.3.1 Definition EC<sub>50</sub>-Wert

Die mittlere effektive Konzentration (EC<sub>50</sub>-Wert) beschreibt die Dosis eines Wirkstoffes, bei der 50% des zu erwartenden Effektes eingetreten ist, wobei dieser sowohl aktivierender als auch hemmender Art sein kann. Sie wird öfters in Zusammenhang mit der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC<sub>50</sub>-Wert) verwendet. Dieser bezieht sich allerdings vielmehr auf antagonistische Wirkstoffe und gibt die Dosierung an, bei der ein Rückgang um die Hälfte der Reaktion oder einer Bindung vorliegt (Neubig et al., 2003; Web 1).

Die Bestimmung erfolgt anhand der Dosis-Wirkungskurven eines Pharmakons, wobei sich diese bei EC<sub>50</sub> und IC<sub>50</sub> spiegelbildlich verhalten (Web 1).

In der Regel ist hierbei der relative EC<sub>50</sub>-Wert gemeint, der den Wendepunkt der Dosiswirkungskurve repräsentiert. Der absolute Wert beschreibt hingegen den erreichten Mittelwert zwischen dem Minimal- und Maximalwert, besagt durch diese Abhängigkeit aber somit wenig über die tatsächliche Wirkstärke aus und ist daher für andere Fragestellungen besser geeignet. Der relative und absolute Wert entsprechen sich, wenn der Minimalwert 0 beträgt (Sebaugh, 2011; Web 1). Für diese Arbeit wurden die relativen EC<sub>50</sub>-Werte bestimmt.

#### 2.3.3.2 xCELLigence

##### 2.3.3.2.1 Funktionsprinzip

Das xCELLigence RTCA DP Instrument ist ein auf Impedanz-Messung basierendes Echtzeit-Zellanalysegerät. Dabei handelt es sich um ein nicht-invasives Verfahren, da weder der schwache angelegte Wechselstrom (Testsignal 22mV bei 10kHz, 25kHz und 50kHz), noch die Elektroden selbst das Verhalten der Zellen beeinflussen (ACEA Biosciences, 2013b, 2018; OLS, 2022). Vor jeder Messreihe muss eine Hintergrundmessung durchgeführt werden, damit die Leerwerte durch die Messeinheit später von den Messwerten abgezogen werden können. Auf die E-Plates á 16 Wells mit einem Volumen von 270µl ± 10µl wahlweise aus Polyethylenterephthalat (PET) oder

Glas (Abb. 6 A) werden die Zellen für die Messungen ausplattiert, wobei das verwendete xCELLigence DP-Analysegerät über insgesamt drei Messplätze verfügt, über welche parallel gemessen werden kann (ACEA Biosciences, 2013b; Abb. 6 B).

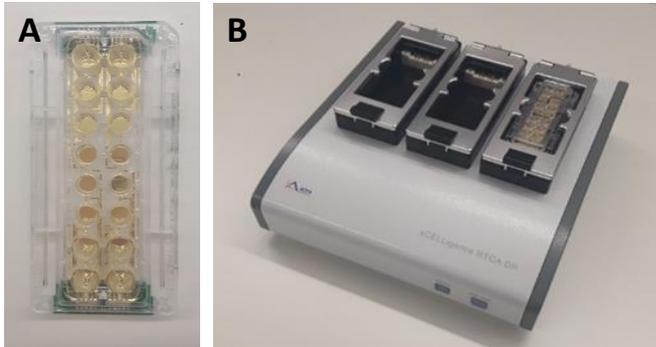


Abbildung 6  
A: 16- Well E-Plate® aus Glas; B: xCELLigence RTCA DP-Analyseeinheit mit drei Messplätzen; eigene Aufnahmen

Über Goldelektroden am Boden der Wells wird die Veränderung der Impedanz, also des Wechselstromwiderstandes, gemessen, der durch die Zellen hervorgerufen wird. Je größer die von den Zellen bedeckte Fläche der Goldelektroden ist, desto höher die Impedanz (ACEA Biosciences, 2013b, 2018; OLS, 2022). Dies wird über die RTCA DP Kontrolleinheit mittels der RTCA Data-Analysis Software 1.0 graphisch dargestellt (ACEA Biosciences, 2013a). Die relative Impedanzänderung wird schließlich über folgende Formel durch die Analysesoftware in einen dimensionslosen Zellindex (CI) umgerechnet und graphisch über die Zeit aufgetragen (ACEA Biosciences, 2010; 2013b):

$$CI(t) = \frac{R(f_n, t) - R(f_n, t_0)}{Z_n}$$

Wobei gilt:

$f_n$  = Frequenz

$R(f_n, t)$  = gemessene Impedanz bei der Frequenz  $f_n$  zum Zeitpunkt  $t$

$R(f_n, t_0)$  = gemessene Impedanz bei der Frequenz  $f_n$  zu Beginn der Messung („Background“)

$Z_n$  = entsprechender Frequenz-Faktor von  $f_n$

Ein Ansteigen des Zellindex kann also insgesamt sowohl zunehmende Proliferation und Adhäsion, aber auch morphologische Veränderungen, wie zum Beispiel ein Aufblähen der Zellen, bedeuten. Sterben die Zellen schließlich zum Beispiel durch die Behandlung mit einem Zytostatikum ab, lösen sie sich wieder ab und der Zellindex sinkt wieder (ACEA Biosciences, 2013b; Langenbach, 2010).

Die RTCA Data-Analysis Software bietet anschließend weitere Auswertungs-

möglichkeiten an. So kann unter anderem direkt eine Dosis-Wirkungs-Kurve, also die Beziehung zwischen dem gemessenen Zellindex (Y-Achse) und der Wirkstoff-Konzentration (X-Achse), erstellt und daraus parallel direkt der EC<sub>50</sub>-Wert bestimmt werden (ACEA Biosciences, 2013a).

Zusätzlich wird dabei auch der sogenannte Square-Parameter mit angegeben. Er gibt Auskunft darüber, inwieweit die Dosis-Wirkungs-Kurve die experimentellen Daten repräsentiert und liegt zwischen 0 und 1. Je näher der Wert an 1 liegt, desto besser ist die Repräsentanz der Daten (ACEA, 2010).

### 2.3.3.2.2 Versuchsdurchführung xCELLigence

#### 2.3.3.2.2.1 Vorversuche

Bevor mit der eigentlichen Testung der Substanzen begonnen werden konnte, waren Vorversuche zur Bestimmung geeigneter Zellzahlen, Material und Beschichtungen der E-Plates des Testsystems xCELLigence für die verwendeten Zelllinien U87 und GaMG nötig.

#### 2.3.3.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Die geeignete Zellzahl von 20000 Zellen pro Well für die Zellreihe U87 wurde bereits im Rahmen einer anderen Arbeit ausgetestet und hier übernommen (Dzokou Njeungou, 2019). Um schließlich noch die Zellzahl für die Zelllinie GaMG zu ermitteln, wurden verschieden konzentrierte Zelllösungen auf eine unbeschichtete Glas-E-Plate ausplattiert. Es wurde eine Abstufung von 40000, 30000, 20000, 15000, 10000, 7500 und 3750 Zellen pro Well jeweils im Doppelansatz aufgetragen (100µl pro Well). Vor Beginn wurde eine Hintergrundmessung mit 100µl Zellkulturmedium durchgeführt. Über den aufgezeichneten Zellindex wurde im Zeitverlauf das Verhalten der Zellen beobachtet.

### 2.3.3.2.2.3 Beschichtungstests

Des Weiteren erfolgte die Testung des geeigneten Materials, sowie der bestgeeigneten Beschichtung der E-Plates. Hierzu wurden jeweils eine Glas- und eine PET-E-Plate im vierfachen Ansatz mit Laminin, Collagen oder Fibronectin mit 50µl pro Well vorbeschichtet. Jeweils vier Wells blieben unbeschichtet.

Dafür wurden 250µl Collagen mit 250µl ddH<sub>2</sub>O für eine 1mg/ml konzentrierte Lösung vermischt und bei -4°C im Kühlschrank verwahrt.

Für die Fibronectin-Beschichtung wurde 1mg in 20ml Aqua dest. gelöst, um eine Konzentration von 0,05mg/ml zu erhalten.

Bei der Beschichtung mit Laminin wurden die herstellerbedingten 1,3mg/ml beziehungsweise 1,6mg/ml konzentrierten Stocklösungen gemäß der Formel

$\frac{\text{gewünschte Konzentration}}{\text{gegebene Konzentration}} \times \text{Volumen}$  auf eine 4µg/ml konzentrierte Lösung verdünnt.

Die Collagen- und Fibronectin- Beschichtungen wurden für 2h bei Raumtemperatur angetrocknet, die Lamininbeschichtung 2h inkubiert und dann mit PBS gewaschen. Nach einer Hintergrundmessung mit 100µl Zellkulturmedium wurden gemäß den Ergebnissen der Vorversuche für die Bestimmung der Zellzahlen für die Zelllinie U87 20000 Zellen/Well beziehungsweise 10000 Zellen/Well für die Zelllinie GaMG in 100µl Zellkulturmedium ausplattiert und der Verlauf des Zellindex wurde über 72h aufgezeichnet.

### 2.3.3.2.2.4 EC<sub>50</sub>-Bestimmung

Zunächst wurden in die unbeschichteten Glas-E-Plates pro Well 100µl Zellkulturmedium pipettiert und es wurde eine Hintergrundmessung mit dem xCELLigence Gerät durchgeführt. Anschließend wurde eine Zellsuspension mit 20000 U87-beziehungsweise 10000 GaMG-Zellen in 100µl Zellkulturmedium erzeugt und pro Well zugegeben (Gesamtfüllmenge 200µl/Well). Daraufhin wurde über 24h alle 15min eine Impedanzmessung durchgeführt. Nach Beendigung dieser 24h-stündigen Adhäsionsphase erfolgte nach Absaugen von 100µl des Überstandes bei beiden

Zelllinien die Zugabe von je 100µl Lösung der Wirkstoffe VIN beziehungsweise PTX in verschiedenen Konzentrationen über Verdünnungsreihen von 1,25µM bis 4,88nM für VIN beziehungsweise 0,63µM bis 4,88nM für PTX.

Außerdem wurden jeweils Kontrollen mit DMSO-Lösungen entsprechend der höchsteingesetzten Zytostatika-Konzentrationen, wie unter 2.2.3.1 beschrieben, angesetzt, um einen zusätzlichen Effekt des Lösemittels auf die Zellen auszuschließen. Die Messabstände wurden auf 15min eingestellt und über 72h durchgeführt.

Die anschließend erhaltenen Messkurven wurden jeweils auf den letzten Messpunkt vor Wirkstoffzugabe normalisiert, um so den Verlauf der Kurven ausgehend vom Zeitpunkt der Behandlung aus beurteilen zu können.

Nach Ablauf der insgesamt 96h des Gesamtexperimentes erfolgte die Auswertung, indem über die RTCA Data-Analysis Software eine Dosis-Wirkungskurve erstellt wurde, aus welcher schließlich die EC<sub>50</sub>-Konzentration errechnet und direkt abgelesen werden konnte. Aus mehreren Versuchen wurde dann der Mittelwert gebildet.

#### 2.3.3.2.2.5 Mikroskopie

Da außerdem einige Auffälligkeiten im Verlauf der Zellindexkurven unter der Behandlung mit PTX beobachtet wurden, wurden, um das morphologische Verhalten der Zellen im Verlauf beobachten zu können, zusätzliche Ansätze zur Betrachtung unter dem Mikroskop ausplattiert. Hierzu wurden zur besseren Anschaulichkeit jeweils 60000 U87-Zellen beziehungsweise 30000 Zellen GaMG pro Well in 6-Well-Platten ausplattiert und entsprechend den höchst eingesetzten Konzentrationen mit 0,63µM PTX, beziehungsweise zum Vergleich mit einer DMSO-Kontrolllösung, behandelt. Zum Vergleich wurde auch eine Behandlung mit 1,25µM VIN- beziehungsweise DMSO-Lösung durchgeführt. Anschließend wurden Aufnahmen mit einem Durchlichtmikroskop direkt, sowie nach 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120min und 24, 48 und 72h nach Zugabe der Zytostatikallösungen in zehnfacher Vergrößerung mit Phasenkontrast aufgenommen.

## 2.3.4 TFields in vitro™ Laborforschungssystem

### 2.3.4.1 Gerät und technische Daten

Das in vitro™ Laborforschungssystem bietet die Möglichkeit der Applikation von TFields in vitro. Über Generatoren werden elektrische Wechselfelder in orthogonaler Richtung in den auf einer Basisplatte angebrachten acht wasch- und autoklavierbaren Keramikschälchen aufgebaut (Abb. 7 A + B).

Über die entsprechende Systemsoftware lässt sich die gewünschte Frequenz (50-500kHz) einstellen, wobei sich für die GBM-Therapie eine Frequenz von 200kHz als am wirksamsten gezeigt hat (Porat et al., 2017). Ob bei laufendem Experiment schließlich alle Messwerte der Sensoren, also Frequenz, Temperatur, Widerstand, Stromstärke und Ausgangsspannung, im optimalen Bereich liegen, lässt sich über eine Graufärbung der angezeigten Messplätze nachvollziehen (Abb. 7 C). Bei Fehlermeldungen sind diese rot hervorgehoben.



Abbildung 7

A: Generator, Basisplatte, Keramikschälchen mit Abdeckungen und Flachband- sowie Mini-USB-Kabel des in vitro™ Laborforschungssystems; B: Keramikschälchen in Detailaufnahme (Aufnahmen aus der in vitro™-Bedienungsanleitung von Novocure, Verwendungsgenehmigung liegt vor); C: Screenshot der Oberfläche der in vitro™ - Systemsoftware, voll besetzte Basisplatte

#### 2.3.4.2 Vorversuch Vergleich TTFields-Wirkung auf Thermanox und Glas

Im Rahmen von Vorversuchen wurde getestet, ob ein Unterschied der TTFields-Wirkung auf Glas- oder Thermanox-Deckgläschen besteht. Hierzu wurden jeweils 30000 U87- beziehungsweise 15000 GaMG-Zellen pro Glas- und Thermanox-Deckgläschen in 350µl Zellkulturmedium ausplattiert, 24h anwachsen lassen und schließlich weitere 24h mit TTFields behandelt. Daraufhin wurde untersucht, ob TTFields auf Glas oder Thermanox einen signifikanten Unterschied in der Zellzahl im Vergleich zur ausplattierten Zellzahl  $t_0$  ergaben, indem die Zellen wie unter 3.4.3 beschrieben geerntet und gezählt wurden.

#### 2.3.4.3 Versuchsdurchführung

Die verschiedenen Ansätze wurden nach dem Versuchsschema in Tabelle 7 angesetzt. Ein vollständiger Versuchsansatz bestand aus 12 TTFields-Einzelbehandlungen, 12 Zytostatika-Einzelbehandlungen mit VIN beziehungsweise PTX, 12 Doppelbehandlungen mit TTFields und dem jeweiligen Zytostatikum, 12 Kontrollansätzen und 5 Ansätzen als Reserve, wobei jeder Ansatz ein Volumen von 350µl besaß, in denen bei U87 je 30000 und bei GaMG 15000 Zellen resuspendiert waren. Es wurde daher ein Mastermix von 18,55ml und 1590000 U87- beziehungsweise 795000 GaMG-Zellen hergestellt. Diese Zellzahlen waren bereits in anderen Arbeiten als optimal bestimmt worden (Kessler et al., 2018; Frömbling, 2020).

Die jeweiligen Zellsuspensionen wurden dann auf in die Keramischälchen und Kontrollplatten eingelegten runden Thermanox-Deckgläschen aufgetragen und für 24h im 37°C CO<sub>2</sub>-Inkubator zum Anwachsen belassen. Anschließend wurde die verbliebene Suspension wieder abpipettiert und jedes Schälchen mit je 2ml VIN-, PTX-Lösung (2.2.4) oder mit DMSO-Kontrollmedium entsprechend der maximal eingesetzten Mengen bei den behandelten Zellen (2.2.3.2) geflutet. Bevor mit dem Experiment im 18°C CO<sub>2</sub>-Inkubator gestartet werden konnte, musste noch die Steckverbindung zwischen den TTFields-Generatoren und den Basisplatten über ein Flachbandkabel hergestellt werden. Alle 24h wurde jeweils das Volumen mit sterilem Wasser wieder auf 2ml aufgefüllt, um ein Austrocknen der Keramischälchen zu verhindern.

Die Gesamtlaufzeit pro Experiment betrug 72h nach Zugabe der Wirkstoffe. Für die Bestimmung eines zeitlichen Verlaufes wurden die Zellen nach 24h, 48h und 72h geerntet. Hierzu wurde zunächst die Flachbandkabelsteckverbindung der entsprechenden Basisplatte mit den Keramikschildchen zum TTFIELDS-Generator gelöst. Die Zellen wurden nach Absaugen des Überstandes und einem Waschgang mit 1ml PBS durch Zugabe von 500µl Trypsin abgelöst. Nach 15min wurde die Reaktion durch Zugabe von 500µl Medium pro Schälchen abgestoppt und mit weiteren 500µl Medium nochmals nachgespült, sodass sich ein Erntevolumen von 1,5ml pro Keramikschildchen ergab. Pro Ansatz und Zeitschritt wurden jeweils vier Schälchen geerntet und die insgesamt 6 ml Zellsuspension pro Ansatz nach jedem Ernteschritt in ein Reaktionsröhrchen überführt. Zum Zählen wurden 500µl der Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß abpipettiert und mit dem Zellzählgerät Scepter™ 2.0 wie unter 3.2.2 beschrieben gezählt. Ebenso wurde mit den Kontrollansätzen verfahren. Insgesamt wurden jeweils vier Versuchsdurchläufe pro Zelllinie und Wirkstoff durchgeführt. Die Auswertung der Kontroll- und TTFIELDS-Gruppen erfolgte für die jeweilige Zelllinie gemeinsam für beide Behandlungsarme (Kontrolle und TTFIELDS n=8).

Tabelle 7: Versuchsansatz TTFIELDS-Behandlung mit VIN beziehungsweise PTX; PTX= Paclitaxel, VIN= Vincristin

Behandlungsgruppe	Ansatz
Kontrolle	12 Wells (2x 6-Well-Platte) á 2ml DMSO-Kontrollmedium
Zytostatikum	12 Wells á 2ml VIN- beziehungsweise PTX-Lösung
TTFIELDS	12 Wells á 2ml DMSO-Kontrollmedium + TTFIELDS-Behandlung mit 200kHz
Kombination	12 Wells á 2ml VIN- beziehungsweise PTX-Lösung + TTFIELDS-Behandlung mit 200kHz
Gesamtansatz	53 (48 Wells + 5 Reserve-Wells) x 350µl (pro Well) = 18,55ml Zellsuspension 55ml (48ml + 7ml Reservelösung) DMSO-Kontrollmedium 55ml (48ml + 7ml Reservelösung) VIN- beziehungsweise PTX-Lösung

### 2.3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch die Verfasserin der Arbeit und unter Anwendung aufgeführter statistischer Software.

Die Datenerhebung der Vorversuche mit dem xCELLigence System zur Ermittlung der EC<sub>50</sub>-Werte wurde mit der RTCA Data-Analysis Software Version 1.0 durchgeführt.

Die Akquirierung der Daten der TTFIELDS-Versuche erfolgte über die invitro-Systemsoftware. Zur Berechnung der Zellzahlveränderungen nach den verschiedenen Behandlungsansätzen wurden die Programme GraphPad Prism 6 und Excel verwendet. Die P-Werte wurden mittels Zweistichproben (two tailed)-t-Test berechnet. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $P = 0,05$  gesetzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung und Optimierung des Testsystems

##### 3.1.1 xCELLigence-Vorversuche

###### 3.1.1.1 Zellzahlbestimmung

Bevor eine Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Konzentration für die zu testenden Substanzen über das xCELLigence Instrument durchgeführt werden konnte, musste zunächst die am besten geeignete auszuplattierende Zellzahl pro Well ausgetestet werden, um ein optimales Adhärenzverhalten der Zellen und beste Proliferationsmöglichkeiten zu gewährleisten (Abb. 8).

Für die Zelllinie U87 wurde die Zahl von 20000 Zellen/Well bereits im Rahmen anderer Versuchsreihen ermittelt und für die folgenden Versuche übernommen (Dzokou Njeungou, 2019; Abb. 8 A).

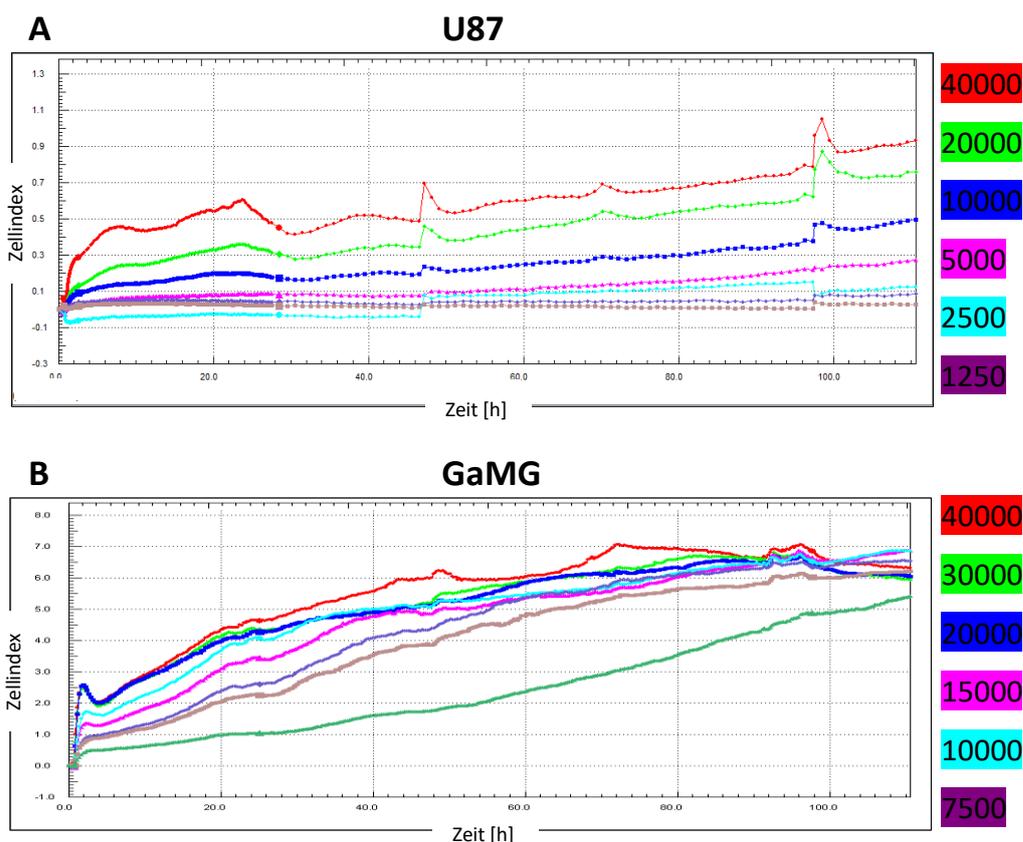


Abbildung 8

Bestimmung der Zellzahlen für optimale Proliferation von A: U87- (Dzokou Njeungou, 2019) und B: GaMG-Zellen auf unbeschichteten Glas-E-Plates; Zellzahlen rechter Bildrand; repräsentative Abbildungen aus n= 4 (U87) beziehungsweise n= 1 (GaMG) Experimenten

Der Zellindex zur Bestimmung der optimalen Zellzahl für die Zelllinie GaMG, orientierte sich an der späteren Versuchslaufzeit und wurde daher nach 72h Behandlungsdauer beurteilt. Nachdem alle Kurven ab 5000 Zellen einen ähnlichen Verlauf aufwiesen, wurde, um ein Überwachsen der Wellfläche zu verhindern, eine mittlere Zahl von 10000 GaMG-Zellen pro Well gewählt, da diese Kurve über den gesamten Verlauf und auch noch nach 72h eine steigende Tendenz zeigte (Abb. 8 B).

### 3.1.1.2 Beschichtungstests

Für das xCELLigence-Versuchssystem stehen sowohl E-Plates aus Glas als auch PET zur Verfügung, die jeweils beschichtet werden können, um ein besseres Anheften und eine optimale Proliferation für jede Zelllinie zu gewährleisten.

Bei der Zelllinie U87 zeigte sich zunächst sowohl auf Glas als auch auf PET die beste Adhäsion auf den Fibronectin beschichteten Wells. Im weiteren Verlauf ergab sich dann aber eine bessere Proliferation auf den unbeschichteten Wells, wobei auch ein vergleichbarer Verlauf bei der Laminin-Beschichtung auftrat. Außerdem ergab sich insgesamt ein etwas höherer Zellindex auf der Glas-E-Plate (Abb. 9 A + B).

Die Zelllinie GaMG wies während der Adhäsionsphase zunächst einen verstärkten Zellindexanstieg auf den collagenbeschichteten Wells auf. Im Verlauf zeigte sich dann aber auch hier das beste Proliferationsverhalten auf den unbeschichteten Wells der E-Plate aus Glas, während auf der PET-E-Plate weiterhin die Collagenbeschichtung zum besten Proliferationsverlauf führte, wobei aber insgesamt höhere Indexwerte auf der Glas-E-Plate erreicht wurden (Abb. 9 C + D).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden für beide Zelllinien für die im Folgenden durchgeführten xCELLigence Versuche zur EC<sub>50</sub>- Bestimmung unbeschichtete Glas-E-Plates verwendet.

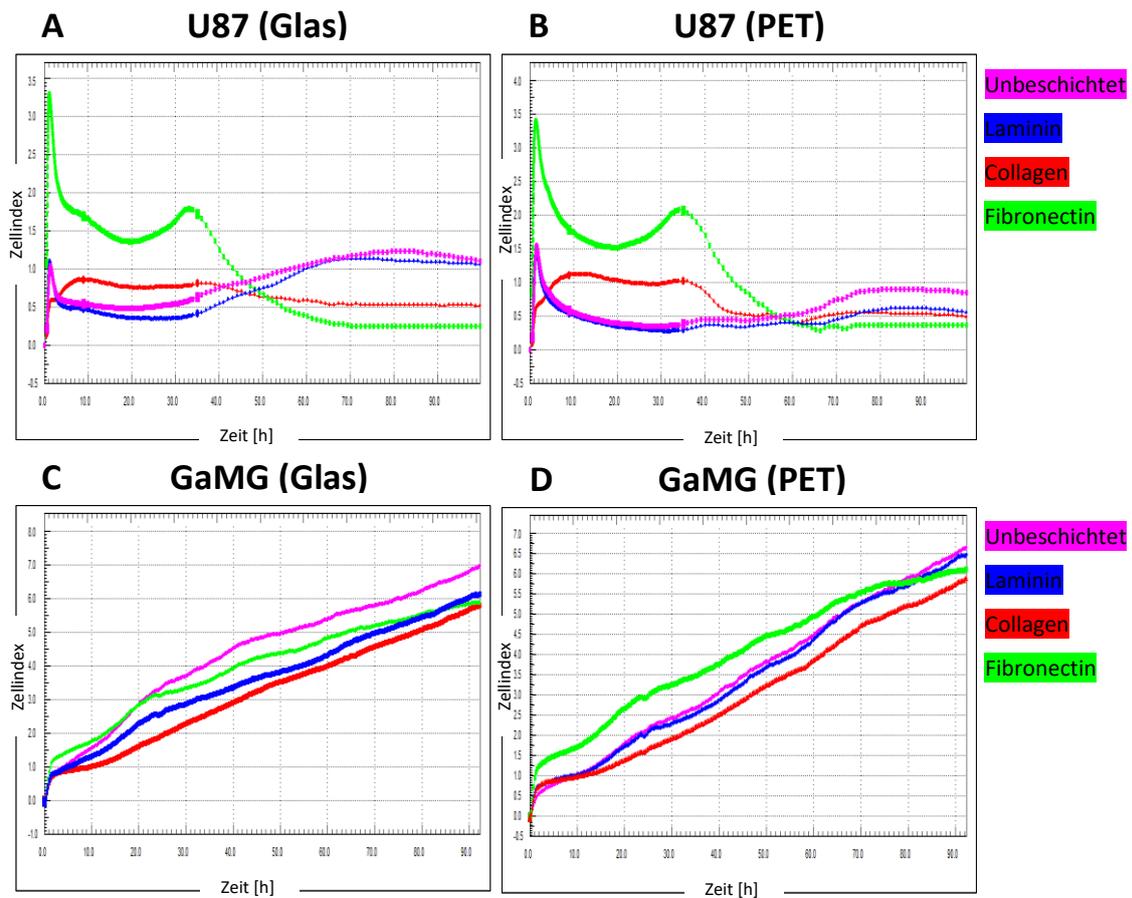


Abbildung 9

Beschichtungstest mit der Zelllinie U87 auf A: Glas-E-Plate und B: PET-E-Plate; sowie der Zelllinie GaMG auf C: Glas-E-Plate und D: PET-E-Plate mit unterschiedlichen Beschichtungen;  $n = 1$  Experiment; PET= Polyethylenterephthalat

### 3.1.2 TFields-Vorversuche

#### 3.1.2.1 Vergleich TFields-Wirkung auf Thermanox und Glas

Im Rahmen der Vorversuche erfolgte außerdem die Testung, ob ein Unterschied der TFields-Wirkung auf Glas- oder Thermanox-Deckgläschen besteht.

Für die Zelllinie U87 auf Thermanox-Deckgläschen ergab sich bereits nach 24h ein signifikanter Unterschied der Zellzahlzunahme von 229% Proliferation der behandelten Zellen im Vergleich zu 377% ( $P = 0,0193$ ) des Kontrollansatzes gegenüber  $t_0$  (Abb. 10 A). Bei den Glas-Deckgläschen hingegen ergab sich in diesem Zeitraum keine signifikante Wirksamkeit.

So ließ sich zwar ein im Vergleich zu Thermanox ähnliches Proliferationsverhalten bei der Kontrolle mit 389% Zunahme im Vergleich zu  $t_0$  erkennen, aber eine insgesamt schlechtere Wirksamkeit der TTFields mit einer Zellzahlsteigerung von 278% (Abb. 10 A). Auch für die Zelllinie GaMG zeichnete sich ein ähnlicher Trend wie bei der Zelllinie U87 ab, allerdings ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (Abb. 10 B). Zudem zeigte sich ein besseres Proliferationsansprechen der GaMG-Zellen auf Thermanox im Vergleich zu Glas-Deckgläschen (Abb. 10 B). Daher wurden für alle Folgeversuche Thermanox-Deckgläschen eingesetzt.

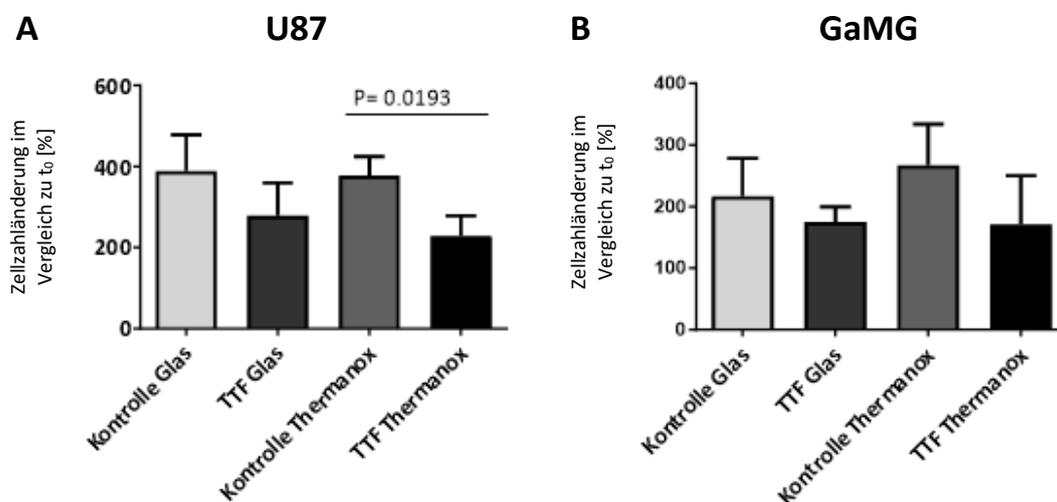


Abbildung 10

Vergleich der TTFields-Wirkung nach 24h auf Glas- und Thermanox-Deckgläschen; A: Zelllinie U87, B: Zelllinie GaMG;  $n=3$  Experimente; TTF= TTFields= Tumor Treating Fields

### 3.2 Bestimmung der $EC_{50}$ -Werte mit dem xCELLigence Instrument

Aus den erstellten Dosis-Wirkungskurven berechnete sich für VIN eine mittlere  $EC_{50}$ -Konzentration von 173nM für U87 ( $n=7$ ) und von 25nM für GaMG-Zellen ( $n=5$ ; Abb. 11). In den nachfolgenden Versuchen wurde daher eine Konzentration von 200nM beziehungsweise 20nM verwendet.

Für PTX ergab sich für U87-Zellen eine  $EC_{50}$ -Konzentration von 72nM ( $n=3$ ) und für GaMG-Zellen von 54nM ( $n=4$ ; Abb. 12). Für beide Zelllinien wurde daher in den Folgeversuchen mit 60nM PTX gearbeitet.

Allerdings zeigte sich bei U87-Zellen im zeitlichen Verlauf nach der Behandlung mit PTX ein auffälliger Messkurvenverlauf. Zunächst setzte ein starker Abfall der ersten Zellindexwerte ein, die im weiteren Verlauf dann wieder anstiegen, wobei höhere PTX-Konzentrationen in höheren Zellindexwerten resultierten als niedrigere Konzentrationen (Abb. 12 A). Daraus ergab sich eine spiegelbildliche Darstellung der Dosis-Wirkungskurve (Abb. 12 B). Die mikroskopische Kontrolle zeigte als frühe Reaktion ein Zusammenziehen und Abkugeln der Zellen. Im weiteren Verlauf ballten sich die Zellen dann zu klumpenartigen Verbänden zusammen und ab 24h kam es zu zunehmenden Abbauprozessen (Abb. 12 C). Im Gegensatz dazu zeigten GaMG-Zellen (Abb. 12 D-F) oder VIN-behandelte Zellen kein solches Verhalten.

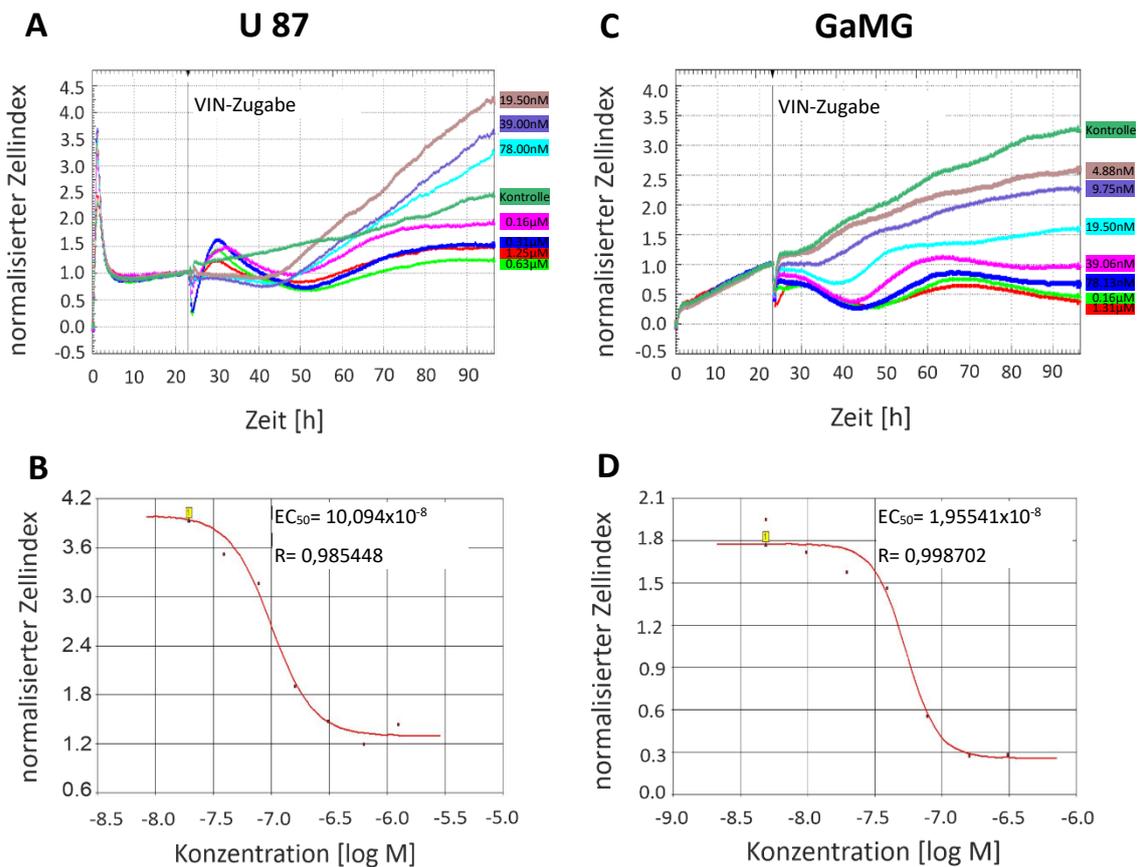


Abbildung 11

Proliferations- und Dosis-Wirkungskurven zur  $EC_{50}$ -Bestimmung von VIN; A: Proliferationskurven von U87-Zellen unter verschiedenen VIN-Konzentrationen und B: zugehörige Dosis-Wirkungskurve; C: Proliferationskurven und D: Dosis-Wirkungskurve von GaMG-Zellen; repräsentative Beispiele aus  $n=7$  (U87) beziehungsweise  $n=5$  (GaMG) Experimenten;  $EC_{50}$ = mittlere effektive Konzentration, VIN= Vincristin

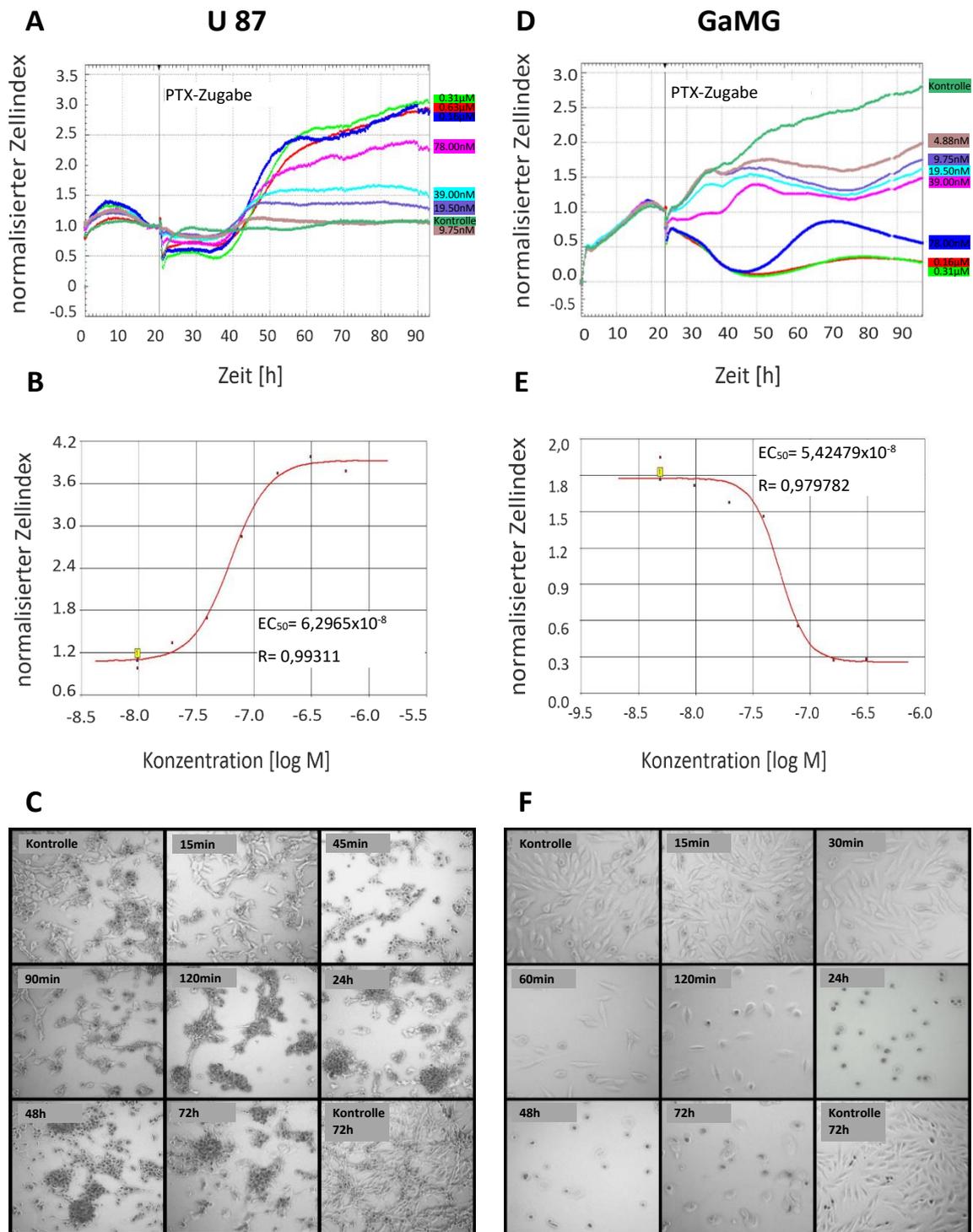


Abbildung 12

Proliferations- und Dosis-Wirkungskurven zur  $EC_{50}$ -Bestimmung von PTX; A: Proliferationskurven von U87-Zellen unter verschiedenen PTX-Konzentrationen und B: zugehörige Dosis-Wirkungskurve, C: exemplarische mikroskopische Aufnahmen in 10-facher Vergrößerung im Phasenkontrast zu unterschiedlichen Messzeitpunkten nach Behandlung mit  $0,63\mu\text{M}$  PTX; D: Proliferations- und E: Dosis-Wirkungskurven, sowie F: exemplarische eigene mikroskopische Aufnahmen und Darstellung von GaMG-Zellen nach Behandlung mit  $0,63\mu\text{M}$  PTX; Repräsentative Beispiele von  $n=3$  (U87) beziehungsweise  $n=4$  (GaMG) Experimenten;  $EC_{50}$ = mittlere effektive Konzentration, PTX= Paclitaxel

### 3.3 Messung der Behandlungseffektivität

#### 3.3.1 Effekt von TTFIELDS und VIN- beziehungsweise PTX-Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf die Proliferation von U87- bzw. GaMG-Zellen

U87- und GaMG-Zellen wurden mit den für VIN beziehungsweise PTX unter 3.2 bestimmten Konzentrationen allein und in Kombination mit TTFIELDS behandelt, um herauszufinden, ob sich die Behandlungen gegenseitig verstärken.

Für die TTFIELDS-Behandlung erfolgte eine gemeinsame Auswertung aller Kontrollen und TTFIELDS-Einzelbehandlungen der jeweils gleichen Zelllinie (n= 8).

Für die Zelllinie U87 ergab sich bereits nach 24h eine signifikante Wirksamkeit der TTFIELDS im Vergleich zur Kontrollgruppe (P= 0,0013), was sich auch nach 48h (P= 0,0002) und 72h (P< 0,0001) fortsetzte (Abb. 13 A + B, Abb. 14 A + B).

Bei der Zelllinie GaMG zeigte sich hingegen erst nach 48h TTFIELDS-Behandlung eine einsetzende Wirkung (P= 0,0488), die auch über 72h (P= 0,0051) anhielt (Abb. 13 C + D, Abb. 14 C + D).

Die Behandlung mit dem Zytostatikum VIN ergab bei den U87-Zellen bereits nach 24h sowohl bei der Einzelbehandlung (P= 0,0029), als auch der Doppelbehandlung mit TTFIELDS (P= 0,0012) gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Wirksamkeit, was sich auch nach 48h (VIN P= 0,0002, TTFIELDS + VIN P< 0,0001) und 72h (VIN P< 0,0001, TTFIELDS + VIN P< 0,0001) Behandlungsdauer fortsetzte (Abb. 13 A). Außerdem war ein signifikanter Wirkunterschied auch für die Doppelbehandlung gegenüber der alleinigen TTFIELDS-Behandlung nach 24h (P= 0,0294; Abb. 13 A) ersichtlich.

Die Zellzahl der Kontrollgruppe nahm über 72h im Mittel um 1043% im Vergleich zur zu Versuchsbeginn ausgesäten Zahl zu. Die TTFIELDS bewirkten eine Verringerung der Zellproliferation, sodass nach 72h die Zellzahl nur um 347% gestiegen war (P< 0,0001).

Die alleinige VIN-Behandlung war noch wirksamer und die Zellzahl nahm nur um 140% zu (P< 0,0001). Die Doppelbehandlung lag mit einer durchschnittlichen Zunahme von 134% (P< 0,0001) in einer vergleichbaren Größenordnung (Abb. 14 A).

Für GaMG-Zellen ergab sich ein sehr vergleichbares Bild. Auch hier waren die VIN-Einzelbehandlung und die Doppelbehandlung mit TTFIELDS gegenüber der Kontrolle

bereits nach 24h Behandlung (VIN  $P=0,0032$ , TTFIELDS + VIN  $P=0,0073$ ), sowie für die weitere Dauer von 48h (VIN  $P=0,0009$ , TTFIELDS + VIN  $P=0,0017$ ) und 72h (VIN  $P=0,0001$ , TTFIELDS + VIN  $P=0,0001$ ) signifikant wirksam (Abb. 13 B). Dies spiegelt sich auch in der Zunahme der Zellzahlen über 72h wider, die bei 766% für die Kontrolle, 383% für TTFIELDS ( $P=0,0051$ ), 121% für VIN ( $P=0,0001$ ) und 122% für die Doppelbehandlung ( $P=0,0001$ ) im Vergleich zur ursprünglich ausgesäten Zellzahl lagen (Abb. 14 C). Die Doppelbehandlungen mit TTFIELDS und VIN konnten allerdings bei beiden Zelllinien im Vergleich zu der Einzelbehandlung mit VIN keinen zusätzlichen signifikanten Vorteil erbringen.

Daraufhin folgte die Testung des Zytostatikums PTX. Auch hier erwiesen sich für die Zelllinie U87 bereits nach 24h (PTX  $P=0,0178$ , TTFIELDS + PTX  $P=0,0015$ ) und die folgenden 48h (PTX  $P=0,0002$ , TTFIELDS + PTX  $P=0,0001$ ) und 72h (PTX  $P<0,0001$ , TTFIELDS + PTX  $P<0,0001$ ) sowohl die PTX-Einzelbehandlung als auch die Doppelbehandlung als signifikant wirksam (Abb. 13 C).

Ein signifikanter Wirkunterschied war außerdem auch für die Doppelbehandlung gegenüber der alleinigen TTFIELDS-Behandlung nach 24h ( $P=0,0481$ ) und 72h ( $P=0,0453$ ) erkenntlich (Abb. 14 C).

Die Zellzahl der Kontrolle stieg über 72h um 1043% im Vergleich zur ursprünglich ausgesäten Zellzahl an. Durch die Behandlung mit TTFIELDS ergab sich eine verminderte Zunahme auf 347% ( $P<0,0001$ ) und die mit PTX behandelten Zellen zeigten mit 141% ( $P<0,0001$ ), beziehungsweise PTX und TTFIELDS kombiniert behandelt mit 127% ( $P<0,0001$ ), eine noch geringere Proliferation (Abb. 14 B).

Bei den Versuchen mit der Zelllinie GaMG ergab sich 24h nach Behandlungsbeginn für keine der Behandlungsformen eine signifikante Wirkung. Nach 48h zeigte sich dann neben der einsetzenden TTFIELDS-Wirkung zuerst nur für die alleinige PTX-Behandlung ( $P=0,0133$ ) und nach 72h dann auch für die Doppelbehandlung mit TTFIELDS eine signifikante Wirksamkeit (PTX  $P=0,0008$ , PTX + TTFIELDS  $P=0,0012$ ; Abb. 13 D).

In der Änderung der Zellzahlen nach 72h Behandlungsdauer im Vergleich zur ausgesäten Zellzahl ergab sich auch hier wieder, dass die einzeln mit TTFIELDS behandelten Zellen mit einer prozentualen Zellzahlzunahme von 383% ( $P=0,0051$ ) im

Vergleich zur Kontrolle mit einer mittleren Zunahme von 766% bereits eine deutliche Reduktion der Proliferation zeigten, was aber sowohl bei den einzeln mit PTX behandelten, als auch den doppelbehandelten Zellen mit 247% ( $P= 0,0008$ ) beziehungsweise 281% ( $P= 0,0012$ ) noch stärker zum Ausdruck kam (Abb. 14 D). Zwischen den Zellzahlen der PTX-Einzelbehandlung und der Doppelbehandlung mit TTFIELDS gab es für beide Zelllinien zu keinem der drei Messpunkte einen signifikanten Unterschied.

Die Graphiken mit den absoluten Zellzahlen finden sich unter Punkt 6 Zusatzabbildungen (Abb. 15-18). Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass zwar alle Einzelbehandlungen sowohl von U87-, als auch GaMG-Zellen spätestens nach 48h einen signifikanten inhibierenden Einfluss auf die Zellproliferation hatten, die Kombinationen der Zytostatika mit TTFIELDS aber keinen signifikanten Zusatznutzen erbrachten.

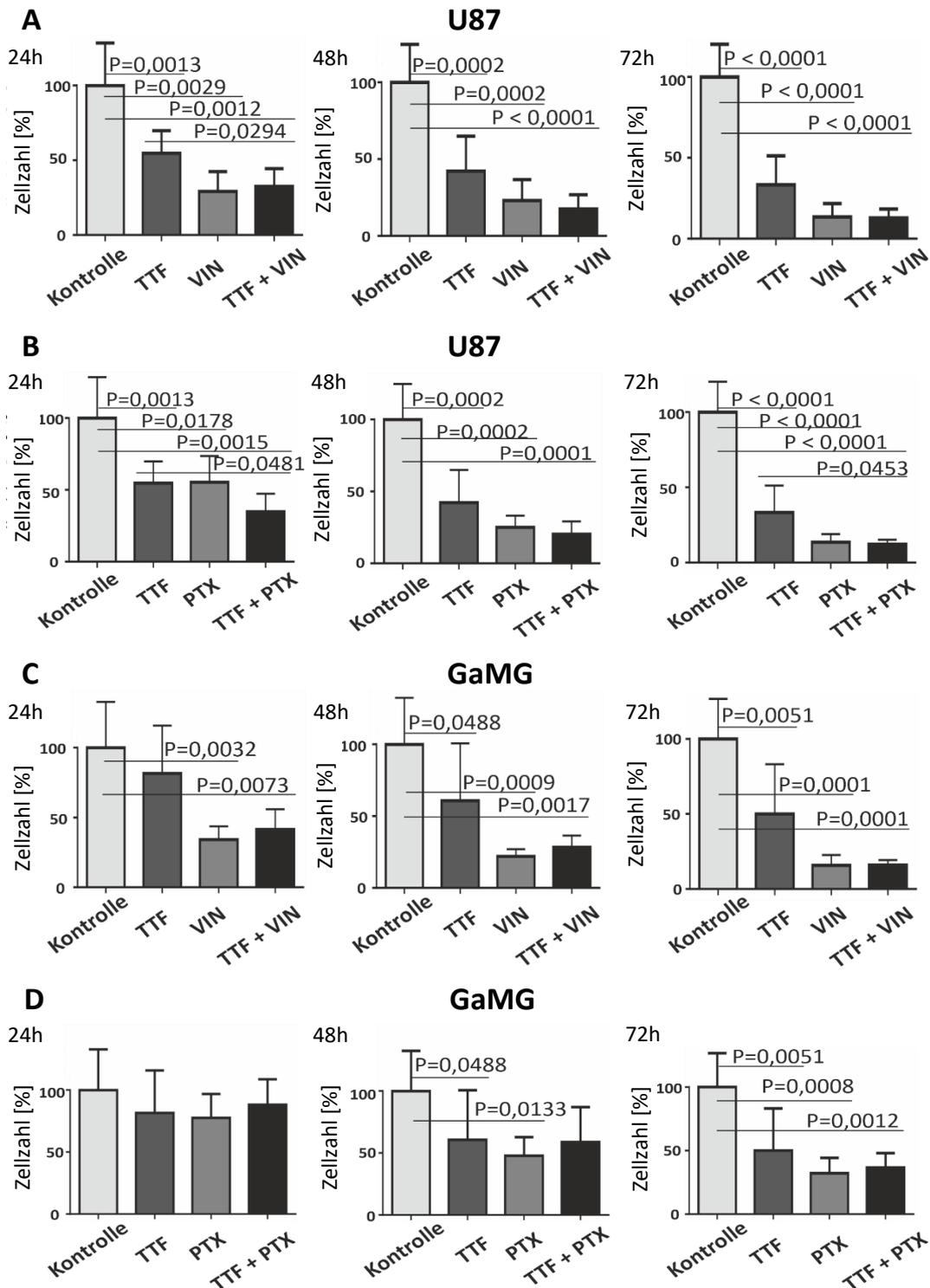


Abbildung 13

Zellzahlen nach verschiedenen Behandlungskombinationen; A: U87-Zellen nach 24, 48 und 72h VIN-

beziehungsweise B: PTX-Behandlung, sowie TTFs-Einzel- und Kombinationsbehandlung;

C: GaMG-Zellen nach 24, 48 und 72h VIN- beziehungsweise D: PTX-Behandlung, sowie TTFs

Einzel- und Kombinationsbehandlung; Kontrollen und TTFs n= 8, Zytostatikum und Zytostatikum + TTFs

n= 4 Experimente; PTX= Paclitaxel, TTF= TTFs= Tumor Treating Fields, VIN= Vincristin

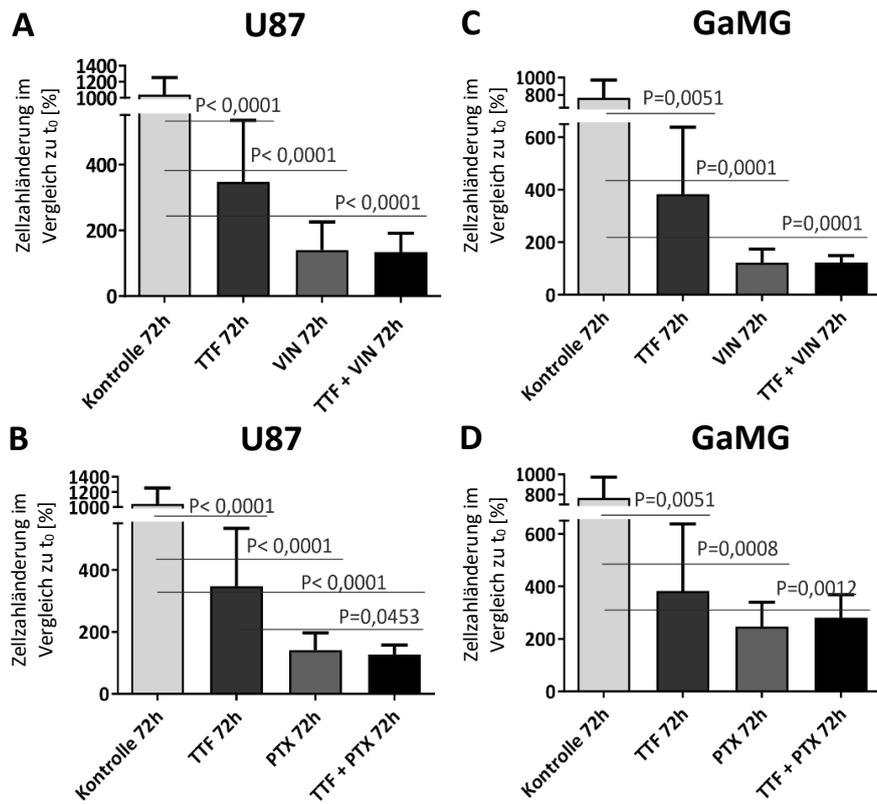


Abbildung 14

Zellzahlveränderung nach 72h TTFIELDS-Behandlungsdauer im Vergleich zu t<sub>0</sub> von U87- mit A: VIN- beziehungsweise B: PTX-Behandlung und von GaMG-Zellen mit C: VIN- beziehungsweise D: PTX-Behandlung; Kontrollen und TTFIELDS n= 8, Zytostatikum und Zytostatikum + TTFIELDS n= 4 Experimente; PTX= Paclitaxel, TTF= TTFIELDS= Tumor Treating Fields, VIN= Vincristin

## 4 Diskussion

Der Bedarf an neuen Therapieformen für die Behandlung von GBM-Patient:innen ist vor allem unter Berücksichtigung der auch unter aktueller Therapie sehr ungünstigen Prognose weiterhin hoch. Dabei soll möglichst die Lebensqualität erhalten bleiben und eine Verbesserung des Gesamtüberlebens herbeigeführt werden. Eine solche neuartige Therapieform sind TTFIELDS (Stupp et al., 2017a, 2017b; Zhu & Zhu, 2017). Ihre antimitotische Hauptwirkung besteht in der Störung der Spindelfaserbildung während der Zellteilung (Giladi et al., 2015).

Durch Tannous et al. und Kessler et al. konnte zudem gezeigt werden, dass durch die Kombination antimitotischer Wirkstoffe mit einem Ausschalten des SAC durch Hemmung des SAC-Schlüsselregulators Proteinkinase monopolar spindle 1 (MPS1 oder auch TTK) die TTFIELDS-Effekte während der Mitose gesteigert werden können. So bewirkte die Kombinationsbehandlung des MPS1-Inhibitors IN-3 mit VIN einen nahezu kompletten Tumorrückgang, sowie ein verlängertes Überleben in GBM-Mausmodellen (Tannous et al., 2013) und die Kombination von IN-3 mit TTFIELDS gegenüber der Einzelbehandlung eine signifikante Reduktion der Zellzahlen mit anhaltender Wirkung (Kessler et al., 2018). Daher ist von einem Sensibilisierungseffekt durch die zusätzliche selektive MPS1 Hemmung auf die Wirkung antimitotischer Substanzen auszugehen (Janssen et al., 2009; Jemaà et al., 2013; Wengner et al., 2016; Maia et al., 2015). Es wurden bereits mehrere MPS1-Inhibitoren entwickelt, werden teilweise bereits in klinischen Phase-I-Studien getestet und stellen somit einen vielversprechenden neuen Therapieansatz als Kombinationsbehandlungen mit TTFIELDS in Aussicht (Dominguez-Brauer et al., 2015; Jemaà et al., 2013; Kessler et al., 2018; Kumar et al., 2012; Mason et al., 2017; Wengner et al., 2016).

Die Fragestellung dieser Arbeit war es daher, ob ähnliche Effekte auch durch Kombinationsbehandlungen mit bereits klinisch zugelassenen und etablierten mitotischen Zytostatika möglich sind. VIN, welches unter anderem auch in der Rezidivtherapie (PCV-Schema) des GBM zur Anwendung kommt, und PTX haben mit den Mikrotubuli einen gemeinsamen Angriffspunkt wie TTFIELDS. So war die Hypothese, durch den mikrotubulidestabilisierenden Effekt von VIN entweder eine

Verstärkung der auf ähnliche Weise wirkenden TTFIELDS zu erreichen oder durch den mikrotubulistabilisierenden Effekt von PTX eine längere und verbesserte Angriffsmöglichkeit für die TTFIELDS und daher möglicherweise additive oder sogar synergistische Effekte zu erzielen. Bereits in vorherigen Studien waren für PTX sowohl mit anderen Tumorentitäten wie nicht kleinzelligem Lungenkarzinom (Giladi et al., 2014), Ovarialkarzinom (Voloshin et al., 2016), als auch für GBM (Kirson et al., 2009) Kombinationseffekte mit TTFIELDS nachgewiesen worden. Allerdings hatten im Gegensatz hierzu andere Studien auch gezeigt, dass es durch einen vermehrten Anteil instabiler gegenüber stabiler Mikrotubuli, wie es auch TTFIELDS bewirken, zu einer Resistenz gegenüber Taxanen kommen kann (Ahmed et al., 2007; Giladi et al., 2015). Allgemein ist PTX theoretisch bei Gliom-Zellen wirksam, allerdings ist sein klinischer Einsatz bei GBM bisher nicht von relevanter Bedeutung, da es die Bluthirnschranke nicht durchdringen kann (Lidar et al., 2004; Walter et al., 1994).

Hier ergibt sich durch die TTFIELDS möglicherweise ein weiterer Ansatzpunkt zur Erweiterung zukünftiger Therapieoptionen, da unter anderem durch die Arbeitsgruppe dieses Forschungsprojektes gezeigt werden konnte, dass durch TTFIELDS in vitro und in vivo eine temporäre Öffnung der Bluthirnschranke hervorgerufen und ein Übertritt bisher nicht bluthirnschrankengängiger Substanzen, wie zum Beispiel PTX, gegebenenfalls in Zukunft durch Kombination mit TTFIELDS ermöglicht werden kann (Kessler et al., 2019; Salvador et al., 2020, 2022; Moser et al., 2022, Guo et al., 2022). Bei der Frage nach der Dosierung wurde sich in dieser Arbeit an den zuvor durch das mit dem xCELLigence-Instrument ermittelten  $EC_{50}$ -Werten für VIN beziehungsweise PTX orientiert. Diese ergaben für VIN eine Dosis von 200nM für die Zelllinie U87 beziehungsweise 20nM für GaMG und für PTX 60nM für beide Zelllinien und liegen damit auch in den Bereichen der Literaturwerte, wobei sich insgesamt sehr unterschiedliche und breite Angaben finden lassen. So wurden für VIN Konzentrationen zwischen 1,4 und 100nM für verschiedene Tumorentitäten zur Reduktion der Zellproliferation um 50% ermittelt (Ferguson et al., 1984). In der Datenbank des „Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC)“-Projektes, einer Zusammenarbeit des „Wellcome-Sanger-Institutes“ in England und dem Zentrum für

molekulare Therapie des „Massachusetts General Hospital Cancer Center“ in den USA, wird ein Mittelwert von 199nM für den IC<sub>50</sub>-Wert für VIN für verschiedene Tumorzelllinien angegeben, mit Minimal- und Maximalwerten von 1,15 bis 919000nM. Für GBM-Zelllinien schwankt der Wert zwischen 20,28 bis 7465nM (Mittelwert 317nM) und liegt hier für die Zelllinie U87 bei 2309nM, wobei die Zelllinie GaMG hier nicht getestet wurde (Web 2).

Auch die in der Literatur angegebenen IC<sub>50</sub>-Werte für PTX variieren. So wurden zum Beispiel in den verschiedenen Studien zur Kombination von TTFields mit PTX IC<sub>50</sub>-Werte von 5-65300nM (Schneiderman et al., 2010; Kirson et al., 2009) für Zelllinien verschiedener Tumorentitäten ermittelt. Das GDSC-Projekt gibt in seiner Datenbank im Mittel einen IC<sub>50</sub>-Wert von 57,5nM für verschiedene Tumorentitäten, von min. 0,99nM bis max. 19712nM, und 97,3nM für GBM, mit Werten von minimal 3,71 bis maximal 7405nM, an. Für die Zelllinie U87 wird ein IC<sub>50</sub>-Wert von 1195nM genannt (Web 2). GaMG-Zellen wurden auch für PTX wiederum nicht getestet.

Außerdem konnte für PTX zwar zum einen gezeigt werden, dass der Einfluss auf die Proliferation der Zellen abhängig von der eingesetzten Konzentration ist, bei höheren Dosen also auch eine stärkere Inhibierung der Proliferation stattfindet (Kelling et al., 2003; Kirson et al., 2009; Voloshin et al., 2016). Auf der anderen Seite konnte aber auch nachgewiesen werden, dass bereits bei einer Dosis von wenigen nM ein Effekt auf die Stabilisierung der Mikrotubuli erreicht wird (Jordan et al., 1996) und dies zu einer Verstärkung des Dipolmoments der Tubuline führt (Tuszynski et al., 2016).

In der im Jahr 2009 publizierten Studie von Kirson et al. konnte schließlich eine Reduzierung des IC<sub>50</sub>-Wertes von 5nM in der Einzel- auf 0,005nM in der Kombinationsbehandlung mit TTFields erreicht werden (Kirson et al., 2009). Eine möglichst niedrige Dosierung in Kombinationsbehandlungen mit TTFields wäre daher vor allem im Hinblick auf einen klinischen Einsatz von Vorteil, da starke Nebenwirkungen häufig die Dosis limitieren und somit eventuell reduziert werden könnten. Insgesamt zeigt sich, dass das Potential der TTFields gerade im Hinblick auf die Kombination mit anderen Therapieansätzen noch weiter ausgeschöpft werden kann. Kombinationen mit verschiedenen Wirkungsansätzen, wie die SAC-Inhibitoren (Kessler

et al., 2018; Tannous et al., 2013) oder TFields mit Bestrahlung und Temozolomid (Stupp et al., 2005, 2009, 2017a) haben sich als wirksamer als die jeweiligen Einzeltherapien erwiesen. In dieser Arbeit wurde getestet, ob eine Kombination von Agenzien mit den Mikrotubuli als gemeinsamen Angriffspunkt ebenso sinnvoll ist und ein verbessertes Therapieansprechen erbringt. Letztlich konnte gezeigt werden, dass mit den hier eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen und verwendeten Zelllinien kein Vorteil erzielt werden konnte. Dabei gilt es jedoch auch zu bedenken, dass verschiedene GBM-Zelllinien unterschiedlich sensitiv auf verschiedene Therapien reagieren. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass GaMG-Zellen empfindlicher als U87-Zellen gegenüber TFields reagieren (Kessler et al., 2018). Solche Unterschiede könnten als Modellsystem für die verschiedenen individuellen genetischen Ausprägungen dienen, wie sie auch in der Klassifikation zunehmend Einzug finden, und daher möglicherweise auch für ein unterschiedliches Therapieansprechen verschiedener Patient:innen verantwortlich sind. Zudem wird auch durch die Konservierungsdauer und Anzahl der Passagen letztlich das Verhalten der Zellen verändert, was durch Zellanalysen mit dem xCELLigence-System gezeigt werden konnte und für die klinische Übertragbarkeit solcher Untersuchungen bedacht werden muss (Irelan et al., 2011; Kirstein et al., 2006). Außerdem wirken TFields, da eine Abhängigkeit von der Zellteilungsrate und der Ausrichtung der Zellen in den Feldern besteht, durch insgesamt eher langsam einsetzende Effekte, die in der in dieser Arbeit gewählten Beobachtungszeit von 72h eventuell noch nicht zum Tragen kommen konnten (Giladi et al., 2015; Kirson et al., 2004, 2007).

Die weitere Erforschung der Einsatzmöglichkeiten der TFields in Kombination mit anderen Agenzien zur stetigen Verbesserung und Etablierung neuer Therapiemöglichkeiten unter möglichst erhaltener Lebensqualität bleibt somit auch weiterhin ein erstrebenswertes Ziel in der bisher beschränkten GBM-Therapie. Auch die neuen Erkenntnisse über die zahlreichen weiteren Wirkmechanismen von TFields, wie zum Beispiel die Veränderung des Membranpotenzials und damit Beeinflussung von Ionenkanälen oder die Erhöhung der Zellmembranpermeabilität, bieten hier noch ein weites Forschungsfeld möglicher weiterer Kombinationstherapien

(Aguilar et al., 2021; Chang et al., 2018; Li et al., 2020; Neuhaus et al., 2019).  
Zudem könnten TTFIELDS in Zukunft auch im Rahmen anderer Tumorentitäten, wie unter anderem Hirnmetastasen, Ovarial-, Bronchial-, Leber-, Magen- und Pankreaskarzinom, zum Einsatz kommen und die Therapiemöglichkeiten verbessern. Vielversprechende Studien in verschiedenen klinischen Phasen hierzu werden derzeit unter anderem von Novocure durchgeführt. In den USA gibt es zudem bereits die Zulassung einer TTFIELDS-Behandlung beim malignen Pleuramesotheliom in Kombination mit Chemotherapie, welches nun auch für Europa zertifiziert und vorgesehen ist (Web 3, Moser et.al 2022). Weitere Einsatzmöglichkeiten von TTFIELDS könnten also für die Zukunft neben der Behandlung des GBM auch für andere bisher begrenzt behandelbare onkologische Erkrankungen, gerade auch in Kombination mit bisherigen konventionellen Behandlungsmethoden einen besseren Therapieerfolg in Aussicht stellen und Einzug in weitere klinische Anwendungsbereiche finden (Rominiyi et al., 2021a, 2021b; Guo et al., 2022; Moser et.al 2022; Shams & Patel, 2022).

## 5 Zusammenfassung

Das Glioblastom (GBM) ist der häufigste maligne primäre Hirntumor im Erwachsenenalter und geht mit einer infausten Prognose einher. Die aktuelle Standardtherapie bei Erstdiagnose besteht aus Tumorresektion gefolgt von kombinierter Radiochemotherapie mit Temozolomid nach Stupp-Schema. Eine neue Therapieoption stellen die Tumor Treating Fields (TTFields) in Form lokal applizierter elektrischer Wechselfelder dar. Durch eine Störung der mitotischen Abläufe kann dadurch die Zellproliferation in teilungsaktiven Tumorzellen gehemmt werden. Durch den Einsatz der TTFields konnte eine Verlängerung des Gesamtüberlebens von GBM-Patient:innen auf 20,9 statt 16 Monaten unter alleiniger Radiochemotherapie erzielt werden. Auch verschiedene Chemotherapeutika, die bereits klinisch eingesetzt werden, greifen in den Ablauf der Mitose ein. So auch die Zytostatika Vincristin (VIN) und Paclitaxel (PTX), die durch einen gegensätzlichen Mechanismus durch Destabilisierung, beziehungsweise Stabilisierung der Mikrotubulstrukturen ihre Wirkung entfalten.

Die Frage, ob eine Verstärkung dieser Wirkung durch den kombinierten Einsatz mit TTFields erreicht werden kann, wurde in dieser Arbeit an den beiden GBM-Zelllinien U87 und GaMG untersucht.

Zunächst wurde über eine Real-Time-Impedanzmessung mithilfe des xCELLigence-Systems für die beiden Chemotherapeutika spezifisch für die jeweilige Zelllinie eine mittlere effektive Dosis, bei der ein halbmaximaler Effekt auftritt ( $EC_{50}$ -Wert) bestimmt. Dieser betrug bei VIN 200nM für die Zelllinie U87 und 20nM für die Zelllinie GaMG. Der  $EC_{50}$  für PTX lag bei 60nM für beide Zelllinien. Mit diesen Dosierungen wurden die beiden Zelllinien allein und in Kombination mit TTFields über 72h behandelt. Anschließend wurde die Zellproliferation analysiert und mit jener unbehandelter Tumorzellen verglichen. Während jeder Behandlungsarm einzeln eine signifikante Wirkung gegenüber der unbehandelten Vergleichsgruppe hatte, hatte weder die Kombination von TTFields mit VIN noch mit PTX in den untersuchten Dosierungen einen zusätzlichen signifikanten Nutzen.

## 6 Zusatzabbildungen

### 6.1 Absolute Zellzahlen der TTFIELDS-Versuche

#### 6.1.1 U87 + Vincristin

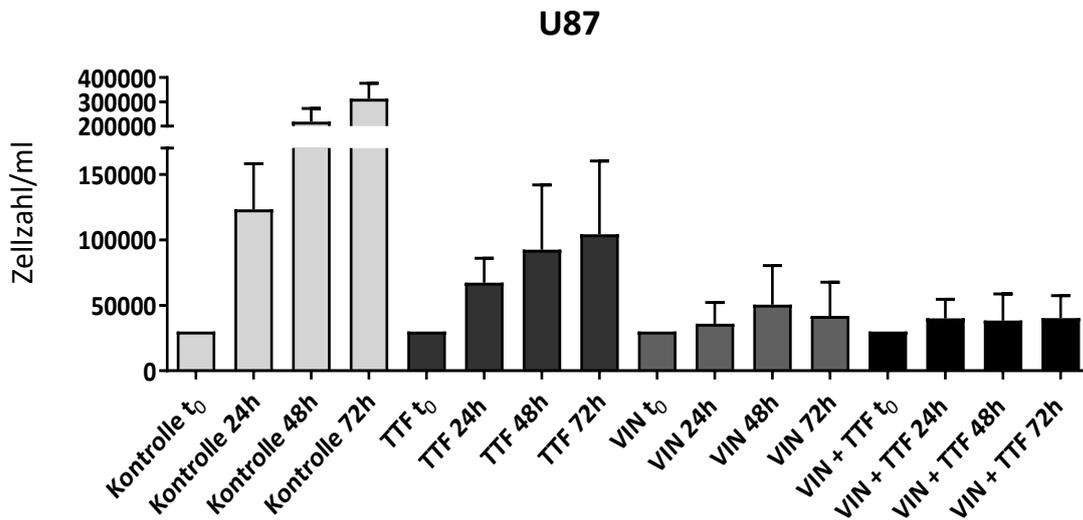


Abbildung 15

Absolute Zellzahlen pro ml von U87-Zellen nach 72h VIN-Behandlung; Kontrollen und TTFIELDS n= 8 Experimente, Zytostatikum und Zytostatikum + TTFIELDS n= 4 Experimente; TTF= TTFIELDS= Tumor Treating Fields, VIN= Vincristin

#### 6.1.2 GaMG + Vincristin

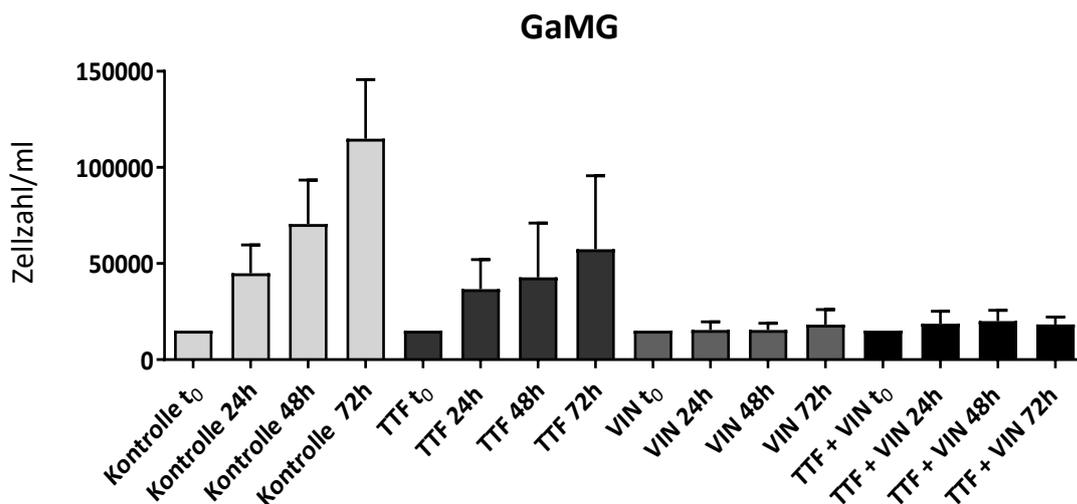


Abbildung 16

Absolute Zellzahlen pro ml von GaMG-Zellen nach 72h VIN-Behandlung; Kontrollen und TTFIELDS n= 8 Experimente, Zytostatikum und Zytostatikum + TTFIELDS n= 4 Experimente; TTF= TTFIELDS= Tumor Treating Fields, VIN= Vincristin

### 6.1.3 U87 + Paclitaxel

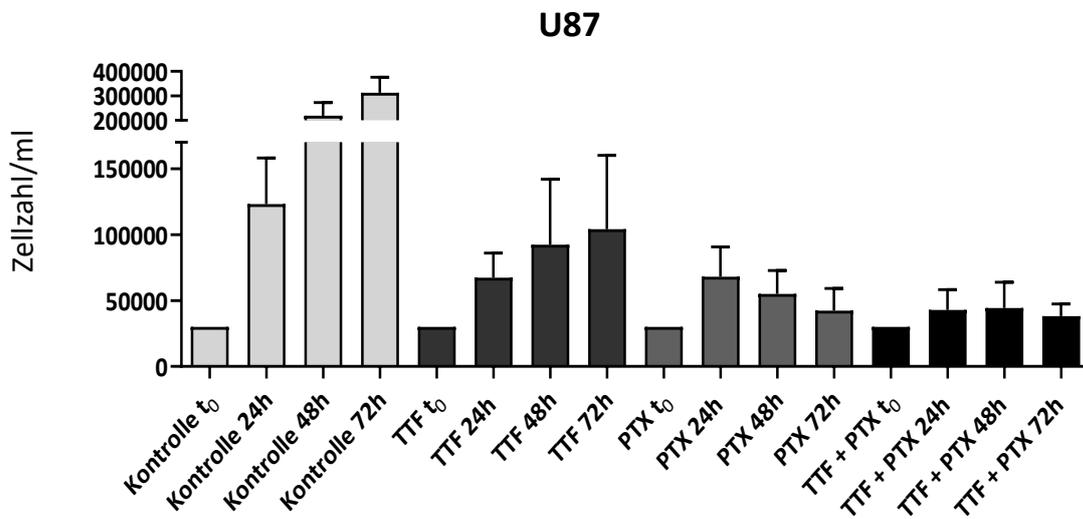


Abbildung 17

Absolute Zellzahlen pro ml von U87-Zellen nach 72h PTX-Behandlung; Kontrollen und TTFs n= 8 Experimente, Zytostatikum und Zytostatikum + TTFs n= 4 Experimente; PTX= Paclitaxel, TTF= TTFs= Tumor Treating Fields

### 6.1.4 GaMG + Paclitaxel

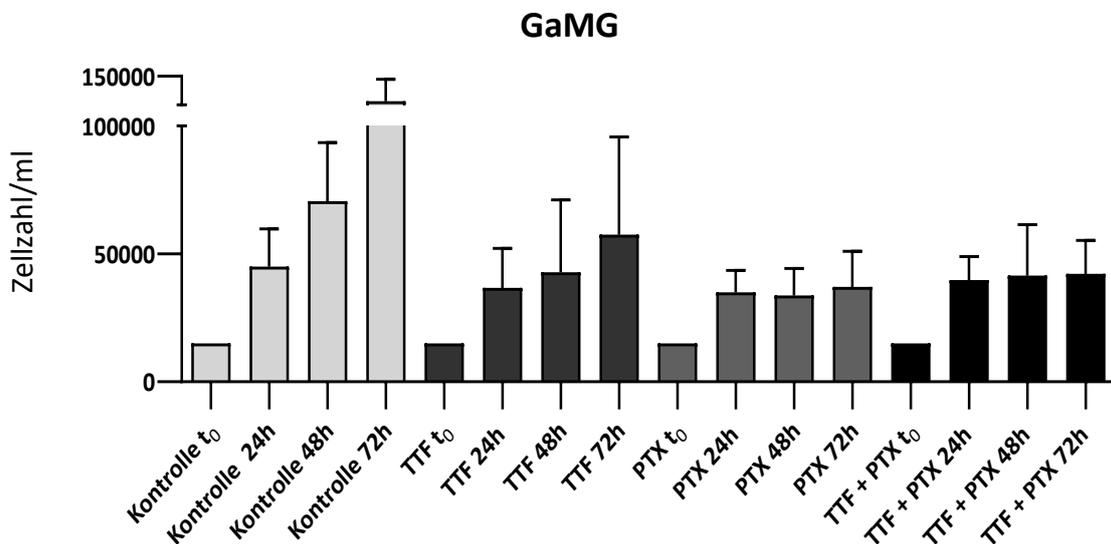


Abbildung 18

Absolute Zellzahlen pro ml von GaMG-Zellen nach 72h PTX-Behandlung; Kontrollen und TTFs n= 8 Experimente, Zytostatikum und Zytostatikum + TTFs n= 4 Experimente; PTX= Paclitaxel, TTF= TTFs= Tumor Treating Fields

## 7 Literaturverzeichnis

- Abal, M., Andreu, J., Barasoain, I. (2003). Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Current cancer drug targets*, 3(3), 193–203. <https://doi.org/10.2174/1568009033481967>
- ACEA Biosciences, Inc. (2010). Calculation principles of RTCA Software. xCELLigence System Technical Note No. 2, 2.
- ACEA Biosciences, Inc. (2013a). RTCA data analysis software manual. Software version 1.0. Version October 2013.
- ACEA Biosciences, Inc. (2013b). RTCA DP instrument operator's manual. Version January 2013.
- ACEA Biosciences, Inc. (2018). Produktinformation xCELLigence RTCA DP Real Time Cell Analyzer. Ehemaliger Internetauftritt Firma ACEA Biosciences Inc. (seit September 2020 Teil von Agilent Technologies, Inc.). Abgerufen ursprünglich am 03.04.2018 unter: <https://www.aceabio.com/products/rtca-dp/>  
Aktuelle Produktinformationen abgerufen am 25.08.2022 unter: <https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-analysis/rtca-analyzers/xcelligence-rtca-mp-multiple-plates-741230>
- Agarwala, S. S. & Kirkwood, J. M. (2000). Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *The oncologist*, 5(2), 144–151. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-2-144>
- Aguilar, A. A., Ho, M. C., Chang, E., Carlson, K. W., Natarajan, A., Marciano, T., Bomzon, Z., Patel, C. B. (2021). Permeabilizing cell membranes with electric fields. *Cancers*, 13(9), 2283. <https://doi.org/10.3390/cancers13092283>
- Ahmed, A. A., Mills, A. D., Ibrahim, A. E. K., Temple, J., Blenkiron, C., Vias, M., Massie, C. E., Iyer, N. G., McGeoch, A., Crawford, R., Nicke, B., Downward, J., Swanton, C.,

- Bell, S. D., Earl, H. M., Laskey, R. A., Caldas, C., Brenton, J. D. (2007). The extracellular matrix protein TGFBI induces microtubule stabilization and sensitizes ovarian cancers to paclitaxel. *Cancer cell*, 12(6), 514–527.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.11.014>
- Alqahtani, F. Y., Aleanizy, F. S., El Tahir, E., Alkahtani, H. M., AlQuadeib, B. T. (2019). Paclitaxel. Profiles of drug substances, excipients and related methodology, 44, 205–238. <https://doi.org/10.1016/BS.PODRM.2018.11.001>
- Bailey, P. & Cushing, H. (1927). A classification of the tumours of the glioma group on a histogenetic basis, with a correlated study of prognosis. By Percival Bailey and Harvey Cushing. Medium 8vo. Pp. 175, with 108 illustrations. 1926. Philadelphia, London, and Montreal: J. B. Lippincott Company. 21s. net, *British journal of surgery*, Volume 14, Issue 55, January 1927, Pages 554–555.  
<https://doi.org/10.1002/bjs.1800145540>
- Below, J. & M Das, J. (2022). Vincristine. In StatPearls. StatPearls Publishing. Abgerufen am 30.10.2022 unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537122/>
- Brada, M., Stenning, S., Gabe, R., Thompson, L. C., Levy, D., Rampling, R., Erridge, S., Saran, F., Gattamaneni, R., Hopkins, K., Beall, S., Collins, V. P., Lee, S. M. (2010). Temozolomide versus procarbazine, lomustine, and vincristine in recurrent high-grade glioma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(30), 4601-4608.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.1932>
- Brandes, A. A., Franceschi, E., Tosoni, A., Bartolini, S., Bacci, A., Agati, R., Ghimenton, C., Turazzi, S., Talacchi, A., Skrap, M., Marucci, G., Volpin, L., Morandi, L., Pizzolitto, S., Gardiman, M., Andreoli, A., Calbucci, F., Ermani, M. (2010). O<sup>6</sup>-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications. *Neuro-oncology*, 12(3), 283–288.  
<https://doi.org/10.1093/neuonc/nop050>

Brat, D. J., Aldape, K., Colman, H., Figarella-Branger, D., Fuller, G. N., Giannini, C., Holland, E. C., Jenkins, R. B., Kleinschmidt-DeMasters, B., Komori, T., Kros, J. M., Louis, D. N., McLean, C., Perry, A., Reifenberger, G., Sarkar, C., Stupp, R., van den Bent, M. J., von Deimling, A., Weller, M. (2020). cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta neuropathologica*, 139(3), 603–608. <https://doi.org/10.1007/S00401-020-02127-9/TABLES/1>

Brat, D. J., Aldape, K., Colman, H., Holland, E. C., Louis, D. N., Jenkins, R. B., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Perry, A., Reifenberger, G., Stupp, R., von Deimling, A., Weller, M. (2018). cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV.” *Acta neuropathologica*, 136(5), 805–810. <https://doi.org/10.1007/S00401-018-1913-0>

Brem, H., Piantadosi, S., Burger, P. C., Walker, M., Selker, R., Vick, N. A., Black, K., Sisti, M., Brem, S., Mohr, G., Muller, P., Morawetz, R., Schold, S. C. (1995). Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. *Lancet*, 345(8956), 1008–1012. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)90755-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)90755-6)

Brigliadori, G., Foca, F., Dall’Agata, M., Rengucci, C., Melegari, E., Cerasoli, S., Amadori, D., Calistri, D., Faedi, M. (2016). Defining the cutoff value of MGMT gene promoter methylation and its predictive capacity in glioblastoma. *Journal of neuro-oncology*, 128(2), 333–339. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2116-y>

Buselmaier, W. (2012). *Biologie für Mediziner*. 12.Auflage. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27175-5>

Cairncross, G., Wang, M., Shaw, E., Jenkins, R., Brachman, D., Buckner, J., Fink, K. (2013). Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *Journal of clinical oncology: official journal of the*

American Society of Clinical Oncology, 31(3), 337–343.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.2674>

Chang, E., Patel, C. B., Pohling, C., Young, C., Song, J., Flores, T. A., Zeng, Y., Joubert, L. M., Arami, H., Natarajan, A., Sinclair, R., Gambhir, S. S. (2018). Tumor treating fields increases membrane permeability in glioblastoma cells. *Cell death discovery*, 4, 113. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0130-x>

Chaudhry, A., Benson, L., Varshaver, M., Farber, O., Weinberg, U., Kirson, E., Palti, Y. (2015). NovoTTF™-100A System (tumor treating fields) transducer array layout planning for glioblastoma: a NovoTAL™ system user study. *World journal of surgical oncology*, 13, 316. <https://doi.org/10.1186/S12957-015-0722-3>

Cheng, B. & Crasta, K. (2017). Consequences of mitotic slippage for antimicrotubule drug therapy. *Endocrine-related cancer*, 24(9), T97–T106. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0147>

Davies, A. M., Weinberg, U., Palti, Y. (2013). Tumor treating fields: a new frontier in cancer therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1291, 86–95. <https://doi.org/10.1111/nyas.12112>

De Witt Hamer, P. C., Robles, S. G., Zwinderman, A. H., Duffau, H., Berger, M. S. (2012). Impact of intraoperative stimulation brain mapping on glioma surgery outcome: a meta-analysis. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(20), 2559–2565. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.4818>

Dominguez-Brauer, C., Thu, K. L., Mason, J. M., Blaser, H., Bray, M. R., Mak, T. W. (2015). Targeting mitosis in cancer: emerging strategies. *Molecular cell*, 60(4), 524–536. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.006>

Dzokou Njeungou, W. (2019). Der Einfluss von TTFields in Kombination mit dem MPS1-Inhibitor IN3 auf die Glioblastomzelllinie U87. Bachelorthesis. Universität Würzburg.

- Ellison, D. W., Aldape, K. D., Capper, D., Fouladi, M., Gilbert, M. R., Gilbertson, R. J., Hawkins, C., Merchant, T. E., Pajtler, K., Venneti, S., Louis, D. N. (2020). cIMPACT-NOW update 7: advancing the molecular classification of ependymal tumors. *Brain pathology*, 30(5), 863–866. <https://doi.org/10.1111/BPA.12866>
- Ellison, D. W., Hawkins, C., Jones, D. T. W., Onar-Thomas, A., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Louis, D. N. (2019). cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAFV600E mutation. *Acta neuropathologica* 2019, 137(4), 683–687. <https://doi.org/10.1007/S00401-019-01987-0>
- Eyüpoglu, I. Y., Buchfelder, M., Savaskan, N. E. (2013). Surgical resection of malignant gliomas-role in optimizing patient outcome. *Nature reviews. Neurology*, 9(3), 141–151. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.279>
- Feldheim, J., Kessler, A. F., Monoranu, C. M., Ernestus, R. I., Löhr, M., Hagemann, C. (2019). Changes of O<sup>6</sup>-Methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT) promoter methylation in glioblastoma relapse-a meta-analysis type literature review. *Cancers*, 11(12), 1837. <https://doi.org/10.3390/cancers11121837>
- Ferguson, P. J., Phillips, J. R., Selner, M., Cass, C. E. (1984). Differential activity of vincristine and vinblastine against cultured cells. *Cancer research*, 44(8), 3307–3312.
- Fetell, M. R., Grossman, S. A., Fisher, J. D., Erlanger, B., Rowinsky, E., Stockel, J., Piantadosi, S. (1997). Preirradiation paclitaxel in glioblastoma multiforme: efficacy, pharmacology, and drug interactions. *New approaches to brain tumor therapy central nervous system consortium. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 15(9), 3121–3128. <https://doi.org/10.1200/jco.1997.15.9.3121>
- Frömbling, G. E. (2020). Verstärkung der Wirkung von TTFIELDS auf Glioblastomzellen durch Inhibition des mitotischen Spindelkontrollpunktes. Dissertation zur

Erlangung des medizinischen Doktorgrades der Graduate School of Life Sciences, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

García, M. G., Carella, A., Urdinguio, R. G., Bayón, G. F., Lopez, V., Tejedor, J. R., Sierra, M. I., García-Toraño, E., Santamarina, P., Perez, R. F., Mangas, C., Astudillo, A., Corte-Torres, M. D., Sáenz-de-Santa-María, I., Chiara, M.-D., Fernández, A. F., Fraga, M. F. (2018). Epigenetic dysregulation of TET2 in human glioblastoma. *Oncotarget*, 9(40), 25922–25934. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25406>

Gera, N., Yang, A., Holtzman, T. S., Lee, S. X., Wong, E. T., Swanson, K. D. (2015). Tumor treating fields perturb the localization of septins and cause aberrant mitotic exit. *PloS one*, 10(5), e0125269. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0125269>

Gidding, C. E. M., Kellie, S. J., Kamps, W. A., De Graaf, S. S. N. (1999). Vincristine revisited. *Critical reviews in oncology/hematology*, 29(3), 267–287. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(98\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(98)00023-7)

Giladi, M., Munster, M., Schneiderman, R. S., Voloshin, T., Porat, Y., Blat, R., Zielinska-Chomej, K., Hååg, P., Bomzon, Z., Kirson, E. D., Weinberg, U., Viktorsson, K., Lewensohn, R., Palti, Y. (2017). Tumor treating fields (TTFields) delay DNA damage repair following radiation treatment of glioma cells. *Radiation oncology*, 12(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s13014-017-0941-6>

Giladi, M., Schneiderman, R. S., Voloshin, T., Porat, Y., Munster, M., Blat, R., Sherbo, S., Bomzon, Z., Urman, N., Itzhaki, A., Cahal, S., Shteingauz, A., Chaudhry, A., Kirson, E. D., Weinberg, U., Palti, Y. (2015). Mitotic spindle disruption by alternating electric fields leads to improper chromosome segregation and mitotic catastrophe in cancer cells. *Scientific reports*, 5, 18046. <https://doi.org/10.1038/srep18046>

Giladi, M., Weinberg, U., Schneiderman, R.S., Porat, Y., Munster, M., Voloshin, T., Blatt, R., Cahal, S., Itzhaki, A., Onn, A., Kirson, E. D., Palti, Y. (2014). Alternating electric fields (tumor-treating fields therapy) can improve chemotherapy treatment efficacy in non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo. *Seminars in*

oncology, 41 Suppl 6, S35–S41. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.09.006>

Gilbert, M. R., Wang, M., Aldape, K. D., Stupp, R., Hegi, M. E., Jaeckle, K. A., Armstrong, T. S., Wefel, J. S., Won, M., Blumenthal, D. T., Mahajan, A., Schultz, C. J., Erridge, S., Baumert, B., Hopkins, K. I., Tzuk-Shina, T., Brown, P. D., Chakravarti, A., Curran, W. J., Mehta, M. P. (2013). Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(32), 4085–4091. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.49.6968>

Grasbon-Frodl, E. M., Kreth, F. W., Ruitter, M., Schnell, O., Bise, K., Felsberg, J., Reifenberger, G., Tonn, J. C., Kretzschmar, H. A. (2007). Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *International journal of cancer*, 121(11), 2458–2464. <https://doi.org/10.1002/ijc.23020>

Guo, X., Yang, X., Wu, J., Yang, H., Li, Y., Li, J., Liu, Q., Wu, C., Xing, H., Liu, P., Wang, Y., Hu, C., Ma, W. (2022). Tumor-treating fields in glioblastomas: past, present, and future. *Cancers*, 14(15), 3669. <https://doi.org/10.3390/cancers14153669>

Hart, M. G., Garside, R., Rogers, G., Stein, K., Grant, R. (2013). Temozolomide for high grade glioma. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2013(4), CD007415. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007415.pub2>

Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., De Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E. C., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 352(10), 997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>

Hegi, M. E., Rajakannu, P., Weller, M. (2012). Epidermal growth factor receptor: a re-emerging target in glioblastoma. *Current opinion in neurology*, 25(6), 774–779. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e328359b0bc>

Herrlinger, U., Tzaridis, T., Mack, F., Steinbach, J. P., Schlegel, U., Sabel, M., Hau, P., Kortmann, R.-D., Krex, D., Grauer, O., Goldbrunner, R., Schnell, O., Bähr, O., Uhl, M., Seidel, C., Tabatabai, G., Kowalski, T., Ringel, F., Schmidt-Graf, F., Suchorska, B., Brehmer, S., Weyerbrock, A., Renovanz, M., Bullinger, L., Galldiks, N., Vajkoczy, P., Misch, M., Vatter, H., Stuplich, M., Schäfer, N., Kebir, S., Weller, J., Schaub, C., Stummer, W., Tonn, J.-C., Simon, M., Keil, V. C., Nelles, Michael, Urbach, H., Coenen, M., Wick, W., Weller, M., Fimmers, R., Schmid, M., Hattingen, E., Pietsch, T., Coch, C., Glas, M., Neurooncology Working Group of the German Cancer Society. (2019). Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 393(10172), 678–688. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31791-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31791-4)

Hofer, S., Bullinger, L., Dierlamm, J., Grosu, A.-L., Hau, P., Hense, J., Hoffmann, J., Proescholdt, M., Pflugschaupt, T., Preusser, M., Pukrop, T., Rushing, E., Wörmann, B. (2021). Gliome im Erwachsenenalter. *Oncopedia Leitlinien*. Stand August 2021. Abgerufen am 24.02.2022 unter: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/gliome-im-erwachsenenalter/@@guideline/html/index.html>

Hottinger, A. F., Pacheco, P., Stupp, R. (2016). Tumor treating fields: a novel treatment modality and its use in brain tumors. *Neuro-oncology*, 18(10), 1338–1349. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now182>

Irelan, J. T., Wu, M.-J., Morgan, J., Ke, N., Xi, B., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y. A. (2011). Rapid and quantitative assessment of cell quality, identity, and functionality for cell-based assays using real-time cellular analysis. *Journal of biomolecular screening*, 16(3), 313–322. <https://doi.org/10.1177/1087057110397359>

Janssen, A., Kops, G. J. P. L., Medema, R. H. (2009). Elevating the frequency of chromosome mis-segregation as a strategy to kill tumor cells. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 106(45), 19108–19113. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904343106>
- Jemaà, M., Galluzzi, L., Kepp, O., Senovilla, L., Brands, M., Boemer, U., Koppitz, M., Lienau, P., Prechtel, S., Schulze, V., Siemeister, G., Wengner, A. M., Mumberg, D., Ziegelbauer, K., Abrieu, A., Castedo, M., Vitale, I., Kroemer, G. (2013). Characterization of novel MPS1 inhibitors with preclinical anticancer activity. *Cell death and differentiation*, 20(11), 1532–1545. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.105>
- Jiapaer, S., Furuta, T., Tanaka, S., Kitabayashi, T., Nakada, M. (2018). Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma. *Neurologia medico-chirurgica*, 58(10), 405–421. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2018-0141>
- Joglekar, A. P. (2016). A cell biological perspective on past, present and future investigations of the spindle assembly checkpoint. *Biology*, 5(4), 44. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY5040044>
- Jordan, M. (2012). Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, 2(1), 1–17. <https://doi.org/10.2174/1568011023354290>
- Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D., Wilson, L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(20), 9552–9556. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.20.9552>
- Jordan, M. A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W. B., Copp, H., Wilson, L. (1996). Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer research*, 56(4), 816–825.
- Jung, T. Y., Jung, S., Moon, K. S., Kim, I. Y., Kang, S. S., Kim, Y. H., Park, C. S., Lee, K. H. (2010). Changes of the O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase promoter

methylation and MGMT protein expression after adjuvant treatment in glioblastoma. *Oncology reports*, 23(5), 1269–1276.

[https://doi.org/10.3892/or\\_00000760](https://doi.org/10.3892/or_00000760)

Kanner, A. A., Wong, E. T., Villano, J. L., Ram, Z. (2014). Post hoc analyses of intention-to-treat population in phase III comparison of NovoTTF-100A™ system versus best physician's choice chemotherapy. *Seminars in oncology*, 41 Suppl 6, S25–S34. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.09.008>

Kappelle, A. C., Postma, T. J., Taphoorn, M. J. B., Groeneveld, G. J., Van den Bent, M. J., Van Groenigen, C. J., Zonnenberg, B. A., Sneeuw, K. C. A., Heimans, J. J. (2001). PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma multiforme. *Neurology*, 56(1), 118–120. <https://doi.org/10.1212/wnl.56.1.118>

Karsy, M., Gelbman, M., Shah, P., Balumbu, O., Moy, F., Arslan, E. (2012). Established and emerging variants of glioblastoma multiforme: review of morphological and molecular features. *Folia neuropathologica*, 50(4), 301–321. <https://doi.org/10.5114/fn.2012.32361>

Kelling, J., Sullivan, K., Wilson, L., Jordan, M. A. (2003). Suppression of centromere dynamics by taxol in living osteosarcoma cells. *Cancer research*, 63(11), 2794–2801. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.48.1.353>

Kessler, A. F., Frömbing, G. E., Gross, F., Hahn, M., Dzokou, W., Ernestus, R.-I., Löhr, M., Hagemann, C. (2018). Effects of tumor treating fields (TTFields) on glioblastoma cells are augmented by mitotic checkpoint inhibition. *Cell death discovery*, 4, 12. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0079-9>

Kessler, A. F., Salvador, E., Domröse, D., Burek, M., Tempel Bami, C., Voloshin Sela, T., Giladi, M., Ernestus, R., Löhr, M., Förster, C., Hagemann, C. (2019). P11.28 Alteration of blood brain barrier (BBB) permeability by tumor treating fields (TTFields) in vivo. *Neuro-oncology*, 21(Supplement\_3), iii49. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz126.174>

Killela, P. J., Reitman, Z. J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L. A., Friedman, A. H., Friedman, H., Gallia, G. L., Giovanella, B. C., Grollman, A. P., He, T.-C., He, Y., Hruban, R. H., Jallo, G. I., Mandahl, N., Meeker, A. K., Mertens, F., Netto, G. J., Rasheed, B. A., Riggins, G. J., Rosenquist, T. A., Schiffman, M., Shih, I.-M., Theodorescu, D., Torbenson, M. S., Velculescu, V. E., Wang, T.-L., Wentzensen, N., Wood, L. D., Zhang, M., McLendon, R. E., Bigner, D. D., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Yan, H. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 6021–6026. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303607110>

Kinzel, A., Ambroggi, M., Varshaver, M., Kirson, E. D. (2019). Tumor treating fields for glioblastoma treatment: patient satisfaction and compliance with the second-generation Optune® system. *Clinical Medicine Insights. Oncology*, 13, 1179554918825449. <https://doi.org/10.1177/1179554918825449>

Kirson, E. D., Dbalý, V., Tovaryš, F., Vymazal, J., Soustiel, J. F., Itzhaki, A., Mordechovich, D., Steinberg-Shapira, S., Gurvich, Z., Schneiderman, R., Wasserman, Y., Salzberg, M., Ryffel, B., Goldsher, D., Dekel, E., Palti, Y. (2007). Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10152–10157. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702916104>

Kirson, E. D., Gurvich, Z., Schneiderman, R., Dekel, E., Itzhaki, A., Wasserman, Y., Schatzberger, R., Palti, Y. (2004). Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer research*, 64(9), 3288–3295. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0083>

Kirson, E. D., Schneiderman, R. S., Dbal, V., Tovary, F., Vymazal, J., Itzhaki, A., Mordechovich, D., Gurvich, Z., Shmueli, E., Goldsher, D., Wasserman, Y., Palti, Y. (2009). Chemotherapeutic treatment efficacy and sensitivity are increased by adjuvant alternating electric fields (TFields). *BMC medical physics*, 9, 1.

<https://doi.org/10.1186/1756-6649-9-1>

Kirstein, S. L., Atienza, J. M., Xi, B., Zhu, J., Yu, N., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y. A. (2006). Live cell quality control and utility of real-time cell electronic sensing for assay development. *Assay and drug development technologies*, 4(5), 545–553.  
<https://doi.org/10.1089/adt.2006.4.545>

Körber, V., Yang, J., Barah, P., Wu, Y., Stichel, D., Gu, Z., Fletcher, M. N. C., Jones, D., Hentschel, B., Lamszus, K., Tonn, J. C., Schackert, G., Sabel, M., Felsberg, J., Zacher, A., Kaulich, K., Hübschmann, D., Herold-Mende, C., von Deimling, A., Weller, M., Radlwimmer, B., Schlesner, M., Reifenberger, G., Höfer, T., Lichter, P. (2019). Evolutionary trajectories of IDHWT glioblastomas reveal a common path of early tumorigenesis instigated years ahead of initial diagnosis. *Cancer cell*, 35(4), 692-704.e12. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2019.02.007>

Kroner, T., Margulies, A., Rothschild, S., Studer, C. (Hrsg.). (2020). *Medikamente in der Tumorthherapie-Handbuch für die Pflegepraxis*. 6.Auflage. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-59400-1>

Langenbach, K. (2010). ATCC technology assessment of Roche xCELLigence system: an electronic impedance-based cell sensing unit. *BioTechniques* 49(6), 905-906.  
<https://doi.org/10.2144/000113575>

Laperriere, N., Zuraw, L., Cairncross, G. (2002). Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 64(3), 259–273. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(02\)00078-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(02)00078-6)

Lavy Shahaf, G., Giladi, M., Schneiderman, R., Kinzel, A., Weinberg, U., Kirson, E., Palti, Y. (2018). P04.17 Cancer cell lines response to tumor treating fields: results of a meta-analysis. *Neuro-oncology*, 20(suppl\_3), iii282.  
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noy139.251>

Li, X., Yang, F., Rubinsky, B. (2020). A theoretical study on the biophysical mechanisms by which tumor treating fields affect tumor cells during mitosis. *IEEE transactions on bio-medical engineering*, 67(9), 2594–2602.

<https://doi.org/10.1109/TBME.2020.2965883>

Lidar, Z., Mardor, Y., Jonas, T., Pfeffer, R., Faibel, M., Nass, D., Hadani, M., Ram, Z. (2004). Convection-enhanced delivery of paclitaxel for the treatment of recurrent malignant glioma: a phase I/II clinical study. *Journal of neurosurgery*, 100(3), 472–479. <https://doi.org/10.3171/jns.2004.100.3.0472>

Louis, D. N., Giannini, C., Capper, D., Paulus, W., Figarella-Branger, D., Lopes, M. B., Batchelor, T. T., Cairncross, J. G., van den Bent, M., Wick, W., Wesseling, P. (2018b). cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant. *Acta neuropathologica*, 135(4), 639–642.

<https://doi.org/10.1007/S00401-018-1826-Y>

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114(2), 97–109.

<https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., Ellison, D. W. (2016). The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), 803–820.

<https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>

Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., Ellison, D. W., Homer, J. (2021). The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-oncology*, 23(8), 1231–1251.

<https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>

Louis, D. N., Wesseling, P., Aldape, K., Brat, D. J., Capper, D., Cree, I. A., Eberhart, C., Figarella-Branger, D., Fouladi, M., Fuller, G. N., Giannini, C., Haberler, C., Hawkins, C., Komori, T., Kros, J. M., Ng, H. K., Orr, B. A., Park, S. H., Paulus, W., Perry, A., Pietsch, T., Reifenberger, G., Rosenblum, M., Rous, B., Sahm, F., Sarkar, C., Solomon, D. A., Tabori, U., van den Bent, M. J., von Deimling, A., Weller, M., White, V. A., Ellison, D. W. (2020). cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain pathology*, 30(4), 844–856.  
<https://doi.org/10.1111/BPA.12832>

Louis, D. N., Wesseling, P., Paulus, W., Giannini, C., Batchelor, T. T., Cairncross, J. G., Capper, D., Figarella-Branger, D., Lopes, M. B., Wick, W., van den Bent, M. (2018a). cIMPACT-NOW update 1: not otherwise specified (NOS) and not elsewhere classified (NEC). *Acta neuropathologica*, 135(3), 481–484.  
<https://doi.org/10.1007/S00401-018-1808-0/TABLES/1>

Lüllmann-Rauch, R. (2012). *Taschenlehrbuch Histologie*. 4.Auflage. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.

Lun, M., Lok, E., Gautam, S., Wu, E., Wong, E. T. (2011). The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology*, 105(2), 261–273. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0575-8>

Maia, A. R. R., De Man, J., Boon, U., Janssen, A., Song, J. Y., Omerzu, M., Sterrenburg, J. G., Prinsen, M. B. W., Willemsen-Seegers, N., De Roos, J. A. D. M., Van Doornmalen, A. M., Uitdehaag, J. C. M., Kops, G. J. P. L., Jonkers, J., Buijsman, R. C., Zaman, G. J. R., Medema, R. H. (2015). Inhibition of the spindle assembly checkpoint kinase TTK enhances the efficacy of docetaxel in a triple-negative breast cancer model. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(10), 2180–2192.  
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdv293>

Mallory, F. B. (1914). *The principles of pathologic histology*. W. B. Saunders Company.

- Malmström, A., Grønberg, B. H., Marosi, C., Stupp, R., Frappaz, D., Schultz, H., Abacioglu, U., Tavelin, B., Lhermitte, B., Hegi, M. E., Rosell, J., Henriksson, R. (2012). Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 13(9), 916–926. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70265-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70265-6)
- Manchado, E., Guillaumot, M., Malumbres, M. (2012). Killing cells by targeting mitosis. *Cell death and differentiation*, 19(3), 369–377. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.197>
- Mason, J. M., Wei, X., Fletcher, G. C., Kiarash, R., Brokx, R., Hodgson, R., Beletskaya, I., Bray, M. R., Mak, T. W. (2017). Functional characterization of CFI-402257, a potent and selective Mps1/TTK kinase inhibitor, for the treatment of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(12), 3127–3132. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700234114>
- Matson, D. R. & Stukenberg, P. T. (2011). Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Molecular interventions*, 11(2), 141–150. <https://doi.org/10.1124/mi.11.2.12>
- McGirt, M. J., Chaichana, K. L., Gathinji, M., Attenello, F. J., Than, K., Olivi, A., Weingart, J. D., Brem, H., Quiñones-Hinojosa, A. R. (2009). Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma. *Journal of neurosurgery*, 110(1), 156–162. <https://doi.org/10.3171/2008.4.17536>
- Merck Millipore (2011). Produkt Broschüre "Scepter™ 2.0 Cell Counter". Abgerufen am 03.04.2018 unter: [https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Scepter-2.0-Handheld-Automated-Cell-Counter,MM\\_NF-PHCC20040#anchor\\_BRO](https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Scepter-2.0-Handheld-Automated-Cell-Counter,MM_NF-PHCC20040#anchor_BRO)
- Miller, A. M., Shah, R. H., Pentsova, E. I., Pourmaleki, M., Briggs, S., Distefano, N., Zheng, Y., Skakodub, A., Mehta, S. A., Campos, C., Hsieh, W. Y., Selcuklu, S. D., Ling, L., Meng, F., Jing, X., Samoila, A., Bale, T. A., Tsui, D. W. Y., Grommes, C.,

- Viale, A., Souweidane, M. M., Tabar, V., Brennan, C. W., Reiner, A. S., Rosenblum, M., Panageas, K. S., DeAngelis, L. M., Young, R. J., Berger, M. F., Mellingerhoff, I. K. (2019). Tracking tumour evolution in glioma through liquid biopsies of cerebrospinal fluid. *Nature*, 565(7741), 654–658. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-0882-3>
- Moser, J. C., Salvador, E., Deniz, K., Swanson, K., Tusynski, J., Carlson, K. W., Karanam, N. K., Patel, C. B., Story, M., Lou, E., Hagemann, C. (2022). The mechanisms of action of tumor treating fields. *Cancer research*, 82(20), 3650–3658. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-0887>
- Mrugala, M. M., Engelhard, H. H., Dinh Tran, D., Kew, Y., Cavaliere, R., Villano, J. L., Annenelie Bota, D., Rudnick, J., Love Sumrall, A., Zhu, J. J., Butowski, N. (2014). Clinical practice experience with NovoTTF-100A™ system for glioblastoma: the patient registry dataset (PRiDe). *Seminars in oncology*, 41 Suppl 6, S4–S13. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.09.010>
- Murphy, J., Bowers, M. E., Barron, L. (2016). Optune®: practical nursing applications. *Clinical journal of oncology nursing*, 20(5 Suppl), S14–S19. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.14-19>
- Musacchio, A. & Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(5), 379–393. <https://doi.org/10.1038/nrm2163>
- Nakayama, Y. & Inoue, T. (2016). Antiproliferative fate of the tetraploid formed after mitotic slippage and its promotion; a novel target for cancer therapy based on microtubule poisons. *Molecules*, 21(5), 663. <https://doi.org/10.3390/molecules21050663>
- Nassiri, F., Chakravarthy, A., Feng, S., Shen, S. Y., Nejad, R., Zuccato, J. A., Voisin, M. R., Patil, V., Horbinski, C., Aldape, K., Zadeh, G., De Carvalho, D. D. (2020). Detection and discrimination of intracranial tumors using plasma cell-free DNA methylomes.

- Nature medicine, 26(7), 1044–1047. <https://doi.org/10.1038/S41591-020-0932-2>
- Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T., Christopoulos, A. (2003). International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological reviews*, 55(4), 597–606. <https://doi.org/10.1124/pr.55.4.4>
- Neuhaus, E., Zirjacks, L., Ganser, K., Klumpp, L., Schüler, U., Zips, D., Eckert, F., Huber, S. M. (2019). Alternating electric fields (TTFs) activate Ca<sub>v</sub>1.2 channels in human glioblastoma cells. *Cancers*, 11(1), 110. <https://doi.org/10.3390/cancers11010110>
- Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annual review of biochemistry*, 69, 277–302. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.397>
- Novocure GmbH. (2021a). Optune (NovoTTF 200A) Benutzerhandbuch. Dokumentennummer QSD-EUUM-002-DE , Version 02. Abgerufen am 20.05.2022 unter: [https://www.optune.de/wp-content/uploads/2021/07/Optune-Benutzerhandbuch\\_ver2.0.pdf](https://www.optune.de/wp-content/uploads/2021/07/Optune-Benutzerhandbuch_ver2.0.pdf)
- Novocure GmbH. (2021b). Optune Patientenbroschüre "Die Therapie mit Optune®". Abgerufen am 21.08.2022 unter: <https://www.optune.de/wp-content/uploads/2021/12/Die-Therapie-mit-Optune.pdf>
- Ohgaki, H. & Kleihues, P. (2005). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 64(6), 479–489. <https://doi.org/10.1093/jnen/64.6.479>
- Ohgaki, H. & Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(4), 764–772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>

OMNI Life Science GmbH & Co KG (OLS). (2022). Internettauftritt mit Produkt-information "Live Cell Analysis System xCELLigence- Real-Time Cell Analyzer".

Abgerufen am 25.08.2022 unter:

<https://www.ols-bio.de/products/live-cell-analysis-system-xcelligence>

Osoba, D., Brada, M., Yung, W. K., Prados, M. (2000). Health-related quality of life in patients treated with temozolomide versus procarbazine for recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(7), 1481–1491.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.7.1481>

Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., Solecki, G., Venkataramani, V., Blaes, J., Weil, S., Horstmann, H., Wiestler, B., Syed, M., Huang, L., Ratliff, M., Karimian Jazi, K., Kurz, F. T., Schmenger, T., Lemke, D., Gömmel, M., Pauli, M., Liao, Y., Häring, P., Pusch, S., Herl, V., Steinhäuser, C., Krunic, D., Jarahian, M., Miletic, H., Berghoff, A. S., Griesbeck, O., Kalamakis, G., Garaschuk, O., Preusser, M., Weiss, S., Liu, H., Heiland, S., Platten, M., Huber, P. E., Kuner, T., Von Deimling, A., Wick, W., Winkler, F. (2015). Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*, 528(7580), 93–98. <https://doi.org/10.1038/NATURE16071>

Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Gittleman, H., Patil, N., Waite, K., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J. S. (2019). CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2012–2016. *Neuro-oncology*, 21(Suppl 5), v1–v100. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz150>

Paranjpe, A., Zhang, R., Ali-Osman, F., Bobustuc, G. C., Srivenugopal, K. S. (2014). Disulfiram is a direct and potent inhibitor of human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in brain tumor cells and mouse brain and markedly increases the alkylating DNA damage. *Carcinogenesis*, 35(3), 692–702. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt366>

Parkinson, J. F., Wheeler, H. R., Clarkson, A., McKenzie, C. A., Biggs, M. T., Little, N. S., Cook, R. J., Messina, M., Robinson, B. G., McDonald, K. L. (2008). Variation of O<sup>6</sup>-

methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples in glioblastoma. *Journal of neuro-oncology*, 87(1), 71–78.

<https://doi.org/10.1007/s11060-007-9486-0>

Pegg, A. E., Boosalis, M., Samson, L., Moschel, R. C., Byers, T. L., Swenn, K., Dolan, M. E. (1993). Mechanism of inactivation of human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase by O<sup>6</sup>-benzylguanine. *Biochemistry*, 32(45), 11998–12006.

<https://doi.org/10.1021/bi00096a009>

Penna, L. S., Henriques, J. A. P., Bonatto, D. (2017). Anti-mitotic agents: are they emerging molecules for cancer treatment?. *Pharmacology & therapeutics*, 173, 67–82. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.007>

Perry, J. R., Bélanger, K., Mason, W. P., Fulton, D., Kavan, P., Easaw, J., Shields, C., Kirby, S., Macdonald, D. R., Eisenstat, D. D., Thiessen, B., Forsyth, P., Pouliot, J. F. (2010). Phase II trial of continuous dose-intense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE study. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(12), 2051–2057.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.5520>

Perry, J. R., Laperriere, N., O’Callaghan, C. J., Brandes, A. A., Menten, J., Phillips, C., Fay, M., Nishikawa, R., Cairncross, J. G., Roa, W., Osoba, D., Rossiter, J. P., Sahgal, A., Hirte, H., Laigle-Donadey, F., Franceschi, E., Chinot, O., Golfopoulos, V., Fariselli, L., Wick, A., Feuvret, L., Back, M., Tills, M., Winch, C., Baumert, B. G., Wick, W., Ding, K., Mason, W. P. (2017). Short-course radiation plus temozolomide in elderly patients with glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 376(11), 1027–1037. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611977>

Pichlmeier, U., Bink, A., Schackert, G., Stummer, W. (2008). Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients. *Neuro-oncology*, 10(6), 1025–1034.

<https://doi.org/10.1215/15228517-2008-052>

- Pope, W. B., Sayre, J., Perlina, A., Villablanca, J. P., Mischel, P. S., Cloughesy, T. F. (2005). MR imaging correlates of survival in patients with high-grade gliomas. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 26(10), 2466–2474.
- Porat, Y., Giladi, M., Schneiderman, R. S., Blat, R., Shteingauz, A., Zeevi, E., Munster, M., Voloshin, T., Kaynan, N., Tal, O., Kirson, E. D., Weinberg, U., Palti, Y. (2017). Determining the optimal inhibitory frequency for cancerous cells using tumor treating fields (TTFields). *Journal of visualized experiments: JoVE*, (123), 55820. <https://doi.org/10.3791/55820>
- Quinn, J. A., Desjardins, A., Weingart, J., Brem, H., Dolan, M. E., Delaney, S. M., Vredenburgh, J., Rich, J., Friedman, A. H., Reardon, D. A., Sampson, J. H., Pegg, A. E., Moschel, R. C., Birch, R., McLendon, R. E., Provenzale, J. M., Gururangan, S., Dancey, J. E., Maxwell, J., Tourt-Uhlig, S., Herndon, J. E., Bigner, D. D., Friedman, H. S. (2005). Phase I trial of temozolomide plus O<sup>6</sup>-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(28), 7178–7187. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.502>
- Quinn, J. A., Jiang, S. X., Reardon, D. A., Desjardins, A., Vredenburgh, J. J., Rich, J. N., Gururangan, S., Friedman, A. H., Signer, D. D., Sampson, J. H., McLendon, R. E., Herndon, J. E., Walker, A., Friedman, H. S. (2009). Phase II trial of temozolomide plus O<sup>6</sup>-Benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(8), 1262–1267. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.8417>
- Reifenberger, G., Hentschel, B., Felsberg, J., Schackert, G., Simon, M., Schnell, O., Westphal, M., Wick, W., Pietsch, T., Loffler, M., Weller, M. (2011). MGMT promoter methylation is a predictive molecular marker in older patients with glioblastoma. *Clinical neuropathology*, 30(5), 260–261. <https://dx.doi.org/10.5414/NPP30245>

Roa, W., Brasher, P. M. A., Bauman, G., Anthes, M., Bruera, E., Chan, A., Fisher, B., Fulton, D., Gulavita, S., Hao, C., Husain, S., Murtha, A., Petruk, K., Stewart, D., Tai, P., Urtasun, R., Cairncross, J. G., Forsyth, P. (2004). Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(9), 1583–1588.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2004.06.082>

Robert-Koch-Institut. (2021). Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe, 172 Seiten. Abgerufen am 23.02.2022 unter:  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2021/krebs\\_in\\_deutschland\\_2021.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf?__blob=publicationFile).

Rominiyi, O., Vanderlinden, A., Clenton, S. J., Bridgewater, C., Al-Tamimi, Y., Collis, S. J. (2021a). Tumour treating fields therapy for glioblastoma: current advances and future directions. *British journal of cancer*, 124(4), 697.  
<https://doi.org/10.1038/s41416-020-01136-5>

Rominiyi, O., Vanderlinden, A., Clenton, S. J., Bridgewater, C., Al-Tamimi, Y., Collis, S. J. (2021b). Correction: Tumour treating fields therapy for glioblastoma: current advances and future directions. *British journal of cancer*, 125(4), 623.  
<https://doi.org/10.1038/s41416-021-01451-5>

Rulseh, A. M., Keller, J., Klener, J., Šroubek, J., Dbalý, V., Syrůček, M., Tovyřš, F., Vymazal, J. (2012). Long-term survival of patients suffering from glioblastoma multiforme treated with tumor-treating fields. *World journal of surgical oncology*, 10, 220. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-10-220>

Sahm, F., Schrimpf, D., Jones, D. T. W., Meyer, J., Kratz, A., Reuss, D., Capper, D., Koelsche, C., Korshunov, A., Wiestler, B., Buchhalter, I., Milde, T., Selt, F., Sturm, D., Kool, M., Hummel, M., Bewerunge-Hudler, M., Mawrin, C., Schüller, U., Jungk, C., Wick, A., Witt, O., Platten, M., Herold-Mende, C., Unterberg, A., Pfister, S. M., Wick, W., von Deimling, A. (2016). Next-generation sequencing in routine brain

tumor diagnostics enables an integrated diagnosis and identifies actionable targets. *Acta neuropathologica*, 131(6), 903–910.

<https://doi.org/10.1007/S00401-015-1519-8>

Salvador, E., Kessler, A. F., Hörmann, J., Domröse, D., Schaeffer, C., Burek, M., Tempel-Brami, C., Voloshin, T., Giladi, M., Ernestus, R.-I., Löhr, M., Förster, C., Hagemann, C. (2020). Tumor treating fields effects on the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(15\_suppl), 2551–2551.

[https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15\\_suppl.2551](https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.2551)

Salvador E., Kessler A. F., Domröse D., Hörmann J., Schaeffer C., Giniunaite A., Burek M., Tempel-Brami C., Voloshin T., Volodin A., Zeidan A., Giladi M., Ernestus R.-I., Löhr M., Förster C., Hagemann C. (2022). Tumor treating fields (TTFields) reversibly permeabilize the blood–brain barrier in vitro and in vivo. *Biomolecules*, 12(10), 1348. <https://doi.org/10.3390/biom12101348>

Salzberg, M., Kirson, E., Palti, Y., Rochlitz, C. (2008). A pilot study with very low-intensity, intermediate-frequency electric fields in patients with locally advanced and/or metastatic solid tumors. *Onkologie*, 31(7), 362–365.

<https://doi.org/10.1159/000137713>

Sanai, N., Polley, M. Y., McDermott, M. W., Parsa, A. T., Berger, M. S. (2011). An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *Journal of neurosurgery*, 115(1), 3–8. <https://doi.org/10.3171/2011.2.JNS10998>

Schlegel, U., Weller, M., Westphal, M. (Hrsg.). (2003). Referenz-Reihe Neurologie: Klinische Neurologie: Neuroonkologie. Allgemeine Neuroonkologie: 5 Grundlagen der speziellen Therapie. 5.5 Chemotherapie. Kapitelautoren: Weller, M., Schlegel, U. 2., erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.

<https://doi.org/10.1055/b-0034-90364>

- Schmidt, F., Fischer, J., Herrlinger, U., Dietz, K., Dichgans, J., Weller, M. (2006). PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma. *Neurology*, 66(4), 587–589. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000197792.73656.c2>
- Schneiderman, R. S., Shmueli, E., Kirson, E. D., Palti, Y. (2010). TFields alone and in combination with chemotherapeutic agents effectively reduce the viability of MDR cell sub-lines that over-express ABC transporters. *BMC cancer*, 10, 229. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-229>
- Schreck, K. C., Grossman, S. A. (2018). Role of temozolomide in the treatment of cancers involving the central nervous system. *Oncology*, 32(11), 555–569.
- Sebaugh, J. L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical statistics*, 10(2), 128–134. <https://doi.org/10.1002/pst.426>
- Shams, S. & Patel, C. B. (2022). Anti-cancer mechanisms of action of therapeutic alternating electric fields (tumor treating fields [TFields]). *Journal of molecular cell biology*, mjac047. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjac047>
- Silginer, M., Weller, M., Stupp, R., Roth, P. (2017). Biological activity of tumor-treating fields in preclinical glioma models. *Cell death & disease*, 8(4), e2753. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.171>
- Simon, M. (Hrsg.) (2018). *Gliomchirurgie*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-48694-8>
- Simon, M., Hosen, I., Gousias, K., Rachakonda, S., Heidenreich, B., Gessi, M., Schramm, J., Hemminki, K., Waha, A., Kumar, R. (2015). TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neuro-oncology*, 17(1), 45–52. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou158>
- Stummer, W., Meinel, T., Ewelt, C., Martus, P., Jakobs, O., Felsberg, J., Reifenberger, G. (2012). Prospective cohort study of radiotherapy with concomitant and adjuvant

temozolomide chemotherapy for glioblastoma patients with no or minimal residual enhancing tumor load after surgery. *Journal of neuro-oncology*, 108(1), 89–97. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-0798-3>

Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O. D., Zanella, F., Reulen, H.-J. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet. Oncology*, 7(5), 392–401. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70665-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70665-9)

Stummer, W., Reulen, H. J., Meinel, T., Pichlmeier, U., Schumacher, W., Tonn, J. C., Rohde, V., Opperl, F., Turowski, B., Woiciechowsky, C., Franz, K., Pietsch, T., Brune, A., Lanksch, W., Brock, M., Vesper, J., Goetz, C., Gilsbach, J. M., Mayfrank, L., Oertel, M. F., Seifert, V., Bink, A. J.W., Schackert, G., Pinzer, T., Hassler, W., Bani, A., Meisel, H. J., Kern, B. C., Mehdorn, H. M., Nabavi, A., Brawanski, A., Ullrich, O. W., Böker, D. K., Winking, M., Weber, F., Langenbach, U., Westphal, M., Kähler, U., Arnold, H., Knopp, U., Grumme, T., Stretz, T., Stolke, D., Wiedemayer, H., Wiestler, O. D. (2008). Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*, 62(3), 564–574. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000317304.31579.17>

Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J. B., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A. A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C. J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Mirimanoff, R. O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet. Oncology*, 10(5), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 352(10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>

Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D. M., Lhermitte, B., Toms, S., Idbah, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meo, F., Lieberman, F., Zhu, J. J., Stragliotto, G., Tran, D. D., Brem, S., Hottinger, A. F., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., Weinberg, U., Kim, C. Y., Paek, S. H., Nicholas, G., Burna, J., Hirte, H., Weller, M., Palti, Y., Hegi, M. E., Ram, Z. (2017a). Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: a randomized clinical trial. *JAMA*, 318(23), 2306–2316. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>

Erratum: Incorrect spelling of an author's name and data error. (2018). *JAMA*, 319(17), 1824. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.3431>

Stupp, R., Taphoorn, M., Driven, L., Taillibert, S., Honnorat, J., Chen, T. C., Sroubek, J., Paek, S. H., Escuder, J. B., Easaw, J., David, C., Kim, C., Desai, R., Olivi, A., Kew, Y., Hottinger, A., Hegi, M. E., Kirson, E., Lavy-Shahaf, G., Ram, Z. (2017b). Tumor treating fields (TTFields)—a novel cancer treatment modality: translating preclinical evidence and engineering into a survival benefit with delayed decline in quality of life. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. Clinical trials session, 99(5), P1316. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.09.013>

Stupp, R., Wong, E. T., Kanner, A. A., Steinberg, D., Engelhard, H., Heidecke, V., Kirson, E. D., Taillibert, S., Liebermann, F., Dbalý, V., Ram, Z., Villano, J. L., Rainov, N., Weinberg, U., Schiff, D., Kunschner, L., Raizer, J., Honnorat, J., Sloan, A., Malkin, M., Landolfi, J. C., Payer, F., Mehdorn, M., Weil, R. J., Pannullo, S. C., Westphal, M., Smrcka, M., Chin, L., Kostron, H., Hofer, S., Bruce, J., Cosgrove, R., Paleologous, N., Palti, Y., Gutin, P. H. (2012). NovoTTF-100A versus physician's

choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *European journal of cancer*, 48(14), 2192–2202.

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.04.011>

Tannous, B. A., Kerami, M., Van Der Stoop, P. M., Kwiatkowski, N., Wang, J., Zhou, W., Kessler, A. F., Lewandrowski, G., Hiddingh, L., Sol, N., Lagerweij, T., Wedekind, L., Niers, J. M., Barazas, M., Nilsson, R. J. A., Geerts, D., De Witt Hamer, P. C., Hagemann, C., Vandertop, W. P., Van Tellingen, O., Noske, D. P., Gray, N. S., Würdinger, T. (2013). Effects of the selective MPS1 inhibitor MPS1-IN-3 on glioblastoma sensitivity to antimitotic drugs. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(17), 1322–1331. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt168>

Taphoorn, M. J. B., Stupp, R., Coens, C., Osoba, D., Kortmann, R., van den Bent, M. J., Mason, W., Mirimanoff, R. O., Baumert, B. G., Eisenhauer, E., Forsyth, P., Bottomley, A., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour Group, EORTC Radiotherapy Group, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005). Health-related quality of life in patients with glioblastoma: a randomised controlled trial. *The Lancet. Oncology*, 6(12), 937–944. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70432-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70432-0)

Terzis, A. J. A., Thorsen, F., Heese, O., Visted, T., Bjerkgvig, R., Dahl, O., Arnold, H., Gundersen, G. (1997). Proliferation, migration and invasion of human glioma cells exposed to paclitaxel (taxol) in vitro. *British journal of cancer*, 75(12), 1744–1752. <https://doi.org/10.1038/bjc.1997.298>

Thomas, R. P., Xu, L. W., Lober, R. M., Li, G., Nagpal, S. (2013). The incidence and significance of multiple lesions in glioblastoma. *Journal of neuro-oncology*, 112(1), 91–97. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-1030-1>

Toms, S. A., Kim, C. Y., Nicholas, G., Ram, Z. (2019). Increased compliance with tumor treating fields therapy is prognostic for improved survival in the treatment of glioblastoma: a subgroup analysis of the EF-14 phase III trial. *Journal of neuro-oncology*, 141(2), 467–473. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-03057-z>

- Tuszynski, J. A., Wenger, C., Friesen, D. E., Preto, J. (2016). An overview of sub-cellular mechanisms involved in the action of TFields. *International journal of environmental research and public health*, 13(11), 1128.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph13111128>
- Van Den Bent, M. J., Brandes, A. A., Taphoorn, M. J. B., Kros, J. M., Kouwenhoven, M. C. M., Delattre, J. Y., Bernsen, H. J. J. A., Frenay, M., Tijssen, C. C., Grisold, W., Spos, L., Enting, R. H., French, P. J., Dinjens, W. N. M., Vecht, C. J., Allgeier, A., Lacombe, D., Gorlia, T., Hoang-Xuan, K. (2013). Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(3), 344–350. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.2229>
- Vijay Kumar, D., Hoarau, C., Bursavich, M., Slattum, P., Gerrish, D., Yager, K., Saunders, M., Shenderovich, M., Roth, B. L., McKinnon, R., Chan, A., Cimbor, D. M., Bradford, C., Reeves, L., Patton, S., Papac, D. I., Williams, B. L., Carlson, R. O. (2012). Lead optimization of purine based orally bioavailable Mps1 (TTK) inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(13), 4377–4385.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.131>
- Voloshin, T., Munster, M., Blatt, R., Shteingauz, A., Roberts, P. C., Schmelz, E. M., Giladi, M., Schneiderman, R. S., Zeevi, E., Porat, Y., Bomzon, Z., Urman, N., Itzhaki, A., Cahal, S., Kirson, E. D., Weinberg, U., Palti, Y. (2016). Alternating electric fields (TFields) in combination with paclitaxel are therapeutically effective against ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *International journal of cancer*, 139(12), 2850–2858. <https://doi.org/10.1002/ijc.30406>
- Waitkus, M. S., Diplas, B. H., Yan, H. (2016). Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro-oncology*, 18(1), 16–26. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov136>
- Walter, K. A., Cahan, M. A., Gur, A., Tyler, B., Hilton, J., Colvin, O. M., Burger, P. C., Domb, A., Brem, H. (1994). Interstitial taxol delivered from a biodegradable

polymer implant against experimental malignant glioma. *Cancer research*, 54(8), 2207–2212.

Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., Mcphail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325–2327. <https://doi.org/10.1021/ja00738a045>

Weaver, B. A. (2014). How taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular biology of the cell*, 25(18), 2677–2681. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0916>

Weaver, B. A. & Cleveland, D. W. (2005). Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer cell*, 8(1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.06.011>

Weingart, J., Grossman, S. A., Carson, K. A., Fisher, J. D., Delaney, S. M., Rosenblum, M. L., Olivi, A., Judy, K., Tatter, S. B., Dolan, M. E. (2007). Phase I trial of polifeprosan 20 with carmustine implant plus continuous infusion of intravenous O<sup>6</sup>-benzylguanine in adults with recurrent malignant glioma: new approaches to brain tumor therapy CNS Consortium trial. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(4), 399–404. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.6290>

Weller, M., Stupp, R., Reifenberger, G., Brandes, A. A., Van Den Bent, M. J., Wick, W., Hegi, M. E. (2010). MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?. *Nature reviews. Neurology*, 6(1), 39–51. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.197>

Weller, M., van den Bent, M., Preusser, M., Le Rhun, E., Tonn, J. C., Minniti, G., Bendszus, M., Balana, C., Chinot, O., Dirven, L., French, P., Hegi, M. E., Jakola, A. S., Platten, M., Roth, P., Rudà, R., Short, S., Smits, M., Taphoorn, M. J. B., von Deimling, A., Westphal, M., Soffietti, R., Reifenberger, G., Wick, W. (2021). EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature*

reviews. *Clinical oncology*, 18(3), 170–186.

<https://doi.org/10.1038/S41571-020-00447-Z>

Weller, M., van den Bent, M., Preusser, M., Le Rhun, E., Tonn, J. C., Minniti, G., Bendszus, M., Balana, C., Chinot, O., Dirven, L., French, P., Hegi, M. E., Jakola, A. S., Platten, M., Roth, P., Rudà, R., Short, S., Smits, M., Taphoorn, M. J. B., von Deimling, A., Westphal, M., Soffiatti, R., Reifenberger, G., Wick, W. (2022a).

Author correction: EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature reviews. Clinical oncology*, 19(5), 357–358.

<https://doi.org/10.1038/s41571-022-00623-3>

Weller, M., Knobbe-Thomsen, C.B., Le Rhun, E., Reifenberger, G. (2022b). Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems 2021. *Onkologie* 28, 155-163. <https://doi.org/10.1007/s00761-021-01083-7>

Wengner, A. M., Siemeister, G., Koppitz, M., Schulze, V., Kosemund, D., Klar, U., Stoeckigt, D., Neuhaus, R., Lienau, P., Bader, B., Prectl, S., Raschke, M., Frisk, A. L., Von Ahsen, O., Michels, M., Kreft, B., Von Nussbaum, F., Brands, M., Mumberg, D., Ziegelbauer, K. (2016). Novel Mps1 kinase inhibitors with potent antitumor activity. *Molecular cancer therapeutics*, 15(4), 583–592.

<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0500>

Westphal, M., Hilt, D. C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P. C., Whittle, I. R., Jääskeläinen, J., Ram, Z. (2003). A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncology*, 5(2), 79–88.

<https://doi.org/10.1093/NEUONC/5.2.79>

Wick, A., Pascher, C., Wick, W., Jauch, T., Weller, M., Bogdahn, U., Hau, P. (2009). Rechallenge with temozolomide in patients with recurrent gliomas. *Journal of neurology*, 256(5), 734–741. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-5006-9>

- Wick, W. (2021). Gliome, S2k-Leitlinie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.  
Abgerufen am 12.02.2022 unter: <https://2022.dgn.org/leitlinien/II-030-099-gliome-2021/>, sowie Download unter: [https://2022.dgn.org/wp-content/uploads/2021/07/030099\\_LL\\_Gliome\\_2021\\_final.pdf](https://2022.dgn.org/wp-content/uploads/2021/07/030099_LL_Gliome_2021_final.pdf)
- Wick, W., Platten, M., Meisner, C., Felsberg, J., Tabatabai, G., Simon, M., Nikkhah, G., Papsdorf, K., Steinbach, J. P., Sabel, M., Combs, S. E., Vesper, J., Braun, C., Meixensberger, J., Ketter, R., Mayer-Steinacker, R., Reifenberger, G., Weller, M. (2012). Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 13(7), 707–715.  
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70164-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70164-X)
- Young, R. M., Jamshidi, A., Davis, G., Sherman, J. H. (2015). Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Annals of translational medicine*, 3(9), 121. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.10>
- Yung, W. K. A., Albright, R. E., Olson, J., Fredericks, R., Fink, K., Prados, M. D., Brada, M., Spence, A., Hohl, R. J., Shapiro, W., Glantz, M., Greenberg, H., Selker, R. G., Vick, N. A., Rampling, R., Friedman, H., Phillips, P., Bruner, J., Yue, N., Osoba, D., Zaknoen, S., Levin, V. A. (2000). A phase II study of temozolemid vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *British journal of cancer*, 83(5), 588–593. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1316>
- Zacher, A., Kaulich, K., Stepanow, S., Wolter, M., Köhrer, K., Felsberg, J., Malzkorn, B., Reifenberger, G. (2017). Molecular diagnostics of gliomas using next generation sequencing of a glioma-tailored gene panel. *Brain pathology*, 27(2), 146–159.  
<https://doi.org/10.1111/bpa.12367>
- Zhao, S., Wu, J., Wang, C., Liu, H., Dong, X., Shi, C., Shi, C., Liu, Y., Teng, L., Han, D., Chen, X., Yang, G., Wang, L., Shen, C., Li, H. (2013). Intraoperative fluorescence-guided resection of high-grade malignant gliomas using 5-aminolevulinic acid-

induced porphyrins: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. PloS one, 8(5), e63682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063682>

Zhu, P. & Zhu, J.-J. (2017). Tumor treating fields: a novel and effective therapy for glioblastoma: mechanism, efficacy, safety and future perspectives. Chinese clinical oncology, 6(4), 41. <https://doi.org/10.21037/cco.2017.06.29>

## 8 Webverzeichnis

**Web 1** GraphPad-Software, Internet- Support Definition von IC<sub>50</sub> und EC<sub>50</sub>, entnommen am 15.12.2018: <https://www.graphpad.com/support/faq/50-of-what-how-exactly-are-ic50-and-ec50-defined/>, und entnommen am 30.11.2019: <https://www.graphpad.com/support/faqid/1566/>

**Web 2** Online-Datenbank des „Genomics of Drug Sensitivity in Cancer Project“ des Wellcome-Sanger-Institutes (UK) und dem Krebszentrum des Massachusetts General Hospital (USA):

Für VIN erstmals entnommen am 02.12.2019, Daten aktualisiert (Dataset GDSC2):

- verschiedene Tumorentitäten:

<https://www.cancerrxgene.org/compound/Vincristine/1818/overview/ic50>

- GBM:

<https://www.cancerrxgene.org/compound/Vincristine/1818/overview/ic50?tissue=GBM>

Für PTX erstmals entnommen am 03.12.2019, Daten aktualisiert (Dataset GDSC2):

- verschiedene Tumorentitäten:

<https://www.cancerrxgene.org/compound/Paclitaxel/1080/overview/ic50>

- GBM:

<https://www.cancerrxgene.org/compound/Paclitaxel/1080/overview/ic50?tissue=GBM>

**Web 3** Homepage Novocure, Forschung, entnommen am 04.06.2022:

<https://www.novocure.de/unsere-forschung/>

und Studien-Website, entnommen am 04.06.2022:

<https://novocuretrials.com/de/home-5/>

## Appendix

### I Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5- aminolevulinic acid
ATRX	$\alpha$ -thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
BCNU	Bis-Chlorethyl-NitrosoUrea, Carmustin
CCNU	Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea, Lomustin
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKN2A/B	Cyclin-dependent kinase- inhibitor 2A/B
c-IMPACT-NOW	Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy – Not Officially WHO
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
EANO	European Association of Neuro-Oncology
EC <sub>50</sub>	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FKS	Fetales Kälberserum
GBM	Glioblastom
GDSC	Genomics of Drug Sensitivity in Cancer
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MPS1	Monopolar spindle 1
MRT	Magnetresonanztomographie
NCIC	National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group
NEAA	Non-essential amino acids
NOS	Not otherwise specified

PBS	Phosphate buffered saline
PCV	Procarbazin + CCNU + Vincristin
PET	Polyethylenterephthalat
PTEN	Phosphatase deleted on chromosome 10
PTX	Paclitaxel
SAC	Spindle assembly checkpoint
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TET2	Ten-eleven translocation 2
TMZ	Temozolomid
TTFields (in Abb. auch TTF)	Tumor Treating Fields
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIN	Vincristin
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildungen	
Abb. 1	Integrierter Diagnosealgorithmus anhand der WHO-Klassifikation für diffuse Gliome im Erwachsenenalter und Empfehlungen des cIMPACT-NOW-Konsortiums, modifiziert nach Weller et al., 2021, 2022a, 2022b & Wick, 2021, open access/CC BY 4.0, Link zur Lizenz: <a href="http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Abb. 2	Anbringen der INE-Elektroden auf der rasierten Kopfhaut und Optune-Gerät mit Konnektor und Arrays, abgerufen am 01.09.2022 unter <a href="https://www.novocure.de/bildergalerie/">https://www.novocure.de/bildergalerie/</a> - Das Optune Therapiesystem, Verwendungsgenehmigung von Novocure vorliegend
Abb. 3	A + B: Wechselstromfeldverteilung in und um sich nicht teilende und sich teilende Zellen, modifiziert nach Kirson et al., 2007, open access (PNAS open access option); C: Einfluss der TFields auf das Zellmembranpotenzial, beziehungsweise spannungsabhängige Ca <sup>2+</sup> -Ionenkanäle, sowie die Zellmembranstabilität/-permeabilität, modifiziert nach Aguilar et al., 2021, open access/CC BY 4.0, Link zur Lizenz: <a href="http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Abb. 4	Firmeneigene Planungssoftware NovoTAL™ von Novocure, abgerufen am 21.08.2022 unter: <a href="http://aacr.novocure.com/mechanism_of_action.html">http://aacr.novocure.com/mechanism_of_action.html</a> , Verwendungsgenehmigung von Novocure vorliegend
Abb. 5	Scepter™ 2.0 Cell Counter: Gerät und Messsensor, eigene Aufnahmen
Abb. 6	xCELLigence RTCA DP- Analyseeinheit und 16- Well E-Plate®, eigene Aufnahmen
Abb. 7	Aufbau des TFields inovitro™ Laborforschungssystems und Oberfläche der inovitro™-Systemsoftware, Aufnahmen aus der inovitro™-Bedienungsanleitung von Novocure: Inovitro™-Instruction for use. Dokumentennummer QSD-QR-800, REV02, Ausgabedatum: 11.03.2015, Verwendungsgenehmigung von Novocure vorliegend
Abb. 8	Ergebnisse xCELLigence Vorversuche Zellzahlbestimmung
Abb. 9	Ergebnisse xCELLigence Vorversuche Beschichtungstest
Abb. 10	Vergleich TFields-Wirkung auf Glas- und Thermanox-Deckgläschen
Abb. 11	Proliferations- und Dosis-Wirkungskurven zur EC <sub>50</sub> - Bestimmung von VIN

Abb. 12	Proliferations- und Dosis-Wirkungskurven zur EC <sub>50</sub> - Bestimmung von PTX
Abb. 13	Zellzahlen nach verschiedenen Behandlungskombinationen
Abb. 14	Zellzahlveränderung nach 72h im Vergleich zu t <sub>0</sub>
Abb. 15	Absolute Zellzahlen von U87 pro ml über 72h VIN-Behandlung
Abb. 16	Absolute Zellzahlen von GaMG pro ml über 72h VIN-Behandlung
Abb. 17	Absolute Zellzahlen von U87 pro ml über 72h PTX-Behandlung
Abb. 18	Absolute Zellzahlen von GaMG pro ml über 72h PTX-Behandlung

### III Tabellenverzeichnis

Tabellen	
Tabelle 1	WHO-Klassifikation ZNS-Tumoren
Tabelle 2	Geräte und Materialien
Tabelle 3	Software
Tabelle 4	Chemikalien und Reagenzien
Tabelle 5	Zelllinien
Tabelle 6	Gates
Tabelle 7	Versuchsansatz TTFIELDS-Behandlung mit VIN beziehungsweise PTX

#### **IV Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen, die zur Durchführung dieser Arbeit in irgendeiner Weise beigetragen haben herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Carsten Hagemann für die Bereitstellung dieses Themas und die gute Betreuung während der gesamten Zeit, sowie Herrn Prof. Dr. med. Mario Löhr und Frau Prof. Dr. rer. nat. et med. habil. Carola Förster für die Zweit- beziehungsweise Drittbetreuung des Projektes.

Außerdem danke ich den technischen Assistentinnen Frau Elisabeth Karl und Siglinde Kühnel für die tatkräftige Unterstützung bei zahlreichen Labortätigkeiten, Denise Johnson für die Zusammenarbeit im Rahmen Ihrer Bachelorarbeit und Unterstützung bei den Versuchen, sowie dem Klinikdirektor Herrn Prof. Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus für die Ermöglichung dieser Arbeit.