

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. R.- I. Ernestus

**Verstärkung von Tumor Treating Fields durch Inhibition der MPS1 Kinase in Glioblastom-
Zelllinien**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Franziska Gross

aus Würzburg

Würzburg, Januar 2020

Referent: Priv.-Doz. Dr. Carsten Hagemann

Korreferent bzw. Korreferentin:

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2020

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
1.1 Maligne Gliome	- 1 -
1.2 Glioblastoma multiforme	- 2 -
1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie	- 2 -
1.2.2 Klinik des Glioblastoms	- 3 -
1.2.3 Diagnostik des Glioblastoms	- 3 -
1.2.4 Klassifikation	- 5 -
1.2.5 Therapie und Prognose	- 7 -
1.3 Tumor Treating Fields – Klinische Bedeutung	- 10 -
1.3.1 Applikation	- 11 -
1.3.2 Kontraindikationen und Nebenwirkungen	- 12 -
1.4 Der Zellzyklus	- 14 -
1.4.1 Der mitotische Spindelkontrollpunkt	- 17 -
1.4.2 Inhibition der MPS1 Kinase	- 19 -
1.5 Tumor Treating Fields – Molekularer Wirkmechanismus	- 20 -
1.5.1 Der antimikrotubuläre Effekt	- 20 -
1.5.2 Dielektrophorese	- 21 -
1.5.3 Membrane Blebbing	- 23 -
1.6 Gegenstand der Arbeit	- 24 -
2. Material und Methoden	- 26 -
2.1 Materialien	- 26 -
2.1.1 Geräte	- 26 -
2.1.2 Chemikalien	- 27 -
2.1.3 Gebrauchsfertige Kits	- 28 -
2.1.4 Verbrauchsmaterial	- 28 -
2.1.5 MPS1 Kinase Inhibitoren	- 28 -
2.1.6 Antikörper	- 29 -
2.1.7 Software	- 29 -
2.1.8 Zelllinien	- 29 -
2.1.9 Lösungen und Medien	- 30 -
2.2 Methoden	- 32 -

2.2.1	Versuchsansätze.....	- 32 -
2.2.2	TTFields Behandlung.....	- 34 -
2.2.3	Zellkulturmethoden.....	- 36 -
2.2.4	Zellernte und Zellzählung.....	- 38 -
2.2.5	Zellfixierung für durchflusszytometrische Arbeiten.....	- 40 -
2.2.6	Durchflusszytometrie	- 40 -
2.2.7	Fluoreszenz-Mikroskopie	- 47 -
2.2.8	Statistische Auswertung.....	- 48 -
3.	Ergebnisse	- 49 -
3.1	Zellzahlreduktion.....	- 49 -
3.2	Zellzyklusanalyse	- 56 -
3.3	Apoptose	- 59 -
4.	Diskussion	- 62 -
5.	Zusammenfassung.....	- 69 -
6.	Literaturverzeichnis.....	- 70 -

1. Einleitung

1.1 Maligne Gliome

Allen bösartigen Neuerkrankungen ist gemein, dass sich die Tumorzellen durch eine gesteigerte Proliferationsrate und eine niedrigere Differenzierung von den Zellen des Ursprungsgewebes unterscheiden. Während Patienten mit bestimmten Tumorentitäten eine hohe Überlebensrate aufweisen, sind andere Entitäten durch besonders aggressives Wachstum oder frühzeitige Metastasierung schwer behandelbar, wodurch die Patienten eine deutlich niedrigere Überlebensrate haben. So zählt das Glioblastoma multiforme (GBM), ein Tumor des Zentralen Nervensystems (ZNS) mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 5% zu den häufigsten krebsbedingten Todesursachen bei jungen Erwachsenen [1, 2]. Das GBM ist der häufigste bösartige hirneigene Tumor und gehört zu der heterogenen Gruppe der Gliome [2]. Diese umfasst Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependymome, gemischte Gliome und Gliome des Plexus Choroideus [3]. Gliome entwickeln sich aus der Neuroglia, welche das Nähr- und Stützgewebe der Neurone darstellt und werden anhand histologischer Kriterien und molekularer Marker klassifiziert. Sie stellen mit 24% nach Meningeomen die zweithäufigste primäre Tumorentität des ZNS dar (Abbildung 1).

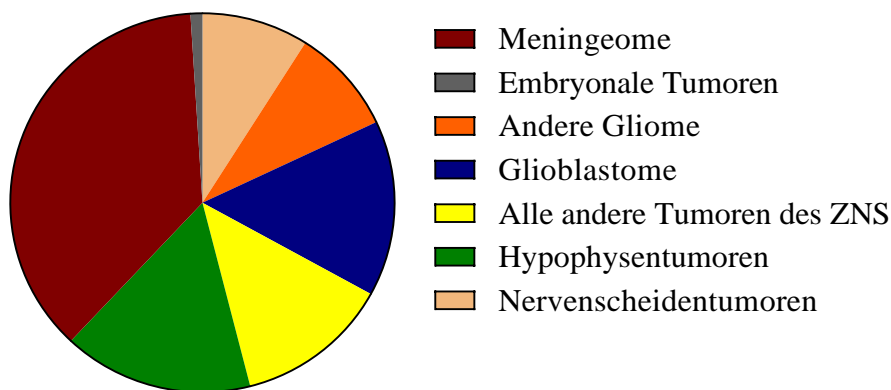


Abbildung 1: Verteilung der primären Tumoren des ZNS

Glioblastome (14%) und andere Gliome (9%) machen zusammen 24% aller primären ZNS-Tumoren aus. Sie stehen damit an zweiter Stelle nach den Meningeomen (37%). ZNS=Zentrales Nervensystem. Eigene Abbildung.

1.2 Glioblastoma multiforme

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die Inzidenz des GBM liegt in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) bei 3,51 Fällen auf 100.000 Einwohnern und macht damit mit knapp 49% den größten Anteil aller primär malignen ZNS-Tumoren aus (Abbildung 2) [4].

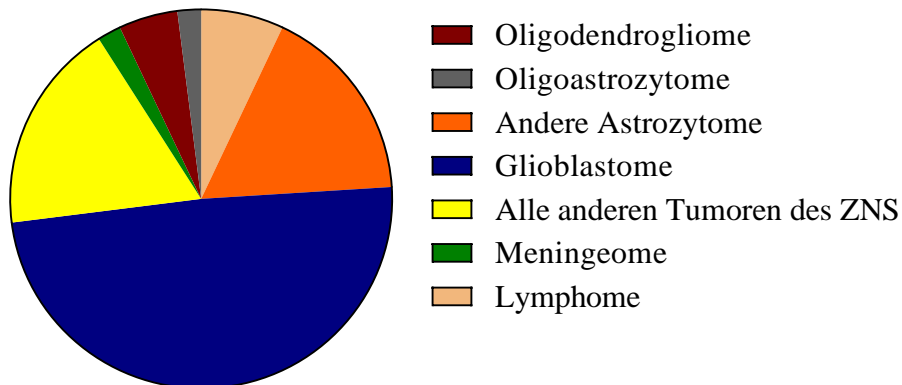


Abbildung 2: Verteilung der primär malignen Tumoren des ZNS

Das Glioblastoma multiforme nimmt mit 49% den größten Anteil an primär malignen ZNS-Tumoren ein. ZNS=Zentrales Nervensystem. Eigene Abbildung.

Das GBM kann prinzipiell in jedem Alter auftreten, hat jedoch die höchste Inzidenz zwischen dem 75. und 84. Lebensjahr und eine sehr geringe Inzidenz in der Kindheit [5]. Es ist bekannt, dass das GBM mit einem Geschlechterverhältnis von 1,6 : 1,0 häufiger bei Männern als bei Frauen auftritt [5]. Interessanterweise ist die Prävalenz in industrialisierten Nationen höher als in weniger entwickelten Ländern, was einige Autoren auf die bessere Dokumentation von Patientenfällen, den besseren Zugang zum Gesundheitssystem und auf unterschiedliche diagnostische Methoden zurückführen [2].

Es sind bis heute wenige Risikofaktoren, die zur Entstehung von GBM beitragen, bekannt. Ein gesichertes Risiko stellt die therapeutische Anwendung ionisierender Strahlen dar [6]. Es wurde eine Verdopplung der Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines GBM bei Patienten festgestellt, die in der Kindheit eine Computertomographie (CT) Diagnostik erhalten hatten. Dieses Risiko steigt mit zunehmender Dosis der Strahlung und Exposition in früheren Kindesjahren an [7]. Die Verbindung zwischen der Nutzung von Mobiltelefonen und Hirntumoren bleibt kontrovers diskutiert. Einige Studien beschreiben bei intensiver und langjähriger Nutzung von Mobiltelefonen einen Anstieg des Risikos,

ein GBM zu entwickeln, während andere groß angelegte Studien zu keinem signifikanten Zusammenhang zwischen Mobiltelefon-Nutzung und der Gliom-Erkrankung kommen [8], [9]. Andere Umwelteinflüsse wie Vinylchloride, Pestizide und Nikotin, die häufig zur Tumorentstehung beitragen, sind ebenfalls nicht mit diesen Hirntumoren assoziiert [10]. Ein kleiner Anteil von GBM ist mit einer besonderen genetischen Prädisposition, die zur Entwicklung von Tuberöser Sklerose, dem Turcot-Syndrom, dem Li-Fraumeni-Syndrom oder Neurofibromatose Typ 1 und 2 führt, assoziiert [11].

1.2.2 Klinik des Glioblastoms

Die klinische Manifestation des GBM ist von dem Alter des Patienten, der Lokalisation, Größe und Größenprogression des Tumors abhängig. Die Symptomatik ist meist auf eine lokale Störung der infiltrierten Hirnareale oder auf eine kranielle Druckerhöhung zurückzuführen. Die durch Gliome verursachten klinischen Hauptsymptome wurden in einer Studie durch Posti et al. untersucht. Die Forscher beobachteten, dass in abnehmender Häufigkeit kognitive Störungen (57%), epileptische Anfälle (53%), Aphasie (25%), motorische Paresen (22%) und Kopfschmerzen (20%) aufgetreten waren [12]. Während intraventrikuläre Läsionen aufgrund des daraus entstehenden erhöhten Hirndruckes und Hydrozephalus oft Kopfschmerzen, Schwindel und Erbrechen verursachen, zeigen Patienten mit extraventrikulären, supratentoriellen Tumoren kognitive Veränderungen, Verhaltensänderungen, epileptische Anfälle und Lethargie als Erstsymptome [8].

1.2.3 Diagnostik des Glioblastoms

In der Diagnostik von GBM steht an erster Stelle die Anamnese und die klinisch-neurologische Untersuchung. Hierbei sind insbesondere der neurologische Ausgangszustand und der Karnofsky-Index zu dokumentieren. Außerdem kommt der Neuroradiologie eine wichtige Säule in der Diagnostik zu. Als Methode der Wahl wird eine Magnetresonanztomographie (MRT) mit und ohne Kontrastmittel in einer maximalen Schichtdicke von 5 mm durchgeführt. Vorteil der MRT gegenüber der CT ist der hohe Weichteilkontrast, welcher die Heterogenität des Tumors gut nachweisen kann. Des Weiteren sollte als ein bildgebendes Verfahren die T1-gewichtete Gadolinium-anreichernde MRT Sequenz in 3 Ebenen (sagittal, koronar, axial) gefahren werden, um die Tumorgöße und Ausdehnung genauestens evaluieren zu können [13]. Außerdem sind die Positronen-Emissions-Tomographie und die Einzelphotonen-

Emissionscomputertomographie bei Verdacht auf Metastasierung nützliche weitere Techniken. Falls eine MRT-Untersuchung kontraindiziert ist, wird eine CT empfohlen [13]. Radiologisch präsentiert sich das GBM in der MRT mit irregulären Konturen und einer peripheren kontrastmittelanreichernden Zone, die die nekrotische, hypodense Mitte umschließt [13]. Makroskopisch erscheint das GBM als ein sehr heterogener Tumor mit multifokalen Hämorrhagien, Nekrosen, Zysten und gelatinösen Strukturen [14]. GBM sind durch das infiltrative Wachstum charakterisiert, das für eine schnelle Ausbreitung in benachbarte Hirnregionen verantwortlich ist. Die bevorzugte Region ist bei Erwachsenen die Marklagerregion. Hier wiederum ist vor allem der fronto-temporale Lappen betroffen [2]. Durch das Corpus callosum und andere Faserbahnen wie die Capsula interna können die Glioblastomzellen schließlich in die kontralaterale Hemisphäre eindringen und zum sogenannten Schmetterlingsgliom anwachsen. Bei der differentialdiagnostischen Abklärung eines primären ZNS-Lymphom, eines Keimzelltumors oder einer entzündlichen Erkrankung (Hirnabszess) spielt die Liquor-Punktion eine wichtige Rolle. Auch die Elektroenzephalographie kann weitere wichtige Informationen bei Patienten mit symptomatischen Epilepsien bezüglich der Lokalisation und Ausbreitung von Tumoren geben [15].

Letztendlich wird durch Anamnese, klinische Untersuchung und Bildgebung nur eine Verdachtsdiagnose geäußert, die mittels einer Biopsie und mikroskopischer Diagnostik bestätigt werden muss, um ein auf den Patienten abgestimmtes neuroonkologisches Therapiekonzept zu erarbeiten. Die Biopsie mit einer zytomorphologischen und molekularen Diagnostik ist der letzte und entscheidende Schritt des Diagnostik-Algorithmus. Das Material kann zum einen durch eine offene Operation bei gleichzeitiger Tumorentfernung entnommen werden, was zugleich diagnostische und therapeutische Maßnahme in Einem ist. Dieses Verfahren wird bei Gliomen am häufigsten verwendet. Zum anderen kann bei schlechtem Allgemeinzustand, schweren Begleiterkrankungen oder hohem Alter des Patienten mit hohem intraoperativem Risiko zunächst die alleinige Diagnosesicherung mittels stereotaktischer Serienbiopsie angestrebt werden. Die Biopsien werden bei stereotaktischer Entnahme mittels Quetschtechnik und Supravitalfärbung oder bei dem Operationsverfahren mittels Kryostatschnitttechnik und Hämatoxylin-Eosin-Färbung beurteilt [15].

Eine große Rolle kommt der Sequenzierung der Gene für Isocitratdehydrogenase (IDH) 1 oder IDH 2 bei der Abgrenzung der Glioblastome von Oligodendrogliomen und Astrozytomen der World Health Organization (WHO) Grade II und III zu.

1.2.4 Klassifikation

Die WHO-Gradierung dient einer präzisen Einteilung der verschiedenen Gliome in klinisch relevante Entitäten. Sie berücksichtigt histologische Merkmale der Tumorzellen, zytomorphologische Kriterien sowie wichtige molekulare Marker, wodurch eine erhöhte diagnostischen Sicherheit, verbessertes Patientenmanagement und genauere Vorhersagen der Prognose und des Therapieansprechens der Patienten erzielt wird [16]. Das diagnostische Vorgehen besteht aus drei Ebenen: Zuerst erfolgt die lichtmikroskopische Zuordnung der Zellen zu einem bestimmten Typ (Ebene 1). Diese Zuordnung erfolgt nach histologischen Ähnlichkeiten zu den die Entartung betreffenden Zellen (astrozytär, oligodendroglial, ependymal). Es folgt die Einteilung in 4 Malignitätsgrade (Ebene 2) anhand zytomorphologischer Kriterien wie Kernpolymorphie, Zelldichte, Anzahl von Mitosen, Vorhandensein von Nekrosen und endotheliale Proliferation. Dabei stellt Grad I den niedrigsten und Grad IV, zu dem das GBM gehört, den höchsten Malignitätsgrad dar. Anschließend erfolgt die molekulargenetische Testung (Ebene 3). Hierbei sind diagnostische Biomarker zur Präzisierung der Tumorentität (Isocitratdehydrogenase), prognostische Biomarker zur besseren Vorhersage der individuellen Prognose (Verlust von Chromosom 10) und prädiktive Biomarker (O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Promotor-Methylierung), die das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie vorhersagen, voneinander abzugrenzen. Alle drei Ebenen werden dann zu einer integrierten Diagnose (Ebene 4) zusammengefügt [16].

Vor Einführung der aktuellen WHO-Klassifikation im Jahr 2016 wurde das GBM in einen primären (90%) und einen sekundären Typ (10%) unterschieden. Primäre Glioblastome traten ohne bekannte maligne Vorerkrankung bei älteren Patienten (Mittleres Alter: 62 Jahre) auf, während sich sekundäre Glioblastome im Rahmen einer malignen Progression aus diffusen Astrozytomen WHO-Grad-II und anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad-III bei eher jüngeren Patienten (Mittleres Alter: 44 Jahre) entwickelten und mit einer etwas günstigeren Prognose assoziiert waren. Interessanterweise zeigten molekulargenetische Untersuchungen, dass histologisch identische GBM unterschiedliche molekulargenetische

Veränderungen aufweisen, die der klinischen Einteilung in primäre und sekundäre Tumoren weitgehend entsprachen (Tabelle 1). So haben bis zu 85% aller sekundären Glioblastome Mutationen der IDH, während diese Alteration bei nur 5% der primären GBM aufzufinden ist [17, 18]. Daher werden heute GBM primär anhand von Mutationen in den Genen für IDH 1 oder IDH 2 in einen Wildtyp und einen IDH-mutierten Typ differenziert. Die Tumoren, die sich nicht anhand von IDH charakterisieren lassen, werden als GBM not otherwise specified (NOS) bezeichnet. Die IDH-Mutation stellt wahrscheinlich das initiale genetische Ereignis in der Entstehung diffuser Gliome dar. Funktionell handelt es sich bei diesen Punktmutationen um „Gain-of-function“-Mutationen. Das heißt, dass die aus den mutierten Genen exprimierten Proteine im Vergleich zum normalen Protein eine neue Funktion wahrnehmen. Die Enzyme IDH 1 und IDH 2 sind wichtig für den zellulären Metabolismus, die epigenetische Regulation und verschiedene DNA Reparaturvorgänge. Die Mutationen in den Genen für IDH 1 oder IDH 2 führen zu einer Neu-Produktion von 2-Hydroxyglutarat unter Verbrauch von NADPH. Die Akkumulation von 2-Hydroxyglutarat führt zu einem kompetitiven Antagonismus mit α -Ketoglutarat um α -Ketoglutarat abhängige Enzyme. Diese Enzyme sind wiederum an der Karzinogenese durch die Regulierung des zellulären Metabolismus und der DNA Reparaturvorgänge maßgeblich beteiligt [19-21]. Es hat sich gezeigt, dass die IDH nicht nur als diagnostischer, sondern auch als prognostischer Marker dienen kann: Der klinische Verlauf von Patienten mit Gliomen, die eine IDH-Mutation aufwiesen, zeigte sich günstiger als bei Patienten, deren Gliome bei gleicher Histologie nicht IDH-mutiert waren (Tabelle 1) [20].

	IDH-Wildtyp GBM	IDH-mutiertes GBM
Synonym	Primäres Glioblastom, IDH-Wildtyp	Sekundäres Glioblastom, IDH-mutiert
Erkrankung in der Vorgeschichte	Keine	Diffuses Astrozytom, Anaplastisches Astrozytom
Verteilung	90%	10%
Medianes Alter bei Diagnosestellung	62 Jahre	44 Jahre
Mediane Länge der klinischen Vorgeschichte	4 Monate	15 Monate
Medianes Gesamt-Überleben nach chirurgischer Resektion, Strahlentherapie und Chemotherapie	14,6 Monate	24 Monate
Lokalisation	Supratentoriell	Frontal

Tabelle 1: Charakterisierung des IDH-Wildtyp GBM und des IDH-mutierten GBM. Tabelle modifiziert nach [16]. GBM=Glioblastoma multiforme, IDH=Isocitratdehydrogenase.

1.2.5 Therapie und Prognose

Die Säulen der Therapie des Glioblastoms sind Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie. Als Basis der Therapie wird die chirurgische Resektion mit einer Tumormassereduktion, Entlastung des Hirndrucks und Wiederherstellung einer zuvor gestörten neurologischen Funktion, angesehen [2]. Je mehr Tumormasse entfernt werden kann, desto besser ist die Prognose für den Patienten. Um dies zu erreichen, kann das Tumorgewebe durch Fluoreszenz-Farbstoffe markiert oder intraoperativ durch MRT dargestellt werden [22, 23]. Die Radikalität der chirurgischen Resektion ist von der Größe und Lokalisation des GBM abhängig. Da die Tumoren stark invasiv wachsen, ist häufig keine komplette chirurgische Resektion möglich, weshalb die Lokalrezidivrate (2-3 cm von der Originalläsion) bei etwa 80% liegt [24].

Um das unifokale Wachstum der Resttumorzellen nach einem chirurgischen Eingriff so klein wie möglich zu halten, wird standardmäßig bei GBM Patienten eine Strahlentherapie (ST) 4 bis 6 Wochen nach der Operation durchgeführt. Die ionisierenden Strahlen führen zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) von sich teilenden Zellen und somit zu einer Wachstumsinhibition dieser Zellen [25]. Die ST verlängert die Überlebenszeit der Patienten im Vergleich zur alleinigen Operation bei guter

Lebensqualität um 6 Monate [26]. Die Gesamtdosis ist 60 Gy, die in einzelnen Sitzungen mit einer Dosis von 1,7-2 Gy über 6-7 Wochen appliziert wird. Das bestrahlte Feld umfasst die vom GBM infiltrierte Läsion und eine Randzone von 2-3 cm. Als Nebenwirkungen der Therapie sind die akute Strahlenreaktion (Müdigkeit, Übelkeit, Kopfschmerzen, lokaler Haarausfall) und die späte Strahlenreaktion (Verschlechterung des neurologischen Untersuchungsbefundes, Strahlennekrose, Katarakt und Bildung von Zweittumoren) beschrieben. Außerdem sind Limitationen der ST zu beachten. Dazu gehören ein infiltratives Tumorwachstum, strahleninduzierte Enzephalopathie und die intrinsische oder erworbene Strahlenresistenz mancher Tumoren [24]. Bei älteren Patienten über 60 Jahren ist eine abgeschwächte Variante der ST in Form von 40 Gy in 15 Fraktionen über 3 Wochen eine gleichwertige Option gegenüber der länger andauernden ST [27]. Insbesondere im Hinblick auf die Lebensqualität der Patienten scheint diese Behandlung mit der verkürzten Behandlungszeit und dem geringeren Gebrauch von Kortikosteroiden (Management der akuten Strahlenreaktion) der Standardbehandlung überlegen zu sein [27].

Als dritte Säule der GBM Therapie ist die Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) etabliert. TMZ, ein orales Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Alkylanzien, verursacht DNA-Schäden, die zum Untergang der Tumorzelle führen [25]. In einer klinischen Studie durch Stupp et al. wurde 2005 beobachtet, dass die gleichzeitige Anwendung von Chemo- und Strahlentherapie mit nachfolgender Chemotherapie im Vergleich zur alleinigen ST das mediane Überleben von 12,1 Monate auf 14,6 Monate signifikant ($p < 0,001$) steigern konnte [28]. TMZ wird gemäß des Stupp-Schemas konkordant zur ST in einer Konzentration von 75 mg/m²/Tag und adjuvant nach Beendigung der ST für 6 Zyklen in einer Konzentration von 150 mg/m²/Tag für 5 Tage in einer Zyklusdauer von 28 Tagen gegeben [25]. Der Hauptmechanismus der TMZ Wirkung besteht in der Methylierung an der N7 und O6 Position von Guanin, welches eine Base der DNA ist. Das methylierte Guanin kann nicht mit Cytosin als komplementärer Base, sondern mit Thymin paaren. Die vom DNA-Mismatch-Repair-System durchgeführten Reparaturversuche dieser Fehlpaarung laufen ins Leere, was in Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA resultiert und schlussendlich zur Apoptose führt [25, 29]. Hier spielt der Methylierungsstatus der MGMT-Promotorregion eine große Rolle. MGMT ist ein DNA-Reparaturenzym, welches Tumorzellen gegen alkylierende Substanzen

schützen kann, indem es die durch TMZ angefügten methylierten Gruppen wieder entfernt. Eine Hypermethylierung in der Promotorregion des MGMT-Gens führt zu einer Inaktivierung des Gens und damit zu verminderter MGMT-Produktion, was wiederum die Sensitivität für eine Chemotherapie mit TMZ erhöht und damit das mediane Überleben verlängert. So kann der MGMT-Methylierungsstatus eine Entscheidungshilfe zur Chemotherapie mit TMZ bei älteren Patienten geben. Das Nebenwirkungsprofil von TMZ umfasst Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Obstipation und Fatigue-Symptomatik und die Dosis-limitierende Myelosuppression. Letztere kam bei der von Stupp et al. veröffentlichten Studie bei 16% der mit TMZ-behandelten Patienten vor und führte bei 5% zu einem vorzeitigen Therapieabbruch [28].

Das GBM ist ein sehr aggressiver Tumor mit einem medianen Überleben bei unbehandelten Patienten von nur 3 Monaten [24]. Die Überlebenszeit von Patienten hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab. Jüngere Patienten (unter 40 Jahren) haben eine deutlich höhere 5-Jahres-Überlebensrate als Patienten, deren Diagnose erst nach dem 40. Lebensjahr gestellt wurde (Tabelle 2). Des Weiteren konnte bei Patienten mit einem höheren Resektionsausmaß eine längere Überlebenszeit beobachtet werden [2]. Ferner gibt es molekulare Marker, die eine prognostische Aussagekraft haben. Bei Patienten mit einem IDH-Mutierten GBM sowie bei Patienten ohne MGMT Hypermethylierung ist die Prognose besser im Vergleich zu Patienten mit einem IDH-Wildtyp GBM beziehungsweise Patienten mit MGMT Hypermethylierung [30].

	N (Anzahl)	1-Jahres- Überlebensrate (%)	2-Jahres- Überlebensrate (%)	5-Jahres- Überlebensrate (%)
Alter: 15-39 Jahre	1 998	74,3	48,0	22,7
Alter: >40 Jahre	34 270	38,1	15,5	5,6

Tabelle 2: 1-, 2- und 5-Jahres-Überlebensraten von Patienten mit einem neu diagnostizierten GBM (Alter bei Diagnose: 15-39 oder >40 Jahre) aus den USA zwischen den Jahren 2011-2015. Tabelle modifiziert nach [4].

Damit bleibt das GBM trotz der multimodalen Behandlung einer der am schwersten zu therapierenden Tumoren. Es müssen neue molekulare Angriffsstrukturen gefunden und neue Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden, um ein besseres Outcome für die Patienten zu erreichen.

1.3 Tumor Treating Fields – Klinische Bedeutung

Tumor Treating Fields (Tumor-Therapie-Felder, TTFields) sind eine neue Behandlungsmodalität in der Therapie rezidivierender und neu diagnostizierter GBM und haben in zwei unterschiedlichen Studien (EF-11 und EF-14) als alleinige Therapie oder in Kombination mit TMZ im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung zu einem vergleichbaren oder sogar verlängerten Gesamtüberleben der Patienten geführt [31, 32]. TTFields sind über Elektroden auf der Körperoberfläche extern applizierte elektrische Wechselfelder mit einer niedrigen Intensität (<2 V/cm) im intermediären Frequenzbereich (100-300 kHz). Es wurde gezeigt, dass eine bestimmte Frequenz in der Therapie von einer spezifischen Tumor-Entität die besten Ergebnisse im Hinblick auf Zellzahlreduktion (*in-vitro*) und Tumormassereduktion (*in-vivo*) bewirkte [33]. Für GBM zeigte sich die Frequenz von 200 kHz am effektivsten [33]. Optune[®] ist ein von Novocure[™] entwickeltes, tragbares Gerät, welches die Wechselfelder über Transducer Arrays (Arrays) nichtinvasiv durch die Kopfhaut in den Tumor übertragen kann. In der klinischen Studie EF-11 von 2012 wurde unter anderem das Gesamtüberleben, das progressionsfreie Überleben nach 6 Monaten und die Rate an schweren Nebenwirkungen unter der Therapie von Patienten mit rezidivierendem GBM untersucht. Die beiden Studienarme teilten sich in eine Gruppe mit alleiniger TTFields Therapie und einer alleinigen Chemotherapie auf. Sowohl das mediane Überleben (6,6 Monate bei TTFields vs. 6,0 Monate bei TMZ), als auch das progressionsfreie Überleben nach 6 Monaten (21,4% bei TTFields vs. 15,1% bei TMZ) war in beiden Gruppen etwa gleich hoch. Als Nebenwirkungen wurden bei der TTFields Therapie milde bis moderate Hautirritationen beschrieben. Schwere Nebenwirkungen wurden in dem TTFields-Arm mit 6% deutlich weniger als in dem TMZ-Arm mit 16% ($p=0,022$) beobachtet [32]. Aus diesen Ergebnissen folgerten die Autoren, dass es sich bei den TTFields um eine neue Behandlungsmöglichkeit bei rezidivierendem GBM handeln könnte, die der TMZ-Therapie in nichts nachstehe. Während die EF-11 Studie das Überleben von Patienten mit rezidivierenden GBM untersucht hatte, wurden in der EF-14 Studie Patienten mit neu diagnostizierten GBM in zwei Studienarme eingeteilt und beobachtet. Während die eine Gruppe nach der Operation und einer konkordanten Radiochemotherapie eine Kombination aus TTFields und TMZ erhielt, bekam die andere Gruppe in der Folge eine alleinige Chemotherapie mit TMZ (n=229). Das Mediane

Gesamtüberleben der Patienten, welche eine Kombinationstherapie erhielten, war mit 20,5 Monaten länger als das mit 16,6 Monaten Gesamtüberleben jener Patienten, die eine reine TMZ-Therapie erhalten hatten ($p=0,004$) [34]. Ebenfalls konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der 2-Jahres-Überlebensrate beobachtet werden: 2 Jahre nach Studieneinschluss waren in der Gruppe der Kombinationstherapie 43% der Patienten am Leben, während in der Gruppe der alleinigen Chemotherapie 29% überlebt hatten ($p=0,006$). Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten die Autoren, dass die Kombination aus TTFields und TMZ zu einem verlängerten Überleben bei gleichzeitig vergleichbar hoher Lebensqualität und weniger Nebenwirkungen geführt hatte und damit zu einem neuen Standardregime werden könnte. Der Einsatz von TTFields zeigt nicht nur erfolgsversprechende Ergebnisse bei der GBM Therapie, sondern auch bei anderen Tumorentitäten. Aktuell werden bei Patienten mit Pankreaskarzinom (PANOVA), nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (LUNOVA) und hepatozellulärem Karzinom (HEPANOVA) klinische Studien durchgeführt [35]. Der Effekt der TTFields kann nicht nur in klinischen Studien getestet werden, sondern auch an Zellen (*in-vitro*) oder im Tierversuch (*in-vivo*) untersucht werden. Für die Zelleexperimente wurde das von Novocure[™] entwickelte Gerät Inovitro[®] Laboratory Research System genutzt. Durch Kirson et al. konnte gezeigt werden, dass TTFields auf humane Tumorzellen von GBM (U118, U-87MG), vom nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (H-1299) und vom Mammakarzinom (MDA231) inhibitorische Effekte im Hinblick auf die Zellproliferation hatten [33]. Außerdem konnte in Tiermodellen verschiedener Tumorarten (malignes Melanom der Maus und GBM der Ratte) durch die Anwendung von TTFields die Tumorgroße reduziert und die Tumormetastasierung verringert werden [33, 36].

1.3.1 Applikation

Das Medizinprodukt Optune[®] ist ein von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) und der Europäischen Union seit 2012 zugelassenes Medizinprodukt. Bei GBM-Patienten werden auf die rasierte Kopfhaut vier Transducer-Arrays aufgeklebt, welche jeweils 9 einzelne isolierte Gelpads aus Keramik beinhalten (Abbildung 3). Dabei wird zwischen die Arrays und die Kopfhaut ein Hydrogel aufgetragen, um eine möglichst große Kontaktfläche der Elektroden mit der Kopfhaut und damit gute Übertragung der elektrischen Felder in den Tumor zu erreichen. Die Gelpads übertragen das vom Generator erzeugte elektrische Wechselfeld, welches den Tumor in zwei Richtungen infiltriert: in

anterior-posteriorer Richtung und in sagittaler Richtung von links-lateral nach rechts-lateral. Der inhibitorische Effekt der TTFields auf das Tumorwachstum war signifikant höher, wenn zwei oder mehr, anstatt einer Feldrichtung genutzt wurden [33]. Die Spannung hat eine Stärke von +50V bis zu -50V [37]. Die im Rahmen der Diagnostik von dem Patienten aufgenommenen MRT- und CT-Bilder werden genutzt, um eine für den Patienten optimale Lokalisation der Elektroden zu berechnen [37]. Die Patienten werden dazu angehalten, die Arrays für mindestens 18 h am Tag zu tragen, um die Wirkung der TTFields auf möglichst viele sich teilende Zellen zu erzielen.

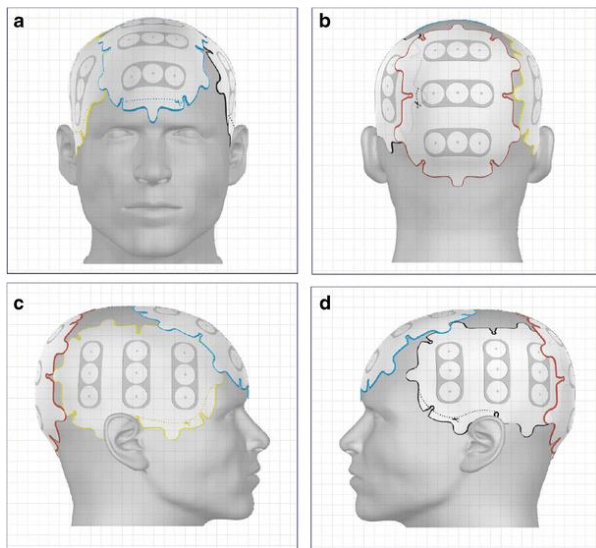


Abbildung 3: Applikation der Arrays auf der Kopfhaut

Jeweils zwei Paare der Arrays werden orthogonal in anterior-posteriorer Richtung (rot und blau) und in rechts und links lateraler Richtung (schwarz und gelb) angebracht. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Novocure™ publiziert.

1.3.2 Kontraindikationen und Nebenwirkungen

Als Kontraindikationen der TTFields Behandlung gelten Schwangerschaften, zusätzliche neurologische Erkrankungen wie Epilepsie, Enzephalitis oder Hydrocephalus, sowie Allergien oder Unverträglichkeiten gegenüber Bestandteilen des aufzutragenden Hydrogels. Da die Studien nur eine Erwachsenenpopulation eingeschlossen hatten, ist die Verwendung bei Patienten unter 22 Jahre (USA) oder unter 18 Jahre (Deutschland) nicht zugelassen [38]. Ebenfalls stellt der Zustand nach Implantation eines aktiven, medizinischen Gerätes wie Hirnstimulatoren oder Herzschrittmacher eine Kontraindikation dar. Das Gerät darf ebenfalls nicht bei einem Schädelknochendefekt oder bei sich im Schädel befindlichen Geschossfragmenten verwendet werden [38].

An Nebenwirkungen sind bis jetzt lediglich lokale Hautirritationen, hervorgerufen durch den kontinuierlichen Kontakt zwischen den Arrays oder dem Hydrogel und der Kopfhaut, beschrieben. Von Lacouture et al. werden 5 unterschiedliche Typen an Hautveränderungen mit dem für sie typischen Pathomechanismus genannt. Diese können in 4 Schweregrade eingeteilt werden (Tabelle 3) [39].

Typ der Hautirritation	Möglicher Pathomechanismus
Irritierende Kontaktdermatitis	Chemische Irritation von Hydrogel oder Alkohol beim Auftragen auf die Haut
Allergische Kontaktdermatitis	Allergie gegenüber dem Hydrogel oder dem Material der Arrays
Erosion	Mechanisches Trauma von der Rasur, von dem durch die Arrays ausgeübten Drucks auf das Hautareal oder der Abnahme der Arrays
Ulcus	Verminderte Perfusion durch den ausgeübten Druck auf das Hautareal
Hautinfektion	Sekundäre bakterielle Infektion

Tabelle 3: Typen und mögliche Ursachen der durch die TTFields hervorgerufenen Hautirritationen. Tabelle modifiziert nach [39].

In der EF-14 Studie wurde beobachtet, dass bei 43% der Patienten, welche die Kombinationstherapie aus TTFields und TMZ erhalten hatten, eine milde oder moderate (Grad 1 und Grad 2) und bei 2% eine schwere Hautirritation (Grad 3) aufgetreten war [34]. Eine akut lebensbedrohliche Situation mit dringender Intervention (Grad 4) ist nicht aufgetreten. In Tabelle 4 sind die Grade von 1 bis 4 unterschieden.

Grad	Charakteristik und Therapie
Grad 1	Asymptomatische oder milde Symptome, eventuell ist eine topische Therapie indiziert (Kortikosteroide oder Antibiotika)
Grad 2	Moderate Symptome UND eine topische oder systemische Therapie indiziert, eventuell Absetzen der Arrays
Grad 3	Schwere aber nicht akut lebensbedrohliche Hautreaktion UND eine topische und systemische Therapie notwendig, eventuell operative Intervention
Grad 4	Akut lebensbedrohliche Situation mit dringender Intervention

Tabelle 4: Grade an Hautirritationen. Tabelle modifiziert nach [39].

1.4 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus ist eine geordnete Abfolge von Ereignissen, die zur Zellteilung und der Entstehung von zwei Tochterzellen mit identischem Chromosomengut, führen. Er besteht aus der Interphase, die sich in G1-Phase, Synthese-Phase (S-Phase) und G2-Phase gliedert, und der Mitosephase (M-Phase). Die Zellen haben außerdem die Möglichkeit, bei Entzug von Nährstoffen oder Ausdifferenzierung, den Zellzyklus vorübergehend oder dauerhaft zu verlassen und in die G0-Phase einzutreten. Bei kontinuierlicher Proliferation folgt auf die M-Phase, in der die Zellteilung stattfindet, die G1-Phase, in der das Zellwachstum und die Synthese von Proteinen und Zellbestandteilen erfolgt. Daran schließt sich die S-Phase an, die durch die Replikation der DNA charakterisiert ist, so dass die einzelnen Chromatiden dupliziert werden. Am Ende der S-Phase liegen von jedem Chromosom zwei Paare mit jeweils zwei identischen Schwesterchromatiden vor. In der anschließenden G2-Phase erfolgt ein weiterer Syntheseschritt von Proteinen und Ribonukleinsäure (RNA), welcher als Vorbereitung für die Zellteilung angesehen werden kann. Schließlich leitet die Zelle die Mitose ein, in der die Schwesterchromatiden getrennt werden und zwei neue Tochterzellen entstehen. Die Mitose kann wiederum in sechs Stadien untergliedert werden: Die Prophase, Pro-Metaphase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese [40] (Abbildung 4).

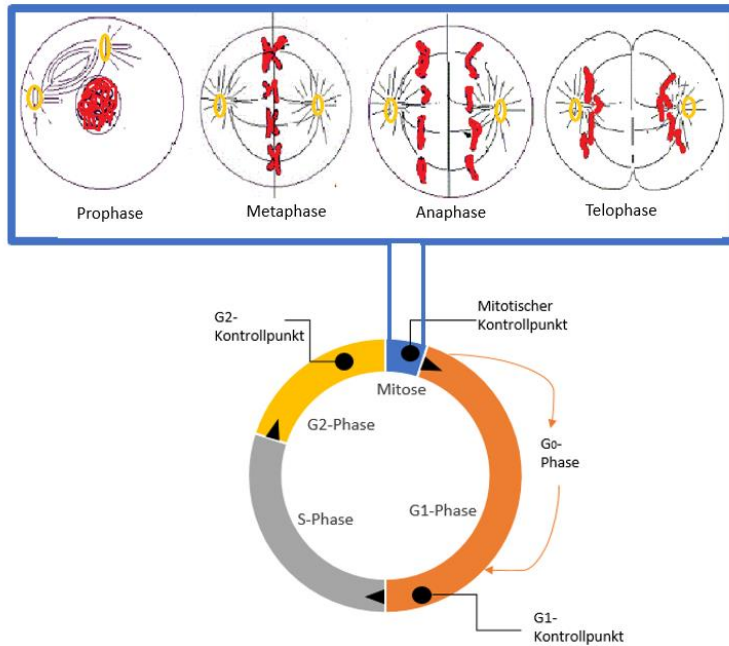


Abbildung 4: Zellzyklusphasen

Auf die Mitosephase folgt die G1-, S- und G2-Phase. Die Zellen haben außerdem die Möglichkeit zum Beispiel bei Entzug von Nährstoffen in die G0-Phase einzutreten. Die drei Kontrollpunkte sind ebenfalls eingezeichnet: Der Mitotische Kontrollpunkt, der G1- und G2- Kontrollpunkt kontrollieren die Prozesse, die in den einzelnen Phasen auftreten und sorgen für die korrekte Zellteilung. Die Mitose kann wiederum in Prophase, Prometaphase (nicht dargestellt), Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese (nicht dargestellt) eingeteilt werden. Eigene Abbildung.

In der Prophase kondensieren die Chromatiden während sich aus Mikrotubuli (MT) der Spindelapparat bildet. MT sind Bestandteile des Zytoskeletts von Eukaryonten und bestehen aus einzelnen Tubulinmolekülen. Letztere können sich an einen bestehenden Mikrotubulus anlagern (Polymerisation) oder abgespalten werden (Depolymerisation) und sind somit für die Dynamik der Spindelfasern verantwortlich. Während α -Tubuline ein Bestandteil der MT an den peripheren Spindelfasern sind, nehmen γ -Tubuline an dem Prozess der Polymerisation und Depolymerisation neuer MT am Zentrosom teil. So finden sich α -Tubuline im Zytoplasma und im Zytoskelett wohingegen γ -Tubuline vor Allem während der Mitose am Zentrosom detektiert werden können [40]. In der Pro-Metaphase zerfällt der Zellkern. Zwei Schwester-Chromatiden, die durch Kohäsine zusammen gehalten werden, besitzen an ihren Zentrosomen Kinetochore (KT), welche aus einem DNA-Protein-Komplex bestehen und die Bindungsstelle für die Spindelfasern darstellen. In der Metaphase ordnen sich die Chromosomen in der Äquatorialebene an. Die Spindelfasern zweier gegenüberliegender Pole binden die KT. Sobald alle MT korrekt an die KT gebunden haben, aktiviert der Kofaktor cell-division-cycle 20 (cdc20) den Anaphase

promoting complex/cyclosome (APC/C). Nun wird die E3-Ubiquitin-Ligase, die wiederum Securin, den Inhibitor des Enzyms Separase, ubiquitiniert. Dadurch wird Securin abgebaut und die Separase aktiviert, die nun das Kohäsın spaltet. Die Schwesterchromatiden werden getrennt [41], [42] (Abbildung 5B).

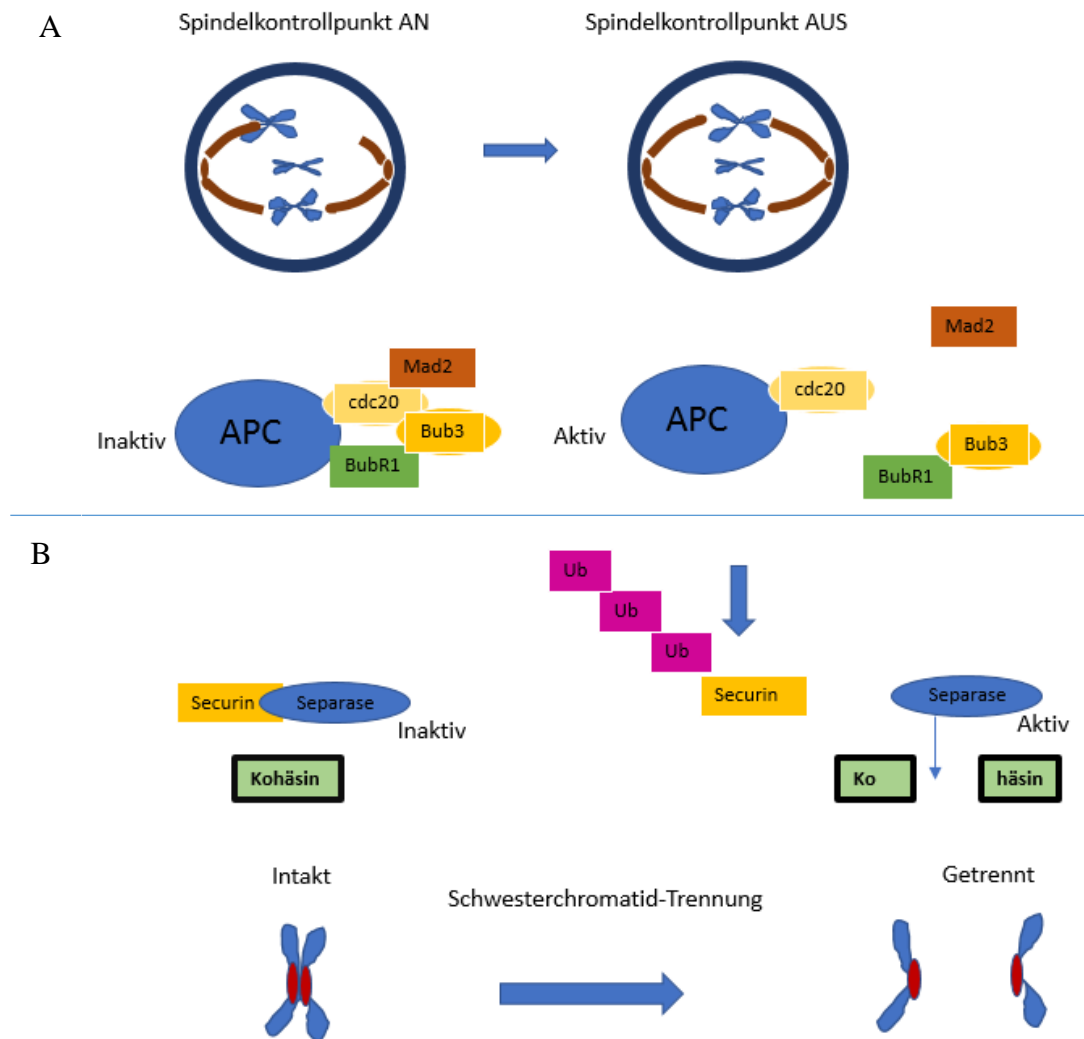


Abbildung 5: Der mitotische Spindelkontrollpunkt

Sobald ein KT nicht bi-axial an Spindelfasern gebunden ist, wird der Spindelkontrollpunkt aktiviert. Damit werden unter anderem die MPS1 Kinase und der Mitotic Checkpoint Complex aktiviert. Sie verhindern eine Aktivierung des APC durch eine Bindung des benötigten Kofaktors cdc20. Erst durch eine amphitelische Bindung des Chromatidenpaares wird der Spindelkontrollpunkt ausgeschaltet. Der Kofaktor wird freigegeben und APC aktiviert. Daraufhin wird die Separase aktiviert, welche Kohäsın spaltet. Die Schwesterchromatiden werden getrennt. APC=Anaphase promoting complex, Bub=budding-uninhibited-by-benzimidazole, BubR=Bub-related, cdc=cell-division-cycle, Mad=mitotic-arrest-deficient. Eigene Abbildung modifiziert nach [43].

Mit der proteolytischen Spaltung des Kohäsins und damit dem Auseinandergleiten der Schwesterchromatiden tritt die Zelle in die Anaphase ein. Durch die Verkürzung der Spindelfasern werden die Chromatiden an die Spindelpole gezogen. Außerdem wird durch die Interaktion von kontraktilen Filamenten (Aktin, Myosin und der Rho-A-Kinase) eine Teilungsfurche in der Plasma-Membran geschaffen. In der Telophase erfolgt die äquivalente Aufteilung der Zellorganellen und des Cytoplasmas sowie die Ausbildung der Zellmembranen durch die endgültige Kontraktion des Aktin-Myosin-Zytoskeletts [40], [44].

Die Zelle verfügt in den einzelnen Zellzyklusphasen über drei Kontrollpunkte (KP), welche die zuvor durchgeführten Prozesse kontrollieren und gegebenenfalls einen Zellzyklusarrest auslösen. In der G1-Phase befindet sich ein solcher KP, an dem verifiziert wird, ob alle für die S-Phase erforderlichen Substrate und Proteine vorhanden sind und ein ausreichendes Zellvolumen vorliegt. Nur wenn dies gewährleistet ist, tritt die Zelle in die S-Phase ein, muss dann aber auch den gesamten Zellzyklus durchlaufen. Der nächste KP, der den Übergang in die Mitose einleitet, befindet sich in der G2-Phase. Hier wird die Replikation der DNA überprüft. Ein Zellzyklusarrest ermöglicht eine eventuell notwendige Reparatur. Am dritten KP, dem mitotischen Spindelkontrollpunkt („Spindle Assembly Checkpoint“, SAC), wird die korrekte Anheftung der KT und damit der Chromatiden an den Spindelfasern sichergestellt.

1.4.1 Der mitotische Spindelkontrollpunkt

Während der Metaphase der Mitose werden die beiden Schwester-KT an die Spindelfasern gebunden und von diesen während der Anaphase zu den Spindelpolen gezogen. Dabei kann es zu unterschiedlichen Bindungsarten kommen. Man unterscheidet die merotelische Bindung, bei der ein KT von Spindelfasern beider Pole eine Bindung erhält und die syntelische Bindung, bei der beide KT von Spindelfasern eines Pols gebunden werden. Die Aktivierung des SAC kann unter anderem durch diese aberranten Bindungsarten ausgelöst werden. Dies führt zu einem Zellzyklusarrest bis an jedem KT eine amphitelische Bindung herrscht (Abbildung 6). Diese ist dadurch charakterisiert, dass eine Spannung zwischen den beiden KT aufgebaut wird, welche durch eine bi-axiale Bindung von Spindelfasern gegenüberliegender Pole an die jeweiligen KT zustande kommt [42].

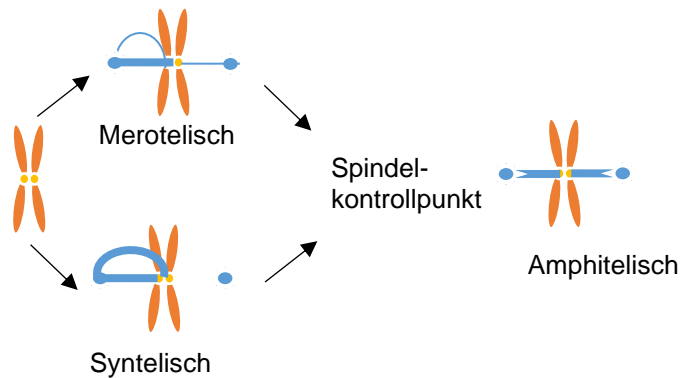


Abbildung 6: Mögliche Bindungsarten von Spindelfasern an Schwester-Kinetochore

Die merotelische Bindung ist oben links dargestellt, hierbei wird ein KT von Spindelfasern beider Pole gebunden. Bei der syntelischen Bindung (unten links dargestellt) sind beide KT an Spindelfasern eines Pols gebunden. Beide Bindungen führen zu einer Aktivierung des SAC, bis schließlich an jedem Chromosom eine amphitelische Bindung herrscht. Abbildung modifiziert nach [45].

Ein einzelnes unbefestigtes oder falsch gebundenes KT vermag es dabei, ein ausreichend starkes Signal für die Aktivierung des SAC und damit den Arrest des Zellzyklus auszulösen [46]. Sobald zwischen einem KT-Paar keine Spannung erzeugt wird, akkumulieren die SAC-Proteine am KT. Dabei dient das KT als katalytische Plattform, die zur Aktivierung der monopolar-spindle-kinase-1 (MPS1) führt. MPS1 ist wiederum an der Rekrutierung verschiedener SAC-Komponenten beteiligt. Der SAC Proteinkomplex besteht aus budding-uninhibited-by-benzimidazole (Bub)-1, MPS1, mitotic-arrest-deficient (Mad)-1, Aurorakinase B und dem mitotic checkpoint complex (MCC). Dieser setzt sich aus bub-related-1 (BubR-1), Bub-3 und Mad-2 zusammen, welche mit hoher Affinität synergistisch den Kofaktor cdc20 binden. Bei aktiviertem SAC wird also cdc20 inhibiert und kann damit nicht den APC/C aktivieren. Damit geht die Zelle nicht in die Anaphase über, bis alle KT richtig an die Spindelfasern gebunden sind (Abbildung 5).

Sind nun alle Mikrotubuli amphitelisch an die KT gebunden und bauen hierbei Spannung auf die KT auf, wird die Repression des APC/C Komplexes durch die SAC Proteine unterbrochen. Dies erfolgt vermutlich über die Entfernung der SAC Proteine durch Dynein-Motorproteine und nachfolgende Freigabe von cdc20 (Abbildung 5A). Cdc20 aktiviert APC/C und löst dadurch die Ubiquitin-Degradierung von Securin aus. Nun können die Schwesterchromatiden getrennt werden und die Einleitung der Anaphase erfolgt.

1.4.2 Inhibition der MPS1 Kinase

MPS1 ist eine Schlüsselkomponente im Spindelkontrollpunkt und aktiviert nachgeschaltete Proteine. Durch die Inhibition der MPS1 Kinase wird der mitotische Spindelkontrollpunkt ausgeschaltet. Dadurch werden fehlerhafte KT-MT-Bindungen nicht mehr erkannt und die Rate an chromosomalen Fehlverteilungen in der Mitose gesteigert. Es wurde gezeigt, dass die Inhibition der MPS1 Kinase *in-vitro* zu einer fehlerhaften Chromosomenteilung mit enormer Aneuploidie oder Polyploidie führt. Niedrig dosiert und kombiniert mit einem Spindelgift wie Paclitaxel oder Vincristin wirken die Agentien synergistisch und führen zu einem Anstieg der fehlerhaften Chromosomenverteilung [47]. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass eine MPS1-Inhibition in Kombination mit Vincristin, welches die Mikrotubuli-Bildung stört, eine synergistische Wirkung auf GBM-Zellen hat [48]. Im Tiermodell konnte eine Reduktion des GBM-Tumorvolumens festgestellt werden, sobald eine Kombinationsbehandlung aus MPS1 und Vincristin erfolgte [48]. Daher sind MPS1 Kinase Inhibitoren, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit Mikrotubuli-schädigenden Agentien eingesetzt, von hoher Attraktivität für zukünftige onkologische Behandlungen.

1.5 Tumor Treating Fields – Molekularer Wirkmechanismus

TTFields haben ihre Hauptwirkung in einer Störung von Schlüsselproteinen der Mitose vor allem auf sich teilende Zellen [49]. Ihre antiproliferative Wirkung können sie durch drei beschriebene Effekte entfalten: Den antimikrotubulären Effekt, die Dielektrophorese und das Membrane Blebbing. Um die Wirkungen besser zu verstehen, muss man auf die physikalischen Grundlagen der elektrischen Wechselfelder eingehen.

Das elektrische Feld ist das Vektorfeld der elektrischen Feldstärke und wird durch eine Kraftwirkung auf eine Ladung definiert. Die ortsabhängige elektrische Feldstärke ist von der Größe der Quellladung und vom Abstand zu dieser Quelle abhängig. In einem homogenen elektrischen Feld mit konstanter Spannung ist die elektrische Feldstärke innerhalb des Feldes überall gleich groß. Die Richtung der Kraft auf eine negative Ladung zeigt zum positiven Pol und die Richtung der Kraft auf eine positive Ladung zeigt zum negativen Pol (Abbildung 7A). In einem homogenen Wechselfeld ist die Spannung konstant aber die Polarität variiert (die Frequenz gibt dabei die Umpolung pro Sekunde an). Geladene Teilchen oszillieren mit hoher Geschwindigkeit in dem elektrischen Feld parallel zur Feldstärke (Abbildung 7B, oben). Dipole sind Teilchen, die eine positive und negative Teilladung haben aber nach außen elektrisch neutral sind. Sie rotieren in einem homogenen elektrischen Wechselfeld (Abbildung 7B, unten).

1.5.1 Der antimikrotubuläre Effekt

Während der Meta- und Anaphase der Zellteilung polymerisieren Tubulin-Untereinheiten zum Spindelapparat, der wiederum dafür sorgt, dass die Chromosomen gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden. Die Ausbildung dieses Spindelapparates erfordert höchste Präzision und wird durch die Zelle über interne Signale geregelt. Durch das externe elektrische Wechselfeld schwingen die hoch polaren Tubulin-Untereinheiten parallel zu den elektrischen Feldlinien, sodass der Aufbau des Spindelapparates gestört wird [49]. Damit wird die korrekte Verteilung der Chromosomen nicht mehr gewährleistet und die Zellen enden mit einem unterschiedlich verteilten Erbgut, was letztendlich zur Apoptose führt [50].

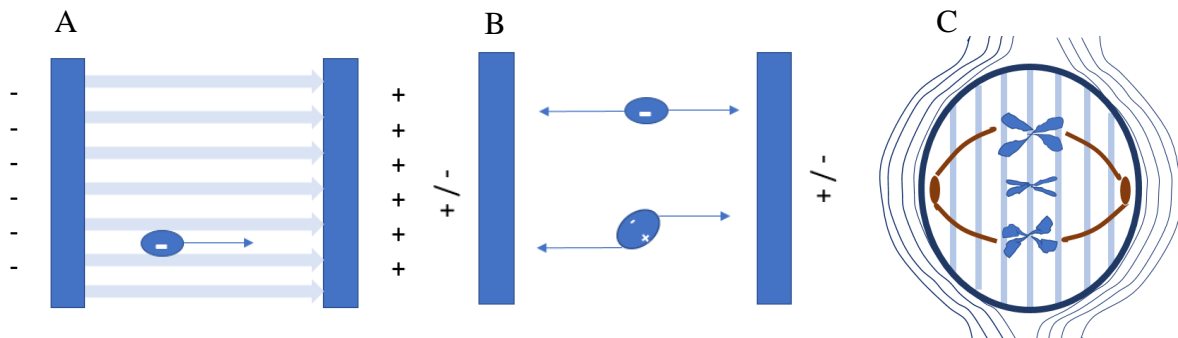


Abbildung 7: Darstellung einzelner Teilchen in einem elektrischen Feld

A: Eine negative Ladung erfährt in einem elektrischen Feld mit konstanter Spannung eine Kraft zum positiven Pol. B: In einem homogenen elektrischen Wechselfeld erfährt negative Ladung ebenfalls eine Kraft zum positiven Pol. Da dieser jedoch durch die Wechselfeldspannung umgepolt wird, oszilliert das geladene Teilchen. Dipole werden durch das homogene elektrische Feld einem Rotationsstress ausgesetzt, sie schwingen. C: Während der Meta- und Anaphase herrscht in der Zelle durch TFields ein homogenes elektrisches Wechselfeld, welches polare Moleküle beeinflusst. Mikrotubuli (braun) bilden den Spindelapparat und verteilen die Chromosomen (blau) auf die Tochterzellen. Abbildung modifiziert nach [33]. © (2007) National Academy of Sciences, U.S.A.

1.5.2 Dielektrophorese

Ein weiterer Effekt der TFields kommt während der Telophase der Zellteilung zu tragen. Zu diesem Zeitpunkt hat die sich teilende Zelle eine Uhrglasform. Dies führt dazu, dass sich das in der Zelle herrschende Wechselfeld von einem homogenen zu einem inhomogenen Wechselfeld umwandelt (Abbildung 8). Im Bereich der Teilungsfurche ist die elektrische Feldstärke höher als an den äußeren Enden beider Tochterzellen. Elektrische Ladungen als auch Dipole wandern in einem inhomogenen elektrischen Wechselfeld auf die Seite der höheren Feldstärke. Dieser Prozess wird als Dielektrophorese bezeichnet. Nun werden mit der Dielektrophorese während der Telophase sowohl die polaren Mikrotubuli als auch Moleküle mit einem hohen Dipolmoment, wie der Septin-Heterotrimerkomplex (Septinkomplex) zur Teilungsfurche dirigiert und damit in ihrer normalen Funktion beeinflusst. Der in der Mitose eine wichtige Rolle einnehmende Septinkomplex, bestehend aus Septin 2, 6 und 7, hat ein sehr hohes Dipolmoment von 2711 Debyes [51].

Septine sind sowohl an der Stabilität des Spindelapparates als auch an der Aktivierung der kontraktile Elemente, beteiligt [51]. Sie gehören zur Gruppe der Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine), die über die Bindung an das Adaptorprotein Anillin unterschiedliche Wirkungen entfalten können [51]. Zum einen kann der Septinkomplex

über Anillin den guanine nucleotide exchange factor (GEF) aktivieren. In seinem aktivierten Zustand katalysiert dieser den Guanin-Nukleotid-Austausch in kleinen GTPasen wie der Rho-A-Kinase [51]. Diese wiederum ist sehr wichtig für die Interaktion von Aktin und Myosin als kontraktile Filamente bei der Ausbildung der Teilungsfurche [52]. Außerdem vermag es der Septinkomplex den Spindelapparat zu stabilisieren. Für diese Stabilisierung muss der kontraktile Ring während der Anaphase stabil an der Plasmamembran verankert sein, um die Uhrglasform der Mutterzelle während der Telophase aufrecht zu erhalten [53].

Des Weiteren ist bekannt, dass einige Proteine aus der Gruppe der Septine auch Wirkungen unabhängig von Anillin entfalten können: Septin 2 gilt als wichtiges Stützprotein von Myosin und Septin 7 spielt eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Molekülen, die die Teilung der Chromatiden ermöglichen [54].

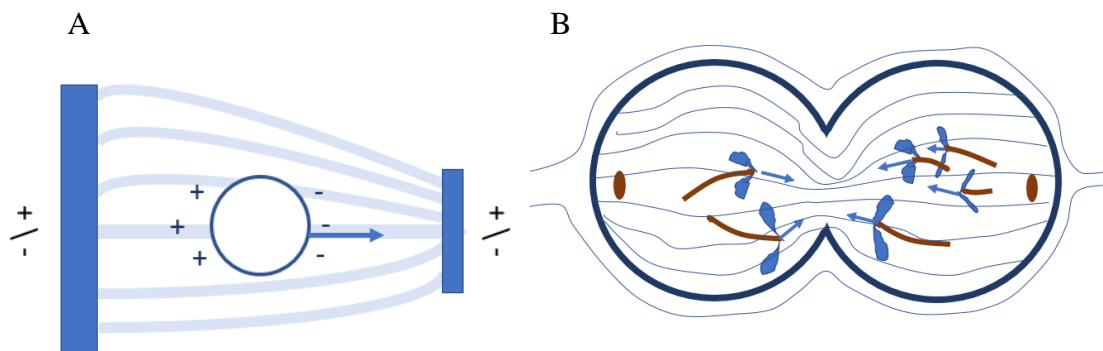


Abbildung 8: Darstellung eines Dipols in einem inhomogenen elektrischen Wechselfeld

A: Dipole erfahren in einem inhomogenen elektrischen Wechselfeld eine Kraft zur höheren Feldstärke. B: Durch die Uhrglasform während der Telophase herrscht durch die extern applizierten TTFields ein inhomogenes elektrisches Wechselfeld. Hierbei werden alle Ladungen und jeder Dipol, zu denen Tubuline (braun) gehören, zu der höheren Feldstärke gezogen. Dabei ist der Bereich der Teilungsfurche die Stelle der größten Feldstärke. Somit werden alle polaren Moleküle in diesen Bereich verschoben. Damit werden die Chromosomen (blau) nicht mehr äquivalent auf beide Zellen verteilt. Abbildung modifiziert nach [33]. © (2007) National Academy of Sciences, U.S.A.

1.5.3 Membrane Blebbing

Als ein dritter durch TFields hervorgerufener Effekt ist die Ruptur der Zellmembran und das Membrane Blebbing zu nennen [49]. Letzteres sind bläschenförmige Zellmembranausstülpungen, die abgeschnürt oder wieder in die Membran zurückgezogen werden können. Diese Zellmembranprotrusionen sind zum einen Zeichen der Apoptose und werden zum anderen bei lebenden Zellen während der Mitose, Zellmigration und des Zellwachstums beobachtet [55].

1.6 Gegenstand der Arbeit

TFields führen sowohl zu einer Störung des Aufbaus des Spindelapparates als auch zu einer Destabilisierung desselben und wirken so ähnlich dem chemischen Spindelgift Vincristin, dessen neurotoxischen Nebenwirkungen allerdings seine Anwendung in der neurologischen Onkologie limitieren. Ferner überwacht der mitotische Spindelkontrollpunkt eine fehlerhafte Anheftung der Spindelfasern an die Schwesterchromatiden, leitet gegebenenfalls Reparaturprozesse ein und kann den durch physikalisch (TFields) oder chemisch (Vincristin) induzierten Spindelschäden entgegenwirken. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der MPS1 Kinase, einer Schlüsselkomponente des mitotischen Spindelkontrollpunktes, in Kombination mit Vincristin einen synergistischen inhibierenden Effekt auf das Tumorwachstum im Mausmodell hatte [48]. In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, ob und durch welchen Mechanismus die MPS1-Inhibition die Wirkung von TFields verstärken könnte.

Um eine Beeinflussung der Inhibition von MPS1 in Kombination mit TFields feststellen zu können, wurden die GBM-Zelllinien GaMG und U-87MG mit den MPS1 Kinase Inhibitoren IN-3 oder AZ 3146 in Kombination mit TFields für 24, 48 und 72 h behandelt. Schließlich wurde die Zellzahl zu den einzelnen Zeitpunkten bestimmt, um die Proliferation der Zellen beurteilen zu können. Durch Fluoreszenzmikroskopie sollten Mitosefiguren qualitativ dargestellt werden und so die regelrechte Funktion des Spindelapparates überprüft werden.

Es wurden durchflusszytometrische Analysen des Zellzyklus durchgeführt, um eine quantitative Aussage über die Verteilung der behandelten Zellen in verschiedenen Zellzyklusstadien detektieren zu können. Außerdem wurde mithilfe zweier unterschiedlicher Methoden die Einleitung der Apoptose der unterschiedlich behandelten Zellen untersucht. Schließlich wurde eruiert, inwiefern der TFields Effekt nachwirkt, sobald die TFields Behandlung endet, aber IN-3 Behandlung weitergeführt wird. Hierzu wurden die Zellen für 72 h mit der Doppelbehandlung inkubiert und dann für weitere 24, 48 und 72 h im Brutschrank kultiviert.

Diese Untersuchungen sind ein wichtiger Schritt zur Etablierung neuer Behandlungsmöglichkeiten in der Neuro-Onkologie. Sie könnten dazu beitragen, dass neue Therapieansätze entwickelt werden können, welche die Nebenwirkungen der hochpotenten Chemotherapeutika reduzieren und die Lebensqualität der Patienten verbessern.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Autoklav	Systec, Wettenberg
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Durchflusszytometer FACS Canto II	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenz-Mikroskop DMI 3000B	Leica, Wetzlar
Gefrierschrank -80 °C	Fryka Kältetechnik, Esslingen
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Inovitro [®] Laboratory Research System (Generator, Verbindungskabel, Computer- Software, Basisplatte, Keramischälchen, Kunststoffdeckel)	Novocure [™] , Haifa, Israel
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
MacsMix Miltenyi	Biotec, Auburn, CA, USA
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Wilovert Hundt, Wetzlar
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
pH Meter	WTW, Weilheim
Pipetboy Integra	Biosc., Ijamsville, MD, USA
Power Ease 500	Invitrogen, Karlsruhe
Rotamix	Heidolph, Schwabach
Schüttler Innova 4230	New Brunswick Sc., Edison, NJ, USA
Sicherheitswerkbank	Nuaire, Plymouth, MA, USA
Vortex Genie-2	Scientific Ind., Bohemia, NY, USA
Wasserbad	Hartenstein, Würzburg
Zellzähler Scepter 2.1	Merck Millipore, Darmstadt

Zentrifuge
Zentrifugationsbecher 500 mL

VWR, Radnor, PA, USA
Heraeus Instruments, Hanau

2.1.2 Chemikalien

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Bovines Serumalbumin

Serva, Heidelberg

Calciumchlorid (CaCl₂)

Merck, Darmstadt

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Roth, Karlsruhe

Dulbecco's modified eagle medium/F-12

Cytogen, Berlin

Eindeckmittel „vecta-shield“

VWR, Radnor, PA, USA

(enthält DAPI)

Ethanol, 70%

J. T. Baker, Deventer, Niederlande

FACS-Clean

Becton Dickinson, Heidelberg

FACS-Flow

Becton Dickinson, Heidelberg

FACS-Rinse

Becton Dickinson, Heidelberg

Fötales Kälberserum

Gibco Brl Life Tech., Eggenstein

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Annexin

Becton Dickinson, Heidelberg

Hepes

Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid (NaCl)

Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid (NaOH)

Merck, Darmstadt

Nicht-essentielle Aminosäuren

Gibco Brl Life Tech., Eggenstein

Phosphate buffered saline (PBS)

Biochrom, Berlin

Penicillin

Biochrom, Berlin

Paraformaldehyd (PFA)

Merck, Darmstadt

Propidiumiodid (PI)

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Ribonuklease

Promega, Madison, WI, USA

Saponin

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Staurosporin

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Streptomycin

Biochrom, Berlin

Sodium Dodecyl Sulfat

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Triton-X-100

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Gibco Brl Life Tech., Eggenstein
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ultra pure water	Biochrom, Berlin
Ziegenserum	Jackson, West Groove, PA, USA

2.1.3 Gebrauchsfertige Kits

In-situ direct DNA Fragmentation Kit	Abcam, Cambridge, UK
Terminal deoxyribonucleotidyltransferase mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)	

2.1.4 Verbrauchsmaterial

6-Well Platten	Corning, New York, NY, USA
75 cm ² Zellkulturflaschen	Corning, New York, NY, USA
FACS-Röhrchen 12x75 mm	Hartenstein, Würzburg
Glasdeckgläser	Hartenstein, Würzburg
Kolben 250 mL, 500 mL, 2000 mL	Schott Duran, Mainz
Kryoröhrchen	Nailgene, Brüssel, Belgien
Objektträger	Hartenstein, Würzburg
Pasteurpipetten	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Polystyrolröhrchen	Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen, ungestopft	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,5 mL, 1 mL, 2 mL	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 mL, 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Thermanox Plastikdeckgläser	Nalge Nunc, Rochester, NY, USA

2.1.5 MPS1 Kinase Inhibitoren

MPS1-IN-3 (IN-3)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
AZ 3146 (AZ)	AdooQ BioScienc, Irving, CA, USA

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper

Anti- α -Tubulin Maus monoklonal

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Anti- γ -Tubulin Kaninchen monoklonal

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Sekundärantikörper

Anti-Maus Cyan 3

Jackson, West Grove, PA, USA

Anti-Kaninchen Cyan 2

Jackson, West Grove, PA, USA

2.1.7 Software

FACS Diva

Becton Dickinson, Heidelberg

Flowing Software 2.5.1

Universität Turku, Turku, Finnland

GraphPad Prism 6

Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA

Inovitro[®] Versions Software

Novocure[™], Haifa, Israel

Scepter Software 2.0

Merck Millipore, Darmstadt

LAS 4.3

Leica, Wetzlar

2.1.8 Zelllinien

Zell- linie	Spezies	Zell- typ	Alter	Geschlecht	Wachs- tum	Ver- dopplungs- zeit	Firma
GaMG	Homo sapiens	GBM	42	Weiblich	Mono- layer	Ca. 50 h	DSMZ, Braun- schweig
U- 87MG	Homo sapiens	GBM	44	Weiblich	Mono- layer	Ca. 34 h	CLS, Eppel- heim

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien und ihre Eigenschaften. GBM=Glioblastoma multiforme.

2.1.9 Lösungen und Medien

Nährmedium der Zellen

Zu 500 mL Dulbecco's modified eagle medium/F-12 wurden 10 mL Nicht-essentielle Aminosäuren, 50 mL Fötale Kälberserum und 1,5 mL Penicillin/ Streptomycin zugegeben.

Fixierungslösung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Es wurde eine 1%ige Lösung aus PFA in PBS hergestellt.

Annexin binding Puffer

Zunächst wurden 0,1 M HEPES in destilliertem Wasser gelöst und anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. 1,4 M NaCl und 25 mM CaCl₂ wurden dann hinzugegeben. Dieser Stock konnte unter 10facher Verdünnung in PBS zur Annexin V Färbung verwendet werden.

Einfriermittel

Zu 4,5 mL Nährmedium wurden 0,5 mL DMSO gegeben.

Propidium-Iodid Färbelösung

Für den Mastermix wurden pro zu färbender Zellsuspension 362,5 µL PBS, 25 µL Saponin, 10 µL Propidiumiodid (20 µL/mL Endkonzentration) und 2,5 µL Ribonuklease (50 µL/mL Endkonzentration) pipettiert.

Blocking Lösung für Fluoreszenz-Färbungen

1% PSA wurde in 0,05% Triton-X-100 zusammen mit 10% Ziegen Serum in PBS gelöst.

Antikörperlösungen für Fluoreszenz-Färbungen

Anti-γ-Tubulin (Kaninchen) wurde in einer Konzentration von 1:1000 in eine PBS-Lösung mit 1% BSA und 0,05% Triton-X-100 gegeben.

Anti-α-Tubulin (Maus) wurde in einer Konzentration von 1:2000 in eine PBS-Lösung mit 1% BSA und 0,05% Triton-X-100 gegeben.

Anti-Kaninchen Cyan 2 wurde in einer Konzentration von 1:50 in eine PBS-Lösung mit 1% BSA und 0,05% Triton-X-100 gegeben.

Anti-Maus Cyan 3 wurde in einer Konzentration von 1:100 in eine PBS-Lösung mit 1% BSA und 0,05% Triton-X-100 gegeben.

Inhibitorlösungen

5 mg IN-3 wurde in 1 mL DMSO gelöst. Daraus ergab sich eine Konzentration von 4 $\mu\text{mol/mL}$.

2 mg AZ 3146 (AZ) wurde in 1 mL DMSO gelöst. Dies ergab eine Konzentration von 2 $\mu\text{mol/mL}$.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsansätze

Grundsätzlich wurden 4 Ansätze miteinander verglichen: Die Kontrollgruppe, Monobehandlung mit TTFields, Monobehandlung mit einem MPS1 Kinase Inhibitor und die Kombination aus TTFields und dem MPS1 Kinase Inhibitor. Als Inhibitoren wurden MPS1-IN3 (IN-3) und AZ 3146 (AZ) verwendet. Die Frequenz für die TTFields Behandlung betrug bei allen Versuchen 200 kHz. Es wurden verschiedene Methoden angewandt, um die Zellzahl, die frühe und späte Apoptoserate und die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusstadien zu detektieren. Außerdem wurden Fluoreszenzfärbungen angefertigt, um eine qualitative Aussage über Mitosefiguren treffen zu können. Abbildung 9 veranschaulicht die zeitliche Abfolge der Versuchsreihen. Es wurde zum einen ein Time Course Experiment und zum anderen ein End of Treatment (Eot) Experiment durchgeführt (Abbildung 9).

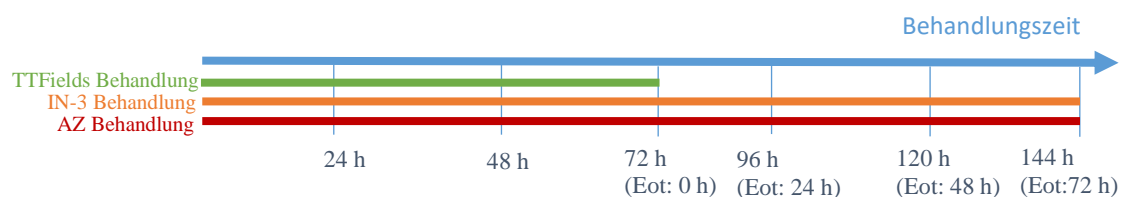


Abbildung 9: Veranschaulichung des Time Course und End of Treatment Experiment

Nach jeweils 24 h, 48 h und 72 h wurden die Zellen in den unterschiedlichen Ansätzen geerntet und für Analysen verwendet. End of Treatment Experiment: Nach Beendigung der 72 stündigen TTFields Behandlung wurden die Zellen mit IN-3 und AZ weiterbehandelt und nach 96 h, 120 h und 144 h geerntet und gezählt. Eot=End of Treatment, IN-3=MPS1-IN-3, TTFields=Tumor Treating Fields. Eigene Abbildung.

Für die Zelllinie U-87MG untersuchte Ansätze

1. Time Course Experiment bei 27°C Brutschrank-Temperatur

Es konnte gezeigt werden, dass U87MG Zellen empfindlicher auf TTFields reagierten als die GaMG Zelllinie weshalb die TTFields Intensität bei U-87MG Zellen abgeschwächt wurde. Die Intensität der TTFields nimmt mit steigender Brutschrank-Temperatur ab. In Time Course Experimenten wurde die Brutschrank-Temperatur auf 27°C angehoben, um eine niedrigere Feldstärke von 0,97 V/cm zu erreichen [56, 57]. 24 h, 48 h und 72 h

Behandlung wurden die Ansätze zur Zellzahlbestimmung und zur durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus und der späten Apoptoserate (TUNEL Assay) verwendet (Abbildung 9).

2. Frühe Apoptose (Annexin V)

Nach einer 72 stündigen Behandlung wurden die Zellen geerntet und die frühe Apoptoserate mittels Annexin V Färbung und durchflusszytometrischer Analyse bestimmt.

3. End of Treatment Experiment bei 18 °C Brutschrank-Temperatur

Initialer 72 h TTFields Behandlung folgte die Kultivierung der Zellen und Zellernte nach 96 h, 120 h und 144 h (Abbildung 10). Folgende Ansätze wurden untersucht: 1. Kontrolle, 2. IN-3 Monobehandlung über die gesamte Versuchsdauer, 3. IN-3 Monobehandlung für 72 h und dann Beendigung der IN-3 Behandlung, 4. TTFields Monobehandlung für 72 h und dann Beendigung der TTFields Behandlung, 5. Kombinationsbehandlung für 72 h und dann Weiterführung der IN-3 Behandlung nach Beendigung der TTFields Behandlung, 6. Kombinationsbehandlung für 72 h und Beendigung sowohl der IN-3 Behandlung, als auch der TTFields Behandlung. Bei dieser Versuchsreihe wurden die Ansätze 3. Und 6. von Mirja Hahn durchgeführt, deren Dissertation auf dieser Arbeit aufbaut [58]. Der Vollständigkeit halber sind diese Ansätze auch in dieser Schrift aufgelistet. Die Zellen aus den verschiedenen Ansätzen wurden zur Zellzahlbestimmung und zur durchflusszytometrischen Analyse der späten Apoptoserate (TUNEL-Assay) verwendet.

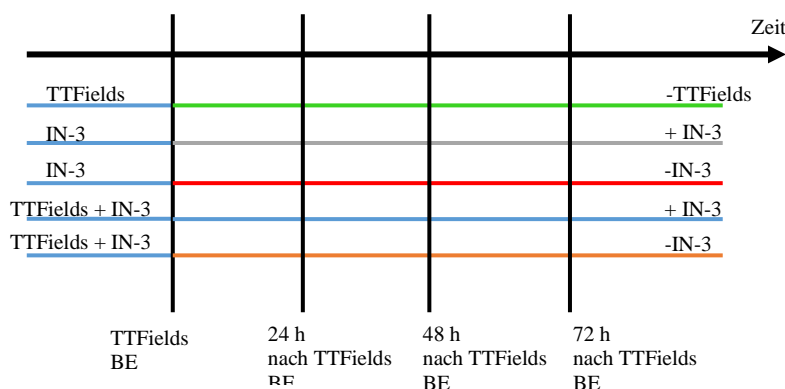


Abbildung 10: End of Treatment Experiment

Darstellung des End of Treatment Experiments, wobei einzelne Ansätze nicht von mir ausgeführt wurden, hier allerdings der Vollständigkeit halber aufgeführt werden. BE=Behandlungsende, IN-3=MPS1-IN-3, TTFields=Tumor Treating Fields. Eigene Abbildung.

Für die Zelllinie GaMG untersuchte Ansätze

1. Time Course Experiment bei 18°C Brutschrank-Temperatur

Nach jeweils 24 h, 48 h und 72 h wurden die Ansätze zur Zellzahlbestimmung und zur durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus und der Apoptoseraten verwendet.

2. Fluoreszenzfärbungen

Nach Ausplattieren der Zellen auf Thermanox Plastikdeckgläser wurden die Zellen einer 72 stündigen Behandlungsdauer ausgesetzt. Anschließend wurde das Tubulin fluoreszenzgefärbt und die Zellen wurden mikroskopiert.

2.2.2 TFields Behandlung

Für die TFields Behandlung der Zellen wurde das Inovitro[®] Laboratory Research System verwendet. Dieses besteht aus einem Generator, Verbindungskabel, Computer mit dazugehöriger Software, einer Basisplatte und acht auf der Basisplatte verschraubten Keramikschälchen mit dazugehörigen Kunststoffdeckeln (Abbildung 11).



Abbildung 11: Inovitro[®] Laboratory Research System

KeramiksChälchen mit zugehörigen Kunststoffdeckeln (auf der Abbildung unten dargestellt) wurden auf der Basisplatte (mittig) verschraubt. Die Basisplatte wurde durch das farbige Verbindungskabel (rechts) an den Generator (oben) angeschlossen, der eine Spannung erzeugte. Durch das schwarze Verbindungskabel (rechts) konnten über den Computer und die dazugehörige Software die Einstellungen variiert werden. Mit freundlicher Genehmigung durch NovocureTM publiziert.

Der Generator erzeugte eine Wechselspannung und konnte diese über das Verbindungskabel auf die Basisplatte übertragen. Die Richtung der Spannung drehte sich pro Sekunde um 90° sodass sich die Wirkung auf möglichst viele sich teilenden Zellen entfalten konnte. Die Basisplatte beinhaltet die Elektronik für die elektrische Wechselfeldbehandlung. Bis zu 8 Keramikschälchen konnten auf ihr verschraubt werden. Diese Schälchen bestanden aus einem Blei-Magnesium-Niobat/ Bleititanat-Gemisch, welches eine hohe Dielektrizitätskonstante aufweist. Durch die elektrisch isolierten Keramikschälchen konnten die Wechselfelder auf die in den Schälchen befindlichen Zellen appliziert werden. Die Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät, die in der Mitte der Schälchen platziert wurden.

Über die Software konnten die Einstellungen für die einzelnen Keramikschälchen variiert werden. Die Zellen standen maximal 72 h unter TTFields Behandlung. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass bei 200 kHz die besten Ergebnisse in Bezug auf Zellzahlreduktion bei GBM-Zellen der Zelllinien U-87MG und GaMG erzeugt werden konnten [59].

Für alle Messungen wurde dabei die Frequenz von 200 kHz gewählt. Die beiden Sensoren, welche an den Keramikschälchen angebracht waren, registrierten dabei folgende Messwerte:

Zieltemperatur	37 °C
Stromstärke	140-165 mA
Widerstand	210-280 Ω
Spannung	30-45 V

Die Intensität der TTFields hängt von der eingestellten Temperatur des Brutschanks der mit TTFields behandelten Zellen ab [57]. Die Intensität (V/cm) auf die Zellen nimmt mit steigender Temperatur des Brutschrankes ab [57].

2.2.3 Zellkulturmethoden

Die Wirkung von TTFields wurde an den GBM-Zelllinien U-87MG und GaMG untersucht. Nach dem Auftauen aus der Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde lichtmikroskopisch die Vitalität und Konfluenz der Zellen überprüft. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Auftauen von Zelllinien

Die gefrorenen Zellen in Kryoröhrchen wurden im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens in ein Falcon mit 15 mL Nährmedium gegeben und dann in eine Zellkulturflasche überführt.

Einfrieren von Zellen

Da die beiden Zelllinien nicht gleichzeitig verwendet wurden, konnte die nicht benötigte Zelllinie eingefroren und in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt werden. Dazu wurden die Zellkulturflaschen mit 10 mL PBS gewaschen und mit 1 mL Trypsin-EDTA behandelt, sodass sich die Zellen vom Boden der Flasche ablösten. Noch am Boden adhärente Zellen wurden durch Schwenken der Flasche und leichtes Beklopfen losgelöst. Die Zellsuspensionen wurden in Kryoröhrchen für 10 min bei 4 °C und 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet durch tröpfchenweise Zugabe von 1 mL Einfriermittel resuspendiert. Die Kryoröhrchen wurden in einer Styroporbox isoliert und in den Gefrierschrank bei -80 °C gestellt, damit sie langsam abkühlten und einfroren. Nach 2 h konnten die Proben in den Stickstofftank überführt werden.

Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden standardmäßig alle 3-4 Tage passagiert. Dazu wurde das Nährmedium aus den Zellkulturflaschen abpipettiert. Die am Boden adhärenen Zellen wurden mit 7 mL PBS gewaschen und dann durch Zugabe von 1 mL erwärmtem Trypsin-EDTA vom Boden gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 7 min im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die einzelnen Zellen durch Schwenken und leichtes Beklopfen aus dem für sie typischen Monolayer gelöst und die Trypsinreaktion durch Zugabe von 9 mL Medium abgestoppt. Schließlich wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 gesplittet, indem

9 mL der Zellsuspension abpipettiert wurde. Die abpipettierte Zelllösung konnte nun zum Ausplattieren der Zellen verwendet werden. Die verbliebene Zellsuspension (1 mL) in der Zellkulturflasche wurde mit 15-20 mL Nährmedium geflutet und für weitere Versuche im Brutschrank kultiviert.

Ausplattieren von Zellen

Die Zellen wurden auf Deckgläsern ausplattiert, um sowohl in den Keramikschildchen des Inovitro® Laboratory Research Systems als auch in den 6-Well-Platten aus Plastik gleiche Wachstumsbedingungen vorherrschen zu lassen. Die Deckgläser wurden anfangs mit einer Pinzette in die Schälchen oder Wells verteilt. Daraufhin wurden die Zellen in einer bestimmten initialen Zellzahl in 350 µL als Tropfen auf die Deckgläser gegeben.

Für die Versuche zur Bestimmung von Zellzahl und durchflusszytometrische Analysen wurden Glasdeckgläser verwendet. Bei diesen Versuchen wurde eine initiale Zellzahl von 30.000 Zellen ausplattiert. Für die Arbeiten am Fluoreszenzmikroskop wurden Thermanox Plastikdeckgläser verwendet, da sich die Zellen durch die Fixierung für fluoreszenzmikroskopische Färbungen sehr leicht von Glasdeckgläsern gelöst hatten. Für diese fluoreszenzmikroskopischen Arbeiten wurde eine initiale Zellzahl von 10.000 Zellen ausplattiert, um ein starkes mehrdimensionales Wachstum und damit eine erschwerte Analyse unter dem Mikroskop zu verhindern. Alle Ansätze wurden für mindestens 20 h im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ belassen, sodass sich die Zellen auf dem Deckglas anheften konnten. Nach dieser Zeit wurde das Medium entfernt und die einzelnen Keramikschildchen wurden mit 2 mL Medium (Kontrolle und TTFields Monobehandlung) beziehungsweise mit 2 mL Inhibitorlösung (IN-3 Monobehandlung und Kombinationsbehandlung) geflutet. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass AZ in einer Konzentration von 2 µmol/ mL und IN-3 in einer Konzentration von 4 µmol/ mL die beste Wirkung erzielte [56].

Es wurden für jeden Versuchsansatz jeweils vier Keramikschildchen angesetzt, die dann für die Analysen gepoolt wurden. Jeder Versuch wurde mindestens 3 Mal durchgeführt (Abbildung 12).

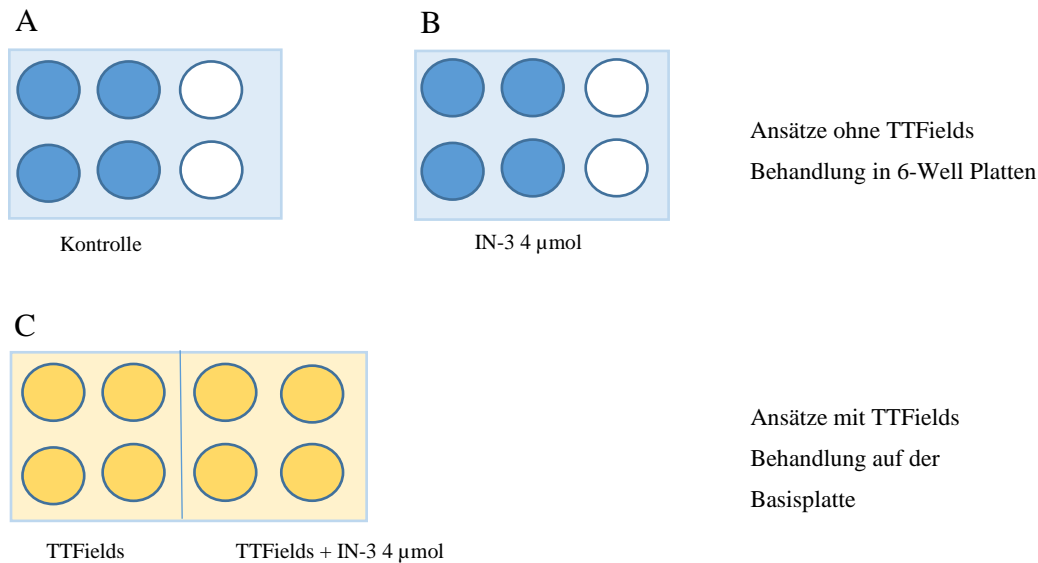


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Versuchs mit allen Ansätzen

A: Kontrolle, B: IN-3 Monobehandlung 4 µmol, C: TTFields Monobehandlung und Kombinationsbehandlung aus TTFields + IN-3 4 µmol. Die Zellen wurden auf Deckgläsern (hier nicht dargestellt) kultiviert. IN-3=MPS1-IN-3, TTFields=Tumor Treating Fields. Eigene Abbildung.

Der Wechsel des Nährmediums erfolgte bei allen Versuchen nach 40 bis 46 h. Dazu wurde das Nährmedium beziehungsweise die Inhibitorlösung in den Schälchen abpipettiert und 2 mL Nährmedium beziehungsweise 2 mL Inhibitorlösung vorsichtig auf den Rand der Deckgläser gegeben, um keine Zellen abzulösen.

2.2.4 Zellernte und Zellzählung

Nach der Behandlungszeit (im Time Course Experiment nach 24, 48 und 72 h, im Eot nach 96, 120 und 144 h) wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde das Medium bzw. die Inhibitorlösung aus den Schälchen entfernt, die Schälchen wurden in einem doppelten Waschschrift mit 1 mL PBS gewaschen und 0,5 mL Trypsin-EDTA wurde auf die Deckgläser gegeben. Die Trypsinreaktion wurde nach einer 7- bis 12-minütigen Inkubationszeit im Brutschrank mit 1 mL Medium gestoppt. Die Zellen aus jeweils 4 Schälchen mit dem gleichen Versuchsansatz wurden in einem 15 mL Reaktionsgefäß gepoolt. Es wurde 1 mL Medium auf die Zellen gegeben, um noch an den Rändern befindliche Zellen abzulösen. Diese 1 mL Zellsuspension wurde ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt, sodass sich pro Versuchsansatz mit 4 Schälchen in dem Reaktionsgefäß eine Zellsuspension mit einem Volumen von 8 mL befand. Nun wurden

die Zellen nach Vortexen mittels des automatischen Zellzählers Scepter 2.1 gezählt (Abbildung 13). Das Zellzählgerät besteht aus Kolben, Spitzenansatz, Display und einer Kapillare, die mit einem Gefäß mit Elektrolytflüssigkeit verbunden ist. Die in diesem Gerät angewandte Technik verwendet das Coulter-Prinzip: Sobald durch den Kolben ein Unterdruck erzeugt wird, werden die Zellen über den Spitzenansatz in die Kapillare gesogen und verdrängen so ein gewisses Volumen der Elektrolytflüssigkeit. Dadurch kommt es zu einer messbaren Widerstandsänderung. Durch die Höhe der Widerstandsänderung kann Rückschluss auf das Zellvolumen der Zelle gezogen werden. Die Anzahl und Größe der Pulse innerhalb eines Zeitintervalls wird ermittelt und der Zählstand wird auf dem Display anhand eines Histogramms dargestellt. Das Zellzählgerät liefert Informationen über die Zellkonzentration, die durchschnittliche Zellgröße, das durchschnittliche Zellvolumen und die Größen- und Volumenverteilung.



Abbildung 13: Zellzählgerät Scepter 2.1

Das Zellzählgerät besteht aus einer Grifffläche, Kolben, Display und Spitzenansatz. Das Display zeigt die ermittelten Informationen an, über den Kolben wird die Flüssigkeit über den Spitzenansatz in die Kapillare gesogen. An den Spitzenansatz wird die Sensor-Spitze gesteckt, deren Öffnung in die zu untersuchende Probe getaucht wird. Über das USB-Verbindungs-/Stromladekabel kann der Akku des Geräts aufgeladen und die Informationen können auf den Computer übertragen werden. Eigene Abbildung.

Da die unterschiedlichen Zelllinien unterschiedliche Zellgrößen aufweisen, wurden durch Messungen von Kontrollen die optimalen Gates für eine spezifische Zelllinie festgelegt (Tabelle 6).

	Niedriges Gate	Hohes Gate
GaMG	15,03	25,00
U-87MG	10,08	21,00

Tabelle 6: Für die Zellzählung verwendete Gates.

Nach dem Zählen wurden die Zellen entweder für den TUNEL Assay und die Zellzyklusanalyse fixiert oder nach einem zweimaligen Waschschrift für die Apoptosedetektion mittels Annexin V verwendet.

2.2.5 Zellfixierung für durchflusszytometrische Arbeiten

Nach Abzentrifugieren und Entfernen des Mediums aus dem Reaktionsgefäß wurden die Zellen einem Waschschrift mit 5 mL PBS unterzogen, bevor sie 15 min mit 5 mL 1%igem PFA behandelt wurden. Dadurch wurde ihre Zellmembran zerstört und sie wurden fixiert. In einem nachfolgenden Waschschrift mit 5 mL PBS wurde PFA entfernt. Schließlich wurde 5 mL 70%iges Ethanol zugegeben, um die Zellen einfrieren zu können. Die Zellen wurden bis zum nächsten Färbeschrift für die durchflusszytometrischen Arbeiten bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bedient sich einer Technologie, die Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Zellen misst (Abbildung 14). Dazu werden die Zellen in einem laminaren Probenstrom an einem Laser vorbei geleitet und streuen dabei abhängig von ihrer Größe und Granularität das Laserlicht, das sich durch eine hohe Gleichphasigkeit (Kohärenz) und einheitliche Wellenlänge (Monochromie) auszeichnet. Die nach vorn gestreuten Strahlen sind ein Maß für die Größe der Zellen und werden als Forward scatter bezeichnet, während die im rechten Winkel gestreuten Strahlen ein Maß für die Zellgranularität sind und als Side scatter bezeichnet werden. Diese beiden Eigenschaften variieren bei jeder Zellpopulation.

Wird ein an Zellbestandteile gebundenes Fluorochrom durch das Laserlicht angeregt, wird ein Teil der Energie absorbiert und in Form von Fluoreszenzlicht emittiert. Durch das optische System können die einzelnen Lichtemissionen über Spiegel und Filter verstärkt und durchgelassen und durch die Detektoren gemessen werden (Abbildung 14). Dabei wird aus einer Zellsuspension nicht nur die Anzahl der Signale, sondern auch die Intensität jedes einzelnen Signals detektiert. Durch die Photomultiplier können gleichzeitig gemessene Fluoreszenzsignale zweier verschieden angeregter Fluorochrome gemessen und einer Zelle zugeordnet werden. Die hier einkommenden optischen Signale werden in elektrische Signale und schließlich in digitale Daten umgewandelt und mittels der FACS-Diva Software ausgewertet.

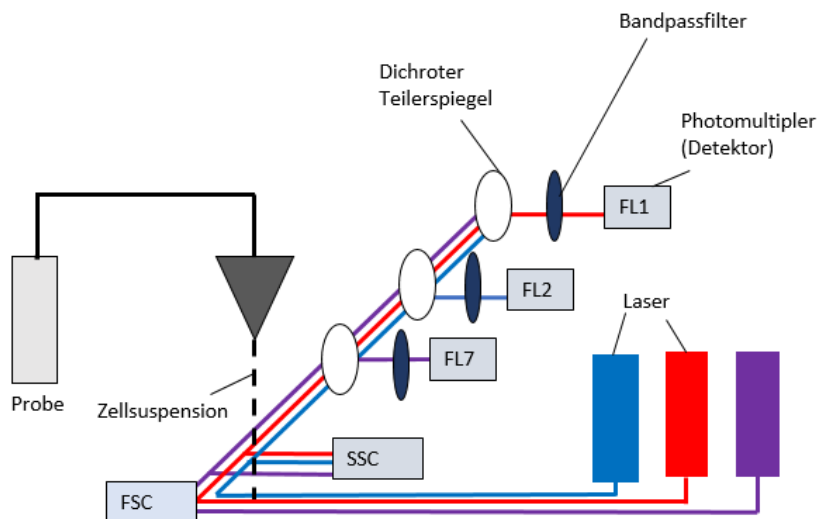


Abbildung 14: FACS Canto II

Vereinfachte Darstellung des optischen Systems von FACS Canto II: Die Zellen werden durch einen roten Diodenlaser der Wellenlänge 653 nm, einen Argoniumlaser der Wellenlänge 488 nm und einen violetten Laser der Wellenlänge 405 nm angeregt und streuen abhängig ihrer Größe und Granularität. Durch die unterschiedlichen Detektoren können die gebundenen Fluorochrome gemessen werden. FSC=Forward scatter, SSC=Side scatter. Eigene Abbildung modifiziert nach [60].

Für die vorliegenden Messungen wurde der Argonionenlaser, der mit einer Wellenlänge von 488 nm die Fluorochrome Propidiumiodid (PI) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC) anregt, verwendet. Proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrom-Menge kann aus jeder Zellprobe ein Lichtsignal detektiert werden, welches in der Intensität der

gebundenen Fluoreszenzfarbstoffmenge entspricht. Dabei emittiert jedes Fluorochrom Licht in einem spezifischen Wellenlängenbereich (Tabelle 7).

Fluoreszenzkanal	Anregung durch	Absorptions- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]	Eingesetzte Fluorochrome
FL1	Laser1: Argonionenlaser	488	530	FITC Alexa488
FL2	Laser1: Argonionenlaser	488	585	PI PE
FL3	Laser1: Argonionenlaser	488	670	PerCP
FL4	Laser 1: Argonionenlaser	488	780	Allophycocyanin Cyan5
FL5	Laser 2: Diodenlaser	633	660	Allophycocyanin
FL6	Laser 2: Diodenlaser	633	780	Alexa780
FL7	Laser 3	405	450	DAPI
FL8	Laser 3	405	510	AmCyan

Tabelle 7: Am FACS Canto vorliegende Fluoreszenzkanäle mit den dazu gehörigen Anregungsspektren und einsetzbaren Fluorochromen. Die hervorgehobenen Fluorochrome wurden in dem Assay verwendet. FITC wurde zum Einen als FITC-Annexin für die Annexin V Färbung und zum Anderen als FITC-konjugierte Desoxy-Uridin-Triphosphate für die TUNEL Färbung verwendet. PI fand seine Anwendung in der Annexin V Färbung und bei den Zellzyklusanalysen. DAPI=4',6-Diamidin-2-phenylindol, FITC=Fluoresceinisothiocyanat, PE=Phycoerythrin, PI=Propidiumiodid.

FITC (Emissionsmaximum: 519 nm) kann über den Fluoreszenzkanal FL1 detektiert werden und PI (Emissionsmaximum: 617 nm) über den Fluoreszenzkanal FL2. Bei den Messungen wurde nach den Vorgaben des Herstellers vorgegangen. Vor jeder Messung wurde die Zellsuspension gevortext. Es wurden pro Probenröhrchen bis zu 10.000 Zellen analysiert. Mit dem Programm FACS DIVA konnten die Parametereinstellungen für die jeweilige Messung vorgenommen werden. Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mithilfe der Flowing Software 2.0.

Zellzyklus-Analyse

Der DNA-Gehalt einer Zelle variiert während der unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Die DNA von Zellen kann durch PI, einem fluoreszierenden Nukleinsäureinterkalator, angefärbt werden. Da PI stöchiometrisch an die DNA bindet, gibt die Höhe der Intensität der PI-Fluoreszenz Rückschluss auf die in der Zelle enthaltene DNA-Menge. Zellen, die sich in der S-Phase befinden, haben einen höheren DNA-Gehalt als Zellen in der G1-Phase, da sich der Chromosomensatz in der S-Phase zum diploiden Satz verdoppelt. Somit besitzen die Zellen in der G2 Phase einen doppelten, diploiden Chromosomensatz und fluoreszieren doppelt so stark wie die Zellen in der G1-Phase, die einen haploiden Chromosomensatz aufweisen (Abbildung 15). Für die Zellzyklus-Analyse müssen die Zellen mit dem permeabilisierenden Stoff Saponin behandelt werden, sodass Propidiumiodid die Zellmembran passieren und an die DNA binden kann.

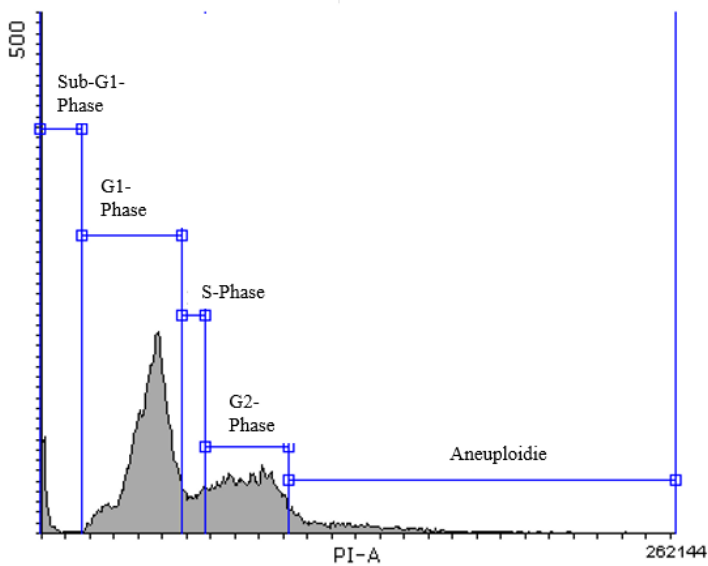


Abbildung 15: Zellzyklus-Analyse

Zellen in der G2-Phase haben einen doppelten Chromosomensatz und fluoreszieren doppelt so stark wie die Zellpopulation der G1-Phase. Die Chromosomen werden in der S-Phase verdoppelt, sodass sich die Zellen aus der S-Phase in dem Bereich zwischen G1 und G2/M-Phase befinden. Nekrotische und apoptotische Zellen haben einen fragmentierten Zellkern und deshalb bindet wenig PI an die DNA. Diese Zellen befinden sich vor dem G1-Peak, als SubG1-Peak. PI=Propidiumiodid. Eigene Abbildung.

Vorbereitung der Proben für die Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklus-Analyse wurde an fixierten Zellen durchgeführt (siehe 2.2.4). Die bei -20 °C gelagerten Zellen wurden mit 1.300 x g bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Zellen wurden in 4 °C kaltem PBS resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation mit den oben genannten Einstellungen. Der Waschschrift mit PBS wurde ein zweites Mal wiederholt und der Überstand erneut abpipettiert. Schließlich wurde das Zellpellet gevortext und die gesamte Zellsuspension für die PI-Färbung in FACS-Röhrchen überführt. Es wurden 400 µL der PI-Färbelösung zugegeben, welche sich aus Saponin (Permeabilisierung der Zellmembran), PI (Farbstoff und Interkalator in DNA und RNA) und Ribonuklease (spaltet die in den Zellen vorhandene RNA) zusammensetzte. Die Proben wurden bis zum Zeitpunkt der Messung lichtgeschützt transportiert.

Apoptose-Methoden

Apoptose ist durch viele unterschiedliche biologische und morphologische Veränderungen im Zellmetabolismus gekennzeichnet. Zu nennen sind hier die Änderung des Membranpotentials der Mitochondrien, Translokation eines Phospholipids von der Innen- auf die Außenseite der Lipiddoppelschicht der Zellmembran, Aktivierung von Caspasen und DNA Fragmentation. Auf diesen Veränderungen basieren unterschiedliche Methoden, mit denen Apoptose in einer Zellpopulation nachgewiesen werden kann. Da die Dauer der Apoptose zwischen einzelnen Zelllinien erheblich variieren kann und die unterschiedlichen Prozesse während der Apoptose in einer bestimmten Reihenfolge auftreten, kann man zwischen früher und später Apoptose unterscheiden. Während die Translokationen von Phosphatidylserin und die Caspase-Aktivierung zu einem früheren Zeitpunkt stattfinden, erfolgt die DNA-Fragmentierung durch nukleäre Enzyme zu einem späten Zeitpunkt. Die DNA-Fragmentierung kann im Terminal deoxyribonucleotidyltransferase mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)-Assay detektiert werden.

Annexin V Färbung (Frühe Apoptose)

Phosphatidylserin (PS) ist als ein Phospholipid Bestandteil der Doppellipidschicht der Zellmembran und befindet sich bei vitalen Zellen an der Innenseite der Membran. Sobald die Apoptose eingeleitet wird, wird PS auf die äußere Lipidschicht der Membran transloziert. Diese Translokation findet zu einem frühen Zeitpunkt der Apoptose statt.

Annexin V ist ein Calciumabhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu PS. Sobald PS auf die Außenseite der Zellmembran transloziert wurde, kann Annexin V an PS binden. Durch Kopplung mit Fluorochromen (FITC) an Annexin V, kann der Anteil von transloziertem PS in der Durchflusszytometrie gemessen werden. In späteren Stadien der Apoptose wie auch der Nekrose treten Verlust der Zellintegrität und Membranstabilität auf, sodass nichtpermeable Agentien wie Propidiumiodid die Zellmembran passieren und an die DNA binden können. So kann man nun Zellen in verschiedenen Stadien der Apoptose in der Durchflusszytometrie charakterisieren: Diejenigen Zellen, die Propidiumiodid und Annexin binden, haben eine durch Nekrose oder fortgeschrittene Apoptose zerstörte Zellmembran, sodass PI an die DNA und Annexin V an PS binden kann. Zellen, die keines der beiden Agentien gebunden haben, sind weder permeabel für Propidiumiodid und haben demnach eine intakte Zellmembran, noch hat eine Translokation des PS von der Innen- auf die Außenseite stattgefunden. Damit kann man diese Zellen als vitale Zellen spezifizieren. Als frühapoptotische Zellen werden jene Zellen bezeichnet, die durch eine Annexin V-Bindung spezifiziert sind, allerdings eine fehlende PI-Bindung aufweisen. Diese Zellen besitzen eine noch intakte Zellmembran, haben jedoch schon den Prozess der Translokation des PS durchlaufen. Folgende Darstellung zeigt eine beispielhafte Messung einer Zellpopulation im Prozess der Apoptose (Abbildung 16).

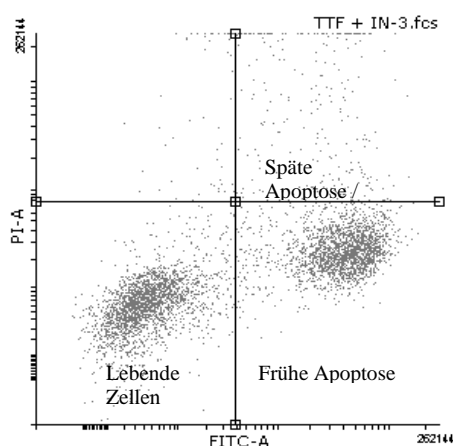


Abbildung 16: Zellpopulation im Annexin V Assay

Lebende Zellen weisen eine niedrige PI und FITC Konzentration auf; früh-apoptotische Zellen weisen eine hohe FITC Konzentration und niedrige PI Konzentration auf und nekrotische Zellen weisen eine hohe PI und FITC Konzentration auf. FITC=Fluoresceinisothiocyanat, PI=Propidiumiodid. Eigene Abbildung.

Vorbereitung der Proben für die Annexin V Färbung

Für die Annexin V Färbung wurden die Zellen nicht fixiert, sondern nach 72 h TTFields Behandlung geerntet, in 5 mL PBS überführt und bei 1300 x g und 21 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und 15 min lichtgeschützt in 500 µL Binding-Puffer, 10 µL PI und 5 µL FITC-Annexin V bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten innerhalb einer Stunde die Messungen am Durchflusszytometer. Am FACS Canto II wurde die Grenze von 10.000 zu detektierenden Zellen bzw. eine Stoppzeit von 5 min eingestellt. Außerdem wurden die zu detektierenden Photomultiplier (FL1 für FITC-Annexin V, FL2 für PI) gewählt.

TUNEL Assay (späte Apoptose)

Während der Apoptose wird die DNA einer Zelle durch Endonukleasen in etwa gleich lange Stränge von 180 Basenpaaren fragmentiert. Dieser Schritt erfolgt in den späten Stadien der Apoptose und kann mit Hilfe eines TUNEL Assays durchflusszytometrisch bestimmt werden. Durch die Fragmentierung entstehen freie OH-Enden an der DNA, deren Anzahl einen Rückschluss auf den Fragmentierungsgrad zulässt. An diese OH-Enden werden von der terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase die FITC-konjugierten Desoxy-Uridin Triphosphate (FITC-dUTP) angehängt. Im Durchflusszytometer kann die Intensität dieses Farbstoffes gemessen und damit ein Rückschluss auf die sich in der Apoptose befindlichen Zellen gezogen werden.

Vorbereitung der Proben für den TUNEL Assay

Für den TUNEL Assay wurden fixierte Zellen verwendet. Dazu wurden die bei -20 °C gelagerten Zellen mit 1300 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und das Ethanol wurde abpipettiert. Für die Färbung wurde der In situ direct DNA Fragmentation Kit (Abcam Kit) verwendet. Nach doppeltem Waschschrift mit wash buffer, bestehend aus PBS, wurde bei oben genannten Bedingungen erneut zentrifugiert. Schließlich wurden die Zelle in der Staining solution, bestehend aus Reaktions-Puffer, TdT Enzym, FITC-dUTP und destilliertem Wasser resuspendiert und für 60 min inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei oben genannten Bedingungen und ein erneuter zweimaliger Waschschrift. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurden die Zellen mit der Propidium-Iodid-Lösung gefärbt.

2.2.7 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf dem Effekt, dass gewisse Moleküle, die sogenannten Fluorophore, die Eigenschaft haben, zu fluoreszieren und damit einen Teil des von ihnen absorbierten Lichts in Form einer langwelligeren Strahlung zu emittieren. Wird nun dieses emittierte Licht durch einen Filter betrachtet, so sieht man den Fluorophor vor einem dunklen Hintergrund leuchten. Das Fluoreszenzmikroskop ähnelt dem Lichtmikroskop in seinem Aufbau, allerdings muss das Licht durch zwei Filter treten. Der erste Filter wird so gewählt, dass nur Licht einer bestimmten Wellenlänge, welche den Fluorophor anregt, passieren kann. Der zweite Filter wird so gewählt, dass er nur Licht der Wellenlänge, welche vom Fluorophor emittiert wird, durchlässt.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Versuche binden in einem ersten Teilschritt die Primärantikörper an für sie spezifische Zellbestandteile, wie zum Beispiel Tubulin. Sekundärantikörper können an Fluorophore gekoppelt werden und binden in einem zweiten Teilschritt an passende Primärantikörper. Über die Fluorophore kann man somit die zu untersuchenden Zellstrukturen sichtbar machen. Über verschiedene Farbstoffe und Filter werden die unterschiedlichen Proteine einer Zelle gleichzeitig angefärbt und durch Overlays deren Lokalisation in der Zelle verglichen.

Durch Kopplung an Fluorophore werden α -Tubuline (Kopplung an Cyan-3) unter dem Fluoreszenzmikroskop rot und γ -Tubuline (Kopplung an Cyan-2) grün-gelb dargestellt. DAPI ist eine Verbindung, welche sich bevorzugt an Adenin-reiche Regionen in DNA und RNA anreichert, bereits fluoreszierende Eigenschaften besitzt und unter dem Mikroskop blau erscheint.

Vorbereiten der Proben für die Fluoreszenz-Mikroskopie

Jeweils 10.000 Zellen wurden für die Fluoreszenzmikroskopie auf Thermanox-Deckgläser ausplattiert. Nach Beendigung der 72 stündigen TTFelds Behandlung und einem Waschschrift mit PBS, wurden die Zellen auf den Deckgläsern mit 4%igem PFA 30 min inkubiert und dabei fixiert. Es folgten die Fluoreszenzfärbungen an α - und γ -Tubulin.

Erster Teilschritt: Binden der Primärantikörper an Zellstrukturen

Die Deckgläser wurden einem dreimaligen Waschschrift mit 2 mL PBS unterzogen, bevor 100 µL Blocking Lösung pro Deckglas zugegeben wurden. Nach 30 Min Inkubationszeit und Entfernen der Blocking Lösung wurde die erste Antikörperlösung (siehe 2.1.7) auf die Deckgläser gegeben und im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Zweiter Teilschritt: Binden der Sekundärantikörper an Primärantikörper

Nach Abnehmen der ersten Antikörperlösung wurde erneut Blocking Lösung zugegeben, 30 min inkubiert, die Lösung abgenommen und anschließend mit der zweiten Antikörperlösung (siehe 2.1.7) inkubiert. Nach 2 h Inkubationszeit wurden die Deckgläser einem dreimaligen Waschschrift mit PBS unterzogen, bevor sie mit dem Eindeckmittel „vecta-shield“ eingedeckelt wurden. Dazu wurde 20 µL der Lösung auf einen Objektträger gegeben und das Deckglas mit der Seite, auf der die fixierten Zellen sitzen, nach unten auf die Flüssigkeit gegeben. Schließlich wurden die Deckgläser lichtgeschützt bei 4 °C gelagert und konnten nach 3-4 Tagen, sobald die Lösung fest geworden war, unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Dazu wurden folgende Filter verwendet (Tabelle 8).

Filter	Gefärbte Struktur	Farbe der Fluoreszenz	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
DAPI	DNA	Blau	358 nm	461 nm
Cyan-3	α-Tubuline	Rot	550 nm	270 nm
Cyan-2	γ-Tubuline	Grün-gelb	492 nm	510 nm

Tabelle 8: Die bei der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Filter, die damit gefärbten Strukturen und Eigenschaften der Fluoreszenz. DAPI=4',6-Diamidin-2-phenylindol.

2.2.8 Statistische Auswertung

Es wurde für alle Versuche der Student's t-Test angewandt. Dabei wurde für jeden Versuchsansatz die TTFelds Behandlung mit den beiden Monotherapien verglichen. $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die statistische Analyse wurde mit dem Programm GraphPad Prism 6 durchgeführt.

3. Ergebnisse

Diese Arbeit baut auf der Dissertation von Greta E. Frömbling „Verstärkung der Wirkung von TTFields durch Inhibition des mitotischen Spindelkontrollpunktes“ auf, in der das Inovitro[®] Laboratory Research System im Tumorbiologischen Labor etabliert wurde und erste Versuche zu TTFields-Effekten auf die Zellzahl, den Zellzyklus und die Apoptose von U-87MG und GaMG Zellen durchgeführt wurden [56]. Hier wurden diese ersten Experimente aufgegriffen, teilweise reproduziert und durch den Einsatz eines weiteren Inhibitors (AZ), der zusätzlichen Verwendung niedrigerer Feldstärken, einer weiteren Apoptose-Methode sowie der Betrachtung zusätzlicher Zeitpunkte erweitert und vervollständigt.

3.1 Zellzahlreduktion

TTFields beeinflussten die Zellproliferation von humanen Glioblastom-Zellen.

Die TTFields-Frequenz ist in ihrer Effektivität für eine Zellzahlreduktion zelllinienspezifisch. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Frequenzeinstellung von 200 kHz die höchste Effektivität bei Glioblastom-Zellen hatte [56]. Diese Frequenz mit dem maximalen Effekt auf die Zellproliferation fand für alle folgenden Versuche Verwendung. An Zellen der Linie U-87MG wurde die Zellzahl der unterschiedlichen Behandlungen (TTFields, IN-3, TTFields+IN-3) mit der Zellzahl der Kontrolle (100%) nach einer Behandlungszeit von 72 h verglichen. Es zeigte sich, dass sich in dem Ansatz, welcher eine Monobehandlung mit TTFields erhalten hatte, nur noch 42% der Zellen verglichen mit der Kontrolle ($p=0,0033$) und in jenem Ansatz, der eine Monobehandlung mit IN-3 erhalten hatte nur noch 19% der Zellen im Vergleich zur Kontrolle befanden ($p<0,0001$). Der Ansatz, der mit der Kombinationstherapie behandelt wurde, enthielt nur 9% der Zellen verglichen mit dem Kontrollansatz ($p<0,0001$) (Abbildung 17).

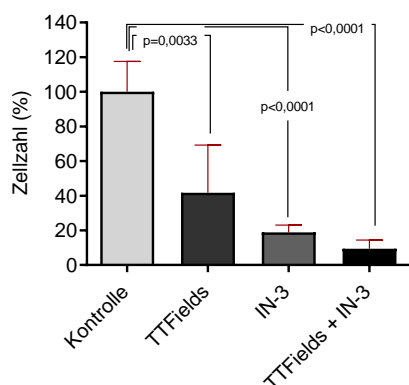


Abbildung 17: Relative Zellzahl von U-87MG Zellen im Vergleich zu der Medium-Kontrolle

Dieser Versuch wurde in einer Anzahl von $n=4$ bei einer TTFIELDS Brutschrank-Temperatur von $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Intensität von $0,97\text{ V/cm}$) durchgeführt. Zum Zeitpunkt von 72 h wurde die Zellzahl der Medium-Kontrolle auf 100% festgesetzt. Die anderen Zellzahlen wurden als Prozentsatz der Kontrolle berechnet. IN-3=MPS1-IN-3, TTFIELDS=Tumor Treating Fields.

Der antiproliferative Effekt der TTFIELDS wurde in Kombination mit einer Spindelkontrollpunktinhibition verstärkt.

Nun sollte nachgewiesen werden, zu welchem Zeitpunkt erste signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen an Zellen der Linie U-87MG gemessen werden können. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass U-87MG Zellen eine höhere Vulnerabilität gegenüber TTFIELDS aufwiesen als beispielsweise GaMG Zellen [56]. Um eine Abschwächung der TTFIELDS-Intensität zu erreichen, wurden die Zellen bei 27°C (Intensität von $0,97\text{ V/cm}$) inkubiert. Damit sollten auch in der Kombinationstherapie zum Behandlungsende von 72 h noch genügend Zellen vorhanden sein, um Unterschiede detektieren zu können. Es war zwar bereits nach 24 h mit 59% Zellreduktion ein signifikanter Effekt zwischen der Kombinationstherapie im Vergleich zur TTFIELDS Monotherapie detektierbar (Abbildung 18 A) ($p=0,0059$). Dieser Trend setzte sich nach 48 h weiter fort (Abbildung 18 B). Im Vergleich zu beiden Einzelbehandlungen war die Kombinationstherapie erst nach 72 h signifikant besser (Abbildung 18 C). Verglichen mit der TTFIELDS Monotherapie waren 77% ($p=0,0344$) und verglichen mit der IN-3 Monotherapie 50% ($p=0,0201$) weniger Zellen vorhanden.

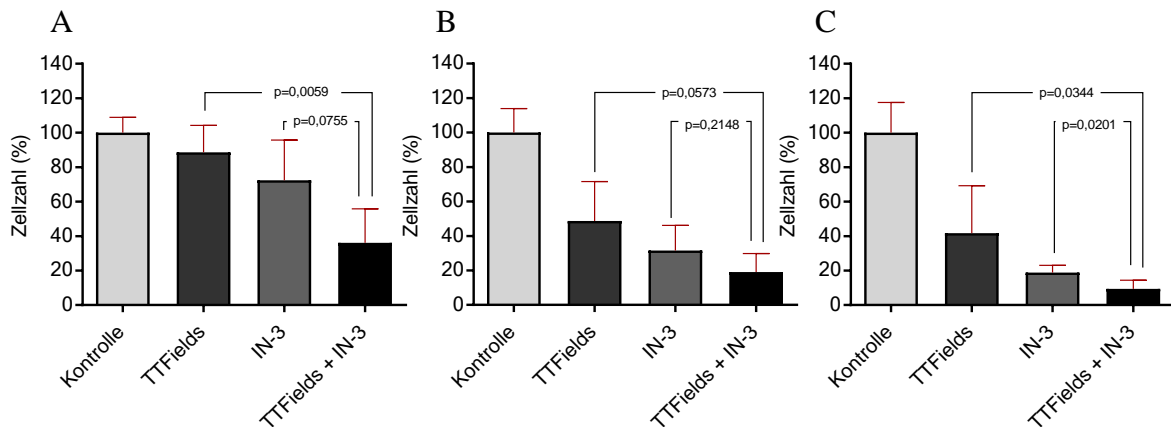


Abbildung 18: Zellzahlanalyse von U-87MG im Zeitverlauf (A: 24 h, B: 48 h, C: 72 h)

Dieser Versuch wurde in einer Anzahl von $n=4$ bei einer TTFields Brutschrank-Temperatur von $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Es wurden initial 30.000 Zellen ausgesät und diese Zellen im Zeitverlauf geerntet und gezählt. Es wurde zum jeweiligen Zeitpunkt die Zellzahl der Medium-Kontrolle auf 100% festgesetzt. Die anderen Zellzahlen wurden als Prozentsatz dieser Kontrolle berechnet. IN-3=MPS1-IN-3, TTFields=Tumor Treating Fields.

Während die Zellen unter der Kontrollbehandlung und den Einzelbehandlungen proliferierten, kam es unter der Kombinationstherapie zu einer Verringerung der initial ausgesäten Zellzahl.

Vergleich man die Zellproliferation der U-87MG Zellen nach 72 h mit den initial ausgesäten 30.000 Zellen, so nahm die Zellzahl in der Kontrolle um 754% zu, während die Zellzahl der Monobehandlungen nur um 256% (TTFields) beziehungsweise um 61% (IN-3) zunahm. Die Kombinationsbehandlung führte dagegen sogar zu einer Verringerung der Zellzahl um 19% (Abbildung 19). Diese Änderung der Prozentzahl war zwischen der Kombinationstherapie und der TTFields Einzeltherapie (-19% vs. + 256%, $p=0,0344$) als auch zwischen der Kombinationstherapie und der IN-3 Einzeltherapie (-19% vs. + 61%, $p=0,0201$) signifikant.

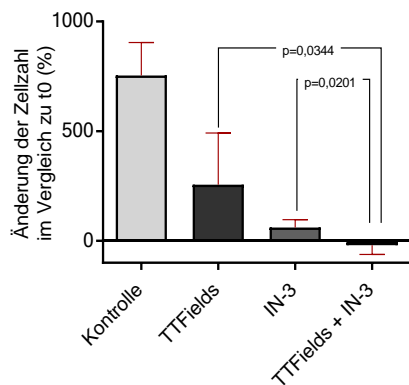


Abbildung 19: Änderung der Zellzahl der Zelllinie U87MG nach 72 h im Vergleich zu t0

Dieser Versuch wurde in einer Anzahl von n=4 bei einer TTFIELDS Brutschrank-Temperatur von 27 °C durchgeführt. Dargestellt ist die relative Zellzahl (Kontrolle, TTFIELDS, IN-3 und TTFIELDS + IN-3) von Zellen nach 72 h Behandlung verglichen mit den initial ausgesäten 30.000 Zellen (100%). IN-3=MPS1-IN-3, TTFIELDS=Tumor Treating Fields.

Bei Zellen der Linie GaMG wurde ein Unterschied der Zellzahlen in den verschiedenen Behandlungen ebenfalls erst nach 72 h Behandlungszeit gemessen.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass es bei Zellen der Linie GaMG nach einer Behandlungszeit von 72 h zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahlen in der Kombinationstherapie bestehend aus TTFIELDS und IN-3 verglichen mit den beiden Einzeltherapien kam [56]. Mit Hilfe eines Time Course Experiments wurde nun untersucht, zu welchem Zeitpunkt erste signifikante Unterschiede zwischen der Kombinationsbehandlung und den Monobehandlungen auftraten. Die Zellen wurden nach 24, 48 und 72 h der jeweiligen Behandlung gezählt. Nach 24 h zeigte sich noch kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Therapien (Abbildung 20 A). Nach 48 h war die Kombinationsbehandlung im Vergleich zur IN-3 Monobehandlung bereits signifikant besser ($p=0,0009$), aber noch nicht besser als die TTFIELDS Einzelbehandlung (Abbildung 20 B). Nach 72 h Behandlungsdauer war die Kombination dann aber beiden Monobehandlungen signifikant überlegen (TTFIELDS: $p=0,0442$; IN-3: $p<0,0001$). Verglichen mit der TTFIELDS Monobehandlung war die Zellzahl in der Kombinationsbehandlung um 48% und verglichen mit der IN-3 Monotherapie sogar um 89% reduziert (Abbildung 20 C).

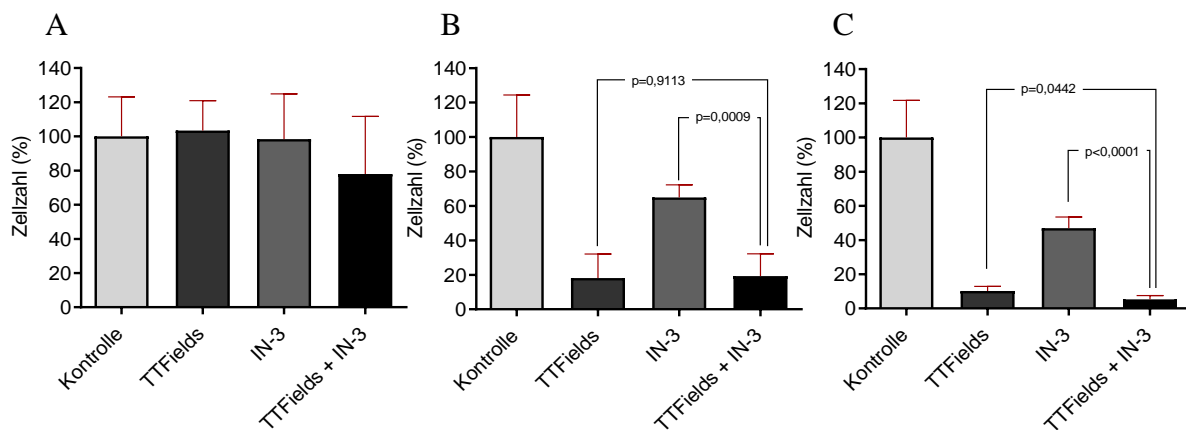


Abbildung 20: Zellzahlanalyse von GaMG im Zeitverlauf (A: 24 h, B: 48 h, C: 72 h)

Dieser Versuch wurde in einer Anzahl von n=4 bei einer TTFields Brutschrank-Temperatur von 18 °C (Intensität von 1,62 V/cm) durchgeführt. Es wurden initial 30.000 Zellen ausgesät. Es wurde zum jeweiligen Zeitpunkt die Zellzahl der Medium-Kontrolle auf 100% festgesetzt. Die anderen Zellzahlen wurden als Prozentsatz dieser Kontrolle berechnet. IN-3=MPS1-IN-3, TTFields=Tumor Treating Fields.

Ebenfalls konnte man an Zellen der Linie GaMG nachweisen, dass sich die initial ausplattierte Zellzahl unter der TTFields Monotherapie und der Kombinationstherapie verringerte, während sie bei der Kontrolle und unter der IN-3 Einzel Therapie weiter anstieg: In der Kontrolle befanden sich nach 72 h fast drei Mal so viele Zellen im Vergleich zu den initial ausgesäten 30.000 Zellen. Die Zellzahl der IN-3 Monobehandlung nahm in diesem Zeitintervall um 30% zu, während die Zellzahlen der TTFields Behandlung um etwa 70% und der Kombinationstherapie um etwa 85% abnahmen (Abbildung 21).

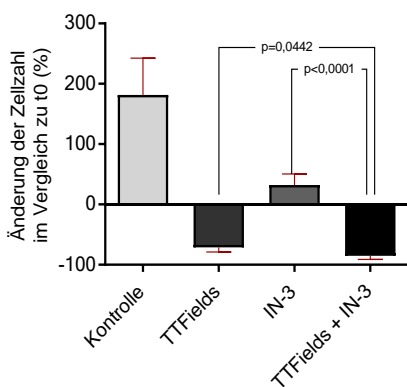


Abbildung 21: Änderung der Zellzahl der Zelllinie GaMG nach 72 h im Vergleich zu t0

Dieser Versuch wurde in einer Anzahl von n=4 bei einer TTFields Brutschrank-Temperatur von 18 °C durchgeführt. Dargestellt ist die relative Zellzahl (Kontrolle, IN-3, TTFields, TTFields+IN-3) von Zellen nach 72 h Behandlung verglichen mit den initial ausgesäten 30.000 Zellen (100%). IN-3=MPS1-IN-3, TTFields=Tumor Treating Fields.

Die TTFields Wirkung hielt nach Behandlungsende weiter an.

In Eot Versuchen konnte festgestellt werden, dass der TTFields Effekt die ersten 24 Stunden nach Ende der Behandlung weiter anhielt (Behandlungsschema Abbildung 10). Nach Beendigung der 72 stündigen Erstbehandlung verringerte sich die Zellzahl an U-87MG Zellen in den folgenden 24 h in jedem Ansatz (Abbildung 22). Danach begannen die Zellen sich zu erholen und es konnte ein Anstieg der Zellzahl auf 116% (TTFields Monotherapie - grüne Linie) beziehungsweise auf 97% (initiale Kombinationstherapie - orangene Linie) 72h nach Eot beobachtet werden [58, 59]. Wurde die IN-3 Behandlung fortgesetzt, so nahm die Zellzahl bei vorheriger IN-3 Monotherapie nach 72 h auf 58% weiter ab (graue Linie). Interessanterweise zeigte der Ansatz, der zunächst eine 72-stündige Kombinationstherapie erhalten hatte und anschließend nur mit IN-3 weiter behandelt wurde, den stärksten Abfall der Zellzahl auf nur 8% (blaue Linie).

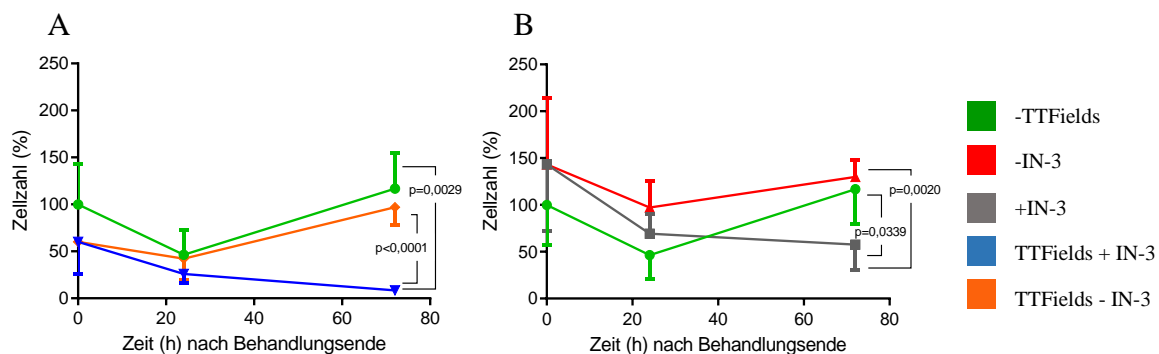


Abbildung 22: End of treatment Experiment

A: Kombinationsbehandlungen, B: Monobehandlungen. Dargestellt sind die Zahlen von U-87MG Zellen in n=3 Versuchswiederholungen bei einer TTFields Brutschranktemperatur von 18°C im Zeitverlauf nach der 72 stündigen Erstbehandlung. Dabei stellt der Zeitpunkt 0 der x-Achse den Zeitpunkt dar, an dem die 72 stündige TTFields Monotherapie, IN-3 Monotherapie bzw. die Kombinationstherapie beendet wurde. Dann wurde entweder nur mit Medium (rote Linie) oder weiter mit IN-3 (graue Linie) behandelt. Die grüne Linie repräsentiert den Proliferationsverlauf nach Beendigung der alleinigen TTFields Behandlung. Der Proliferationsverlauf nach TTFields Behandlungsende mit weitergeführter IN-3 Behandlung (blaue Linie) bzw. bei komplettem Behandlungsstopp (orangene Linie) ist in A gezeigt. IN-3=MPS1-IN-3, TTFields=Tumor Treating Fields.

Dieses Experiment wurde auch mit einem zweiten MPS1 Kinase Inhibitor (AZ) wiederholt. Auch hier war erkennbar, dass nach Wegnahme der TTFields Behandlung in den ersten 24 h die Zellzahl reduziert blieb und die Zellen danach wieder proliferierten. Jene Zellen, die eine initiale TTFields Kombinationsbehandlung erhalten hatten und weitere 72 h mit AZ behandelt wurden zeigten einen anhaltenden Proliferationsstopp: Die

Zellzahl der Kombinationstherapie war im Vergleich zur alleinigen TTFIELDS Therapie um 91% ($p < 0,0017$) und im Vergleich zur alleinigen AZ Therapie um 78% ($p = 0,0022$) gesunken (Abbildung 23).

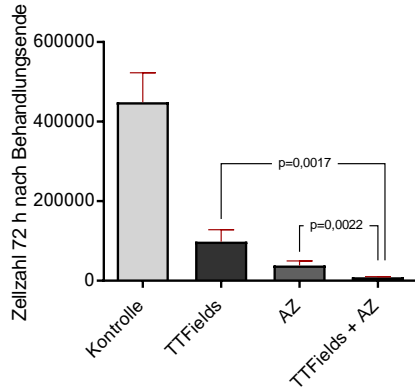


Abbildung 23: Zellzahlen von U87MG Zellen 72 h nach Ende der 72 stündigen Erstbehandlung

Dieser Versuch wurde in einer Anzahl $n=4$ bei einer TTFIELDS Brutschrank-Temperatur von $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Bei dem Kontrollansatz wurde für 198 h mit Medium inkubiert. Für den TTFIELDS Ansatz wurde für 72 h mit TTFIELDS behandelt und für 72 h im Brutschrank mit Medium inkubiert. Der AZ Ansatz wurde 198 h mit dem MPS1 Kinase Inhibitor behandelt. In dem Ansatz TTFIELDS+AZ wurde für 72 h mit TTFIELDS und AZ behandelt und dann für weitere 72 h nur mit AZ behandelt. AZ=AZ 3146, TTFIELDS=Tumor Treating Fields.

3.2 Zellzyklusanalyse

In der Zellzyklusanalyse zeigten sich Pathologien der Zellen, welche mit TTFields, IN-3 oder der Kombination behandelt worden waren.

Die Ergebnisse der Zellzahl-analyse ließen darauf schließen, dass in der Kombinationstherapie vermehrt Zellen in den Zelltod übergingen. Mithilfe von Zellzyklus-analysen sollte nachgewiesen werden, ob sich die unterschiedlich behandelten Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen befanden. Über fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen konnte eine qualitative Aussage zu Anomalien und Pathologien einzelner Zellen während der Mitosephase gemacht werden. Während sich in der Kontrolle nur normale Mitosefiguren fanden, gab es bei allen Behandlungsansätzen mitotische Störungen und insbesondere bei der Doppelbehandlung traten vermehrt multipolare Spindeln auf (Abbildung 24).

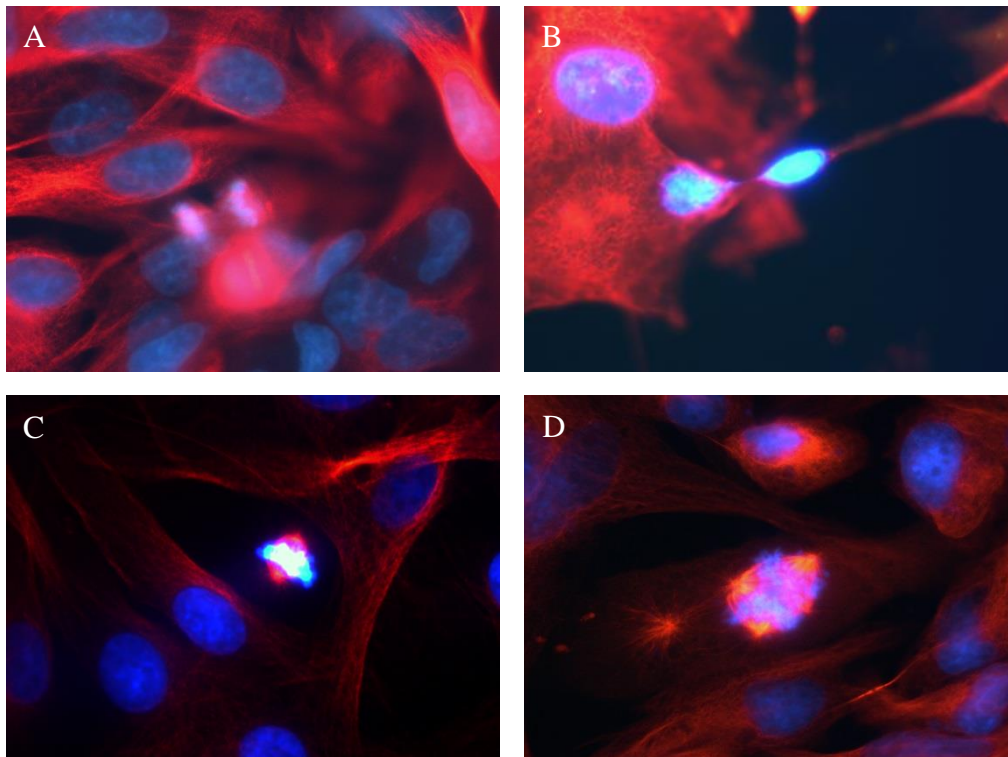


Abbildung 24: Spindelfärbungen von GaMG Zellen nach 72 h Behandlungszeit

Dieser Versuch wurde bei einer TTFields Brutschrank-Temperatur von 18 °C durchgeführt. A: Kontrolle, B: IN-3 Monotherapie, C: TTFields Monotherapie, D: TTFields+IN-3. Es wurde am Fluoreszenzmikroskop eine Vergrößerung von 40 x eingestellt und Overlays erstellt. Die Zellkerne sind durch DAPI blau, die Tubuline durch Cyan-2 bzw. Cyan-3 rot bzw. grün-gelb dargestellt. IN-3=MPS1-IN-3, TTFields=Tumor Treating Fields.

Das Verhältnis von Zellen in der G2/M-Phase und in der G1-Phase verschob sich nach 72 h Behandlungszeit signifikant. Ebenfalls zeigte sich eine Tendenz zur unterschiedlichen Verteilung der Zellen in der G1-Phase. Es zeigte sich ebenfalls, dass der Anteil der Zellen in der Sub-G1-Phase in den Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrolle zugenommen hatte.

Um eine quantitative Aussage zur unterschiedlichen Verteilung der Zellen in den Zellzyklusstadien zu erhalten, wurde die Durchflusszytometrie herangezogen. Diese ergab für U-87MG Zellen mit einer Zunahme der Behandlungsdauer deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Therapien (Abbildung 25).

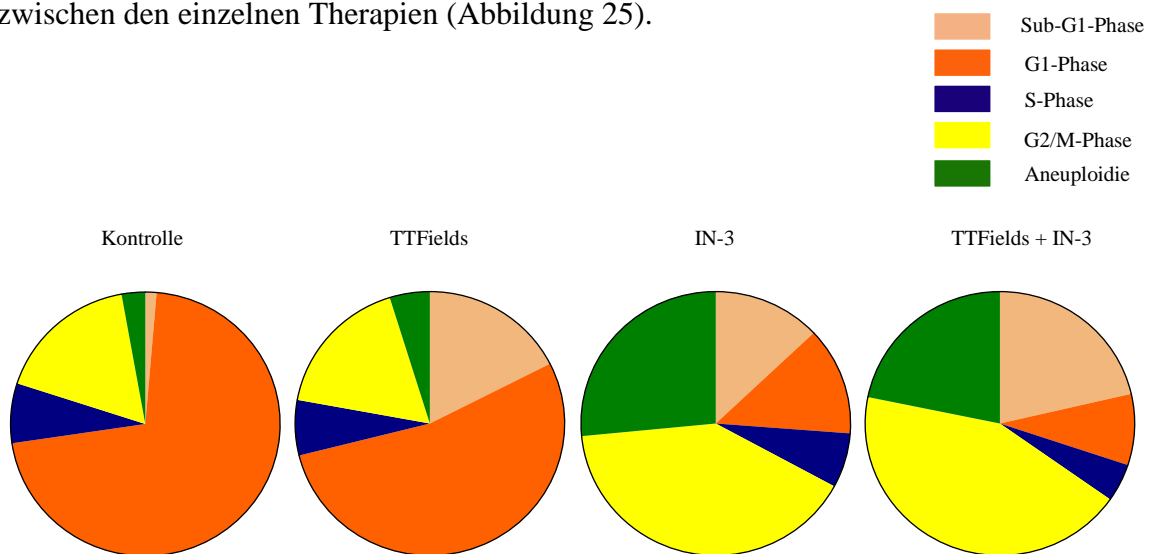


Abbildung 25: Zellen von U87MG in den unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen

Dargestellt ist die mittlere prozentuale Verteilung von Zellen bei n=4 und einer Brutschranktemperatur von 27°C in den unterschiedlichen Therapieansätzen nach der 72 stündigen Behandlungszeit. In der Kontrolle befanden sich zu diesem Zeitpunkt 71% der Zellen in der G1-Phase, 5% der Zellen in der Aneuploidie, 8% in der S-Phase, 18% in der G2/M-Phase und 1% in der Sub-G1-Phase. Bei der TTFields Behandlung befanden sich 53% in der G1-Phase, 5% der Zellen in der Aneuploidie, 7% in der S-Phase, 17% in der G2/M-Phase und 17% in der Sub-G1-Phase. In dem IN-3 Ansatz befanden sich 13% der Zellen in der G1-Phase, 26% der Zellen in der Aneuploidie, 7% in der S-Phase, 40% in der G2/M-Phase und 13% in der Sub-G1-Phase. In der Kombinationstherapie befanden sich 9% der Zellen in der G1-Phase, 21% der Zellen in der Aneuploidie, 5% in der S-Phase, 43% in der G2/M-Phase und 21% in der Sub-G1-Phase. IN-3=MPS1-IN-3, M-Phase=Mitose-Phase, S-Phase=Synthese-Phase, TTFields=Tumor Treating Fields.

Während sich in der Kontrollgruppe 71% der Zellen in der G1-Phase befanden, waren in dem Ansatz, der eine TTFields Monotherapie erhalten hatte, nur 57% und in dem Ansatz, der einer IN-3 Monotherapie unterzogen worden war, 13% der Zellen in der G1-Phase. In jenem Ansatz, der mit der Kombinationstherapie behandelt wurde, fanden sich nur 9% der Zellen in der G1-Phase (Abbildung 26 A). Im Unterschied zur TTFields Behandlung war dies eine Reduktion um 84% (p=0,0003) und im Unterschied zur IN-3 Monotherapie um 31% (p=0,1460). Das umgekehrte Bild ergab sich für die G2-Phase: In der Kontrollgruppe

befanden sich 18%, unter der TTFIELDS Monotherapie 20%, der IN-3 Monotherapie 38% und in der Kombinationstherapie 49% der Zellen in der G2-Phase (Abbildung 26 B). Somit befanden sich unter der Kombinationstherapie mehr als doppelt so viele Zellen in der G2-Phase als in der TTFIELDS Monotherapie (Anstieg um 145%, $p=0,0002$). Zwischen der Kombinationstherapie und der IN-3 Monotherapie zeigte sich ein Anstieg um 29% ($p=0,0307$) (Abbildung 26).

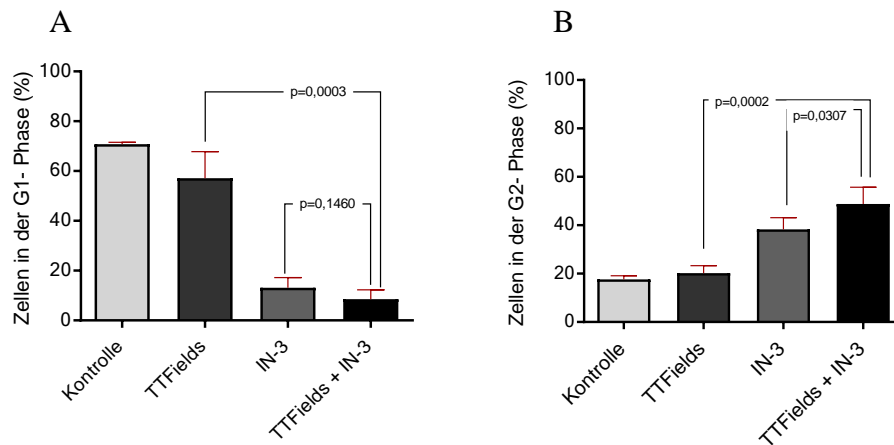


Abbildung 26: Prozentsatz der U-87MG Zellpopulation, welche sich nach 72 h Behandlung in der G1-Phase (A) und der G2-Phase (B) befand

Dieser Versuch wurde in einer Anzahl von $n=4$ und bei einer TTFIELDS Brutschranktemperatur von $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. IN-3=MPS1-IN-3, TTFIELDS=Tumor Treating Fields.

3.3 Apoptose

Die Annexin Färbung und der TUNEL Assay zeigten, dass sehr viel mehr Zellen aus der Kombinationstherapie als Zellen aus den Einzeltherapien in der frühen oder späten Apoptose waren.

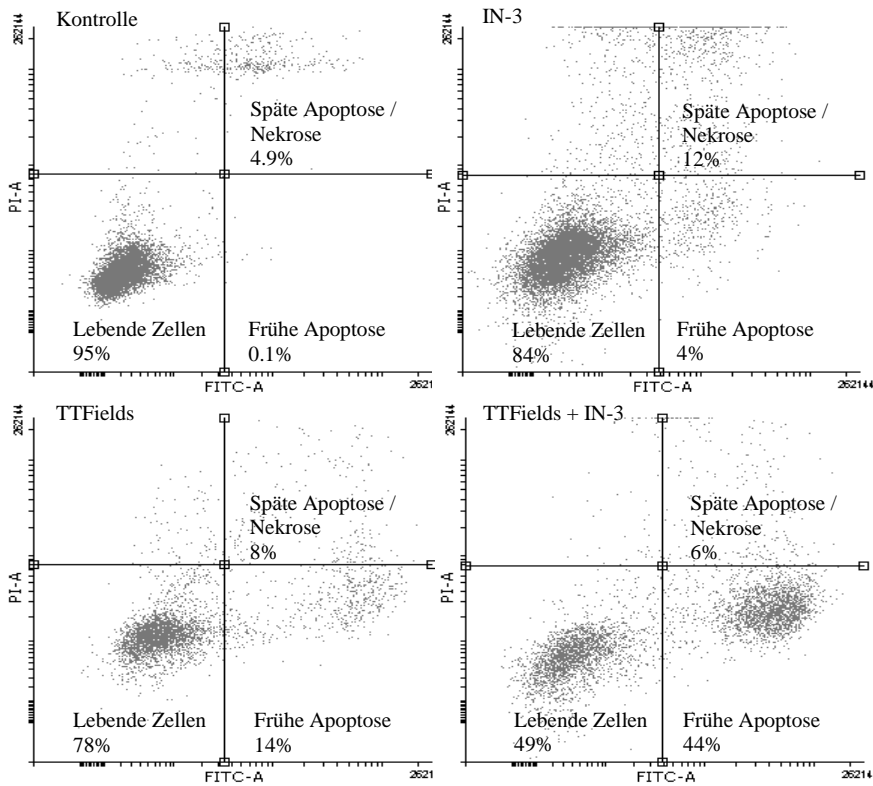
In der Kontrollgruppe wiesen 95% der Zellen eine intakte Zellmembran als auch PS-Lokalisation im Inneren der Zelle auf. Ein Anteil von 5% war nekrotisch und von 0,1% apoptotisch. Der Anteil nicht charakterisierbarer Zellen von 2% war in allen Therapie-Gruppen etwa gleich hoch (Abbildung 27). In der Gruppe, welche eine TTFields Monotherapie erhalten hatte, befanden sich mit 14% schon weitaus mehr Zellen in der frühen sowie mit 8% in der späten Apoptose/ Nekrose. Nur 78% der Zellen wurden als lebend detektiert. Die mit einer IN-3 Monotherapie behandelte Zellpopulation enthielt 84% lebensfähige, 4% früh-apoptotische und 12% spät-apoptotische/ nekrotische Zellen. In der Zellpopulation, die mit der Kombinationstherapie behandelt worden war, war der Prozentsatz der lebenden Zellen auf 49% gesunken, während der Prozentsatz an früh-apoptotischen Zellen mit 44% massiv gestiegen war. Als spät-apoptotische/ nekrotische Zellen wurden hier 6% der Zellen detektiert (Abbildung 27 A).

Die Kombinationstherapie aus TTFields+ IN-3 bewirkte einen Anstieg an früher Apoptose um 431% verglichen mit der TTFields Monotherapie ($p=0,0002$) und um 1443% verglichen mit der IN-3 Monotherapie ($p<0,0001$) (Abbildung 27 B).

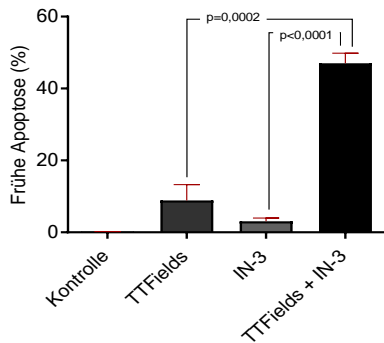
Der apoptosefördernde Effekt aus SAC-Inhibition in Kombination mit TTFields bestätigte sich mit einem weiteren MPS1 Inhibitor.

In der AZ Monotherapie waren 91% der Zellen lebensfähig und nur 2% in der frühen sowie 4% in der späten Apoptose/ Nekrose (Abbildung 27 C). Unter der Kombinationstherapie waren dagegen nur noch 47% der Zellen lebend, während sich 40% in der frühen und 11% in der späten Apoptose/ Nekrose befanden. Die Apoptoserate unter der Kombinationstherapie aus TTFields und AZ verglichen mit alleiniger TTFields Behandlung stieg um 342% ($p=0,0653$) und verglichen mit alleiniger IN-3 Behandlung um 1910% ($p=0,0332$) (Abbildung 27 C).

A



B



C

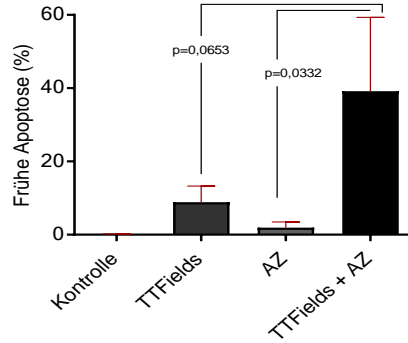


Abbildung 27: Exemplarische Messreihe der U-87MG Zellen im Annexin-Assay

Dieser Versuch wurde in einer Anzahl von $n=3$ und bei einer Brutschranktemperatur von $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Es wurden die Zellen in der frühen Apoptose mittels Annexin V Färbung gemessen. A: Exemplarische Messreihe der U-87MG Zellen im Annexin-Assay. B: Quantifizierung des Zellanteils in der frühen Apoptose C: Quantifizierung der Annexin Färbung unter AZ Behandlung. FITC=Fluoresceinisothiocyanat, AZ=AZ 3146, IN-3=MPS1-IN-3, PI=Propidiumiodid, TTFields=Tumor Treating Fields.

Der TUNEL Assay bestätigte diese Befunde für die späte Apoptose unter IN-3 Behandlung.

An U-87MG Zellen wurde die Rate der späten Apoptose mittels des TUNEL Assay nach 24 h, 48 h und 72 h Behandlung gemessen. Der Wert der Kontrollgruppe wurde auf den Faktor 1 geeicht und die anderen Werte wurden als ein Vielfaches dieses Wertes angegeben. Nach der 24 stündigen Behandlungsdauer ließen sich noch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kombinationstherapie und den Monotherapien feststellen. Die Apoptoserate war in den unterschiedlich behandelten Gruppen etwa gleich hoch. Nach der 48 stündigen Behandlungsdauer befanden sich nun deutlich mehr Zellen der Kombinationstherapie in der Apoptose verglichen mit Zellen, die eine TTFIELDS Monotherapie erhalten hatten, allerdings konnte kein Unterschied zwischen der Kombinationstherapie und der IN-3 Monotherapie festgestellt werden. Erst nach 72 stündiger Behandlungsdauer wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Kombinationstherapie und den Einzeltherapien detektiert: Es konnten in der Kombinationstherapiegruppe fast 3 Mal so viele Zellen in der Apoptose im Vergleich zur TTFIELDS Monotherapie (Anstieg um 160%; $p=0,0074$) und fast 2 Mal so viele Zellen im Vergleich zur IN-3 Monotherapie (Anstieg um 98%; $p=0,0483$) nachgewiesen werden (Abbildung 28).

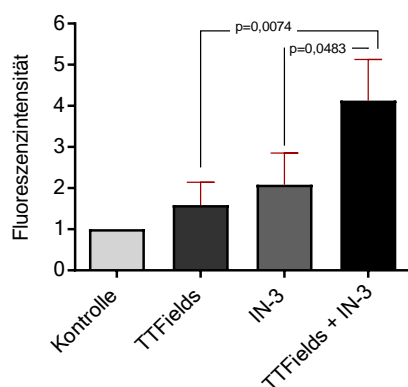


Abbildung 28: Relative Fluoreszenzintensität im TUNEL Assay von U87MG nach 72 h

Dieser Versuch wurde in einer Anzahl von $n=4$ bei einer TTFIELDS Brutschranktemperatur von 27 °C durchgeführt. Der Fluoreszenzwert der Kontrolle wurde auf 1 geeicht und die anderen Werte wurden als ein Vielfaches dieses Wertes angegeben. IN-3=MPS1-IN-3, TTFIELDS=Tumor Treating Fields.

4. Diskussion

Bei der Therapie des GBM stehen behandelnde Ärzte vor einer großen Herausforderung. Durch das infiltrative Wachstum des Tumors ist die Überlebensrate sehr ungünstig. Neue Therapieansätze wie Immuntherapien oder Angiogenese-Inhibition sind bislang nur wenig wirksam [61]. Die neue Behandlungsmodalität der TTFields zeigte sich jedoch sowohl in Zellkulturen und im Tiermodell als auch in klinischen Studien hochwirksam und nebenwirkungsarm [33, 62-64]. Damit könnte sie neben der OP, Strahlentherapie und TMZ als eine vierte Säule in der Therapie des GBM etabliert werden. Da die Überlebensrate der Patienten mit neu diagnostizierten GBM unter voller Therapieausschöpfung (OP, Chemo- und Strahlentherapie und TTFields) mit 20,5 Monaten jedoch weiterhin vernichtend gering ist, sind neue Kombinationen aus Chemotherapie und TTFields Gegenstand aktueller Forschung [65]. Dabei werden immer mehr Mechanismen, die durch TTFields beeinflusst werden, aufgedeckt. Es konnte gezeigt werden, dass die Hauptwirkung der TTFields die Beeinträchtigung der Mitose ist [33, 51, 64]. Wir konnten nun zeigen, dass sich die Effektivität der TTFields durch eine Inhibition des Spindelkontrollpunkts steigern lässt [59].

Die Effektivität der Kombinationstherapie ist von der Verdopplungszeit der Zellen abhängig.

Zellen mit einer hohen Verdopplungszeit wie GaMG Zellen mit ca. 50 h zeigten erst nach 48 h ein signifikantes Ansprechen auf die Kombinationstherapie, Zellen mit einer niedrigen Verdopplungszeit wie U-87MG Zellen mit ca. 34 h jedoch schon nach 24 h. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass U-87MG Zellen deutlich sensitiver auf TTFields reagierten als GaMG Zellen [56]. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die U-87 Zellen sogar bei einer erniedrigten TTFields Temperatur und damit einer niedrigeren TTFields-Intensität sensitiver verglichen mit GaMG Zellen auf die Behandlung reagierten. Die niedrigere Verdopplungszeit könnte ein Grund für die erhöhte Sensitivität sein: Da die TTFields einen antimitotischen Effekt haben, der von der Zellachse der sich in der Mitose befindlichen Zelle abhängt, wirkt die Therapie besonders gut auf eine Zellpopulation, welche häufig die Mitosephase durchläuft [36, 62]. Der antiproliferative Effekt der Kombinationstherapie startete bereits nach 24 h während die Einzeltherapien erst nach 48

oder 72 h wirksam waren. Damit deutete sich eine Verstärkung des eigentlich später auftretenden Effekts der TTFields an.

Besonders aggressive Tumoren mit einer hohen Teilungsrate und niedriger Verdopplungszeit könnten sehr gut auf die Kombinationstherapie ansprechen. Im Hinblick auf weitere durch TTFields behandelbare solide Tumoren könnte diese Erkenntnis hilfreich sein. So hat beispielsweise die Behandlung von Tumoren wie des Mesothelioms mit TTFields aktuell eine Zulassung durch die FDA erhalten [38]. Ebenfalls werden aktuell weitere klinische Studien an Patienten mit schwer behandelbaren, hoch-proliferativen Tumoren wie dem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom oder dem Pankreaskarzinom durchgeführt [38, 66]. Es scheint möglich, dass TTFields auch auf andere, bisher nicht untersuchte, solide Tumoren antiproliferative Wirkungen entfalten.

Die Kombinationstherapie könnte nicht nur das weitere Wachstum hemmen, sondern auch zu einer Tumormassenreduktion führen.

Nach 72 h kam es unter der Kombinationstherapie zu einer Reduktion der initial ausplattierten Zellzahl. Die beiden Einzeltherapien hatten lediglich die weitere Proliferation verlangsamt. Dies bedeutet, dass durch die Kombinationstherapie nicht nur die weitere Zellteilung unterbunden wurde, sondern die vorhandenen Zellen aktiv in den Zelltod getrieben wurden. Durch bisherige Studien konnte nachgewiesen werden, dass TTFields zwar die Tumor-Progression verlangsamen, jedoch nicht das Tumorstadium vollständig stoppen können [48, 67]. Es wurde durch Tannous et al. eine Tumormassenreduktion durch eine Kombination von einem chemischen spindelschädigenden Agens (Vincristin) mit MPS1-Inhibition im Mausmodell beschrieben [48]. Die Autoren beobachteten, dass eine Kombination aus Vincristin und IN-3 bei Mäusen, bei denen Tumorzellen der GBM-Linie U251-FM injiziert wurden, zu einer Abnahme der Tumorgroße nach 3 Wochen Therapie führte, während die Einzeltherapien keine Größenabnahme bewirkten. Wie die Autoren der Studie jedoch anmerkten, hat Vincristin als Chemotherapeutikum einige schwer zu behandelbaren Nebenwirkungen [48]. Zu diesen zählen Erhöhung von Leberenzymen, Hautreaktionen, hämatologische sowie insbesondere neurotoxische Nebenwirkungen. Letztere manifestieren sich vor allem als periphere senso-motorische Polyneuropathie, aber auch als Augenmuskel-Paresen, Dysphonie und schwere autonome Funktionsstörungen [68]. Da Glioblastom-Patienten

durch das Tumorleiden bereits einen pathologischen neurologischen Status haben, könnte eine Vincristin-Behandlung die neurologische Manifestation des Tumors verstärken oder eine Verschlechterung der Gliom-Progression verschleiern. Im Gegensatz dazu sind bei der TTFields Therapie in klinischen Studien mittelschwere bis schwere Nebenwirkungen ausschließlich im Sinne von Hautirritationen beschrieben worden, welche ein gutes Ansprechen auf eine Kortison-Therapie zeigten und damit relativ einfach zu behandeln waren [39]. Aus unseren Daten folgern wir nun, dass TTFields der Vincristin-Behandlung hinsichtlich dem Nebenwirkungsprofil und der damit einhergehenden Lebensqualität überlegen sein und in der Kombination mit MPS1 Inhibitoren ebenfalls zu einer Tumormassenreduktion führen könnten.

Die Hauptwirkung der TTFields besteht in einer Störung des Aufbaus des Spindelapparates sowie dessen Destabilisierung.

TTFields führen zu einer Störung des Aufbaus von Mikrotubuli und anderen Schlüsselproteinen der Mitose [62, 64]. Hauptmechanismus ist dabei die Ruptur von Spindel-Mikrotubuli was durch Reduktion des Verhältnisses von polymerisiertem zu totalem Tubulin sichtbar wird [64]. Ein solcher Spindelschaden aktiviert normalerweise den Spindelkontrollpunkt und induziert einen Zellzyklus-Arrest in der G2/M-Phase, bis der Spindeldefekt repariert wurde oder apoptotischer Zelltod ausgelöst wurde [69, 70]. Allerdings ist der Metaphase-Arrest nicht permanent. Zellen können durch einen Prozess, der als „mitotic slippage“ bezeichnet wird, einen Austritt aus der Mitose nehmen, welcher nicht in der Zytokinese endet und folglich tetraploide Zellen entstehen lässt. Das Schicksal dieser Zellen kann nun ebenfalls Apoptose, Nekrose, Seneszenz oder Regenerierung der Zellen mit verändertem DNA-Inhalt sein. Seneszenz ist dabei ein Zellzyklusarrest, welcher durch Stress verursacht wurde. Die Zellen können sich dabei nicht mehr teilen, bleiben jedoch metabolisch aktiv. Manche Autoren beschreiben die Seneszenz sogar als eine Art programmierten Zelltod bei Tumorthherapie [71-73].

Wir kamen durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass eine Beeinträchtigung des Spindelapparates zur antimitotischen Wirkung von TTFields beitragen könnte. In den Behandlungsgruppen mit TTFields (Monotherapie oder Kombinationstherapie) wurden Mitosefiguren mit mehreren Spindelpolen und aberranten

Spindelapparaten aufgefunden. Diese Schäden würden die Zellen in die Apoptose oder das „mitotic slippage“ führen.

Es sind bis heute wahrscheinlich nur ein Bruchteil der durch TTFields beeinflussten Signalwege und Stoffwechselprozesse bekannt. Die Wirkung eines elektrischen Felds auf lebende Organismen wurde bereits in den 50er und 60er Jahren untersucht [74]. In diesen Studien wurde beobachtet, dass die Größe und Richtung einer elektrischen Spannung ein Signal für Osteoblasten für die Differenzierung und den Aufbau des Knochens sein kann. Ebenfalls ist bekannt, dass elektrische Wechselfelder an Bakterien, welche charakteristischerweise keine den menschlichen Zellen ähnliche Mikrotubuli besitzen, ebenfalls eine Proliferationsinhibition ausüben [75]. Somit müsste die Wachstumshemmung nicht nur auf einer Schädigung des Spindelapparates beruhen. Es bleibt abzuwarten und weiter zu untersuchen, inwiefern TTFields sich auf weitere Prozesse im menschlichen Körper auswirken.

Die mit den TTFields behandelten Zellen sind vermehrt sowohl in der G2-Phase als auch der Sub-G1-Phase zu finden verglichen mit Zellen aus den anderen Behandlungsgruppen.

Wir haben festgestellt, dass sich unter der Kombinationstherapie verglichen mit den beiden Einzeltherapien signifikant mehr Zellen in der G2/M-Phase befanden. Dieses Ergebnis könnte einen Hinweis darauf geben, dass die MPS1 Kinase nicht nur eine Funktion in der Aktivierung der SAC-Proteine hat, sondern auch eine aktive Rolle in der Anordnung und der Korrektur von falsch gebundenen KT spielt. So wurde durch Maure et al. beschrieben, dass die MPS1 Kinase fehlerhafte Chromosomenbindungen über einen spannungsabhängigen Mechanismus aktiv korrigiert [76]. Durch eine Inhibition der MPS1 Kinase würden somit die durch TTFields gesetzten Fehler und damit aberrant gebundene KT nicht mehr korrigiert werden und die Zelle würde länger in der G2/M-Phase verbleiben, bis sie schließlich dem Schicksal der Apoptose oder Seneszenz entgegensteuert.

Außerdem konnten wir beobachten, dass die Zellen, welche mit der TTFields Monotherapie oder der Kombinationstherapie behandelt worden waren, vermehrt in der Sub-G1-Phase befanden. Die Sub-G1-Phase gibt einen, wenn auch unspezifischen Hinweis auf den Anteil apoptotischer Zellen in einer Zellpopulation [77, 78].

Die Kombination aus TTFields und Inhibition der MPS1 Kinase führten in GBM Zellen zu einer signifikant höheren Apoptoserate als die Einzeltherapien. Jedoch konnten Prozesse der frühen Apoptose deutlich besser detektiert werden als Prozesse der späten Apoptose.

Es konnte gezeigt werden, dass unter der Kombinationstherapie deutlich mehr Zellen in die Apoptose eingetreten waren als unter den Einzeltherapien. Die Apoptose ist ein Prozess, der in unterschiedlichen Stadien durchlaufen wird. Frühe Stadien können durch Annexin V und späte Stadien über den TUNEL Assay nachgewiesen werden. Während die Zellen nach 72 stündiger TTFields Behandlung (sowohl Kombinationstherapie als auch TTFields Monotherapie) vermehrt in Stadien der frühen Apoptose detektiert wurden, waren die gleich behandelten Zellen in dem Stadium der späten Apoptose verhältnismäßig wenig messbar. Das könnte darauf zurück zu führen sein, dass die Zellen erst nach 72 h die späte Apoptose durchlaufen.

Es könnte jedoch auch einen molekularen Prozess geben, der zeitlich zwischen der frühen und späten Apoptose liegt, und durch TTFields beeinflusst wird. TTFields sorgen für Zellmembranprotrusionen und eine erhöhte Zellpermeabilität; Prozesse die als „Membrane blebbing“ beschrieben werden [79, 80]. Sie könnten während der Apoptose dafür sorgen, dass vermehrt Protrusionen zunehmen und die Zelle rupturiert.

In einer neuen Studie wurden Calciumkanäle als weitere Angriffspunkte der TTFields beschrieben [80]. Es sind unterschiedliche Prozesse der Zelle bekannt, die durch Calcium reguliert werden. Dazu gehören Zellzyklus, Zellmigration, DNA-Reparaturmechanismen und Prozesse der Apoptose [80, 81]. Wenn nun TTFields Calcium-Kanäle beeinflussen, könnte die Aktivierung der calcium-abhängigen DNase gestört sein und damit die für die späte Apoptose notwendige DNA-Fragmentierung beeinflusst werden.

Durch die Kombination von TTFields und Inhibition der MPS1-Kinase könnte eine Behandlungsunterbrechung der TTFields keine negativen Folgen auf das Outcome haben.

TTFields sorgten auch nach dem Applikationsende für einen 24 stündigen Proliferationsstopp. Nach diesem initialem Proliferationsstopp proliferierten die Zellen allerdings wieder. Unter der Kombinationstherapie (TTFields und MPS1-Inhibition und

daraufhin Applikatonsende der TTFields unter Weiterbehandlung mit MPS1-Inhibition) erfolgte eine längere Wachstumsinhibition von 72 h. Dies ist eine wichtige Erkenntnis im Hinblick auf die mögliche Therapie von unter TTFields aufgetretenen Nebenwirkungen. Die Wechselfeldtherapie führte bei etwa der Hälfte der behandelten Patienten zu Hautirritationen der Grade 1 oder 2 und bei 2 % zu schwereren Hautveränderungen [31]. Ab Grad 2 wäre nach Lacouture et al. ein Abnehmen der Arrays für eine bestimmte Zeit sinnvoll, um eine mögliche topische Therapie einzuleiten oder die durch Druck entstandenen Ulzerationen zu entlasten [39]. Die Kombinationsbehandlung und die nachfolgende Behandlung mit MPS1 hätte für eine längere Zeit von 72 h nach Abschalten des Wechselfelds einen nachwirkenden Inhibitionseffekt und könnte damit ein genügend großes Zeitfenster bieten, um mögliche Nebenwirkungen zu therapieren. Außerdem könnten die Patienten von diesem Umstand profitieren, indem sie für eine gewisse Zeit die Elektroden nicht tragen müssten, ohne auf den therapeutischen Effekt negativ einzuwirken. Auch andere Autoren nennen mögliche negative Einflüsse auf die Selbstwahrnehmung. So können zwar Perücken und Kopfbedeckungen helfen, die Arrays zu bedecken, jedoch wären Vorwölbungen der Elektroden und die verbundenen Kabel auffällig zu sehen und könnten das Selbstbild und Selbstbewusstsein einiger Patienten negativ beeinflussen [82].

Die EF-14 Studie deckte auf, dass eine Compliance von über 75 % bei dem Tragen der Elektroden mit einem höheren Gesamtüberleben assoziiert war [67]. Nun kamen wir zu dem Ergebnis, dass unter der Kombinationstherapie von TTFields mit MPS1 Inhibition auch eine Unterbrechung der TTFields unter speziellen Umständen durchaus zu verantworten sein könnte [83].

Ein anderer MPS1 Inhibitor, AZ 3146, führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

Wir haben einige Experimente mit einem zweiten MPS1 Kinase Inhibitor durchgeführt. Darunter fallen das End of treatment Experiment und die Messung der Apoptose. Wir konnten beobachten, dass der zweite MPS1 Kinase Inhibitor zu vergleichbaren Ergebnissen führte. Da MPS1-IN3 bislang noch in keiner klinische Studien Anwendung beim Menschen gefunden hat, ist bisher unbekannt, welche Nebenwirkungen der Inhibitor entfalten könnte. Insofern ist es wichtig, dass die Wirkungen in vergleichbarer Weise auch durch andere Inhibitoren mit einer anderen chemischen Struktur, aber gleichem Angriffspunkt auftreten. Nach klinischen Experimenten könnte der zweite Inhibitor eine

besseres Nebenwirkungsprofil oder bessere Blut-Hirn-schranken-Permeabilität besitzen und somit im klinischen Einsatz einen höheren Benefit zeigen.

In neuen Studien werden MPS1 Kinase Inhibitoren hinsichtlich der Verwendung beim Menschen untersucht.

Die Anwendung von MPS1 Inhibitoren in Kombination mit einem Mikrotubuli-schädigenden Agens (Paclitaxel) wird aktuell an Patienten mit soliden Tumoren wie dem Ovarialkarzinom, Brustkarzinom und Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom untersucht. Der verwendete MPS1 Inhibitor (BAY 1161909) zeigte unerwünschte Nebeneffekte wie Fatigue-Symptomatik, Anämie, Alopezie, Diarrhoe und Schwindel und die dosis-limitierende Nebenwirkung einer Leberwerterhöhung [84]. Allerdings sind jene Nebenwirkungen gut zu managen und zu therapieren. Die Klasse der MPS1 Inhibitoren könnte zu einer komplett neuen Chemotherapie-Gruppe werden. Durch unsere Ergebnisse konnten wir die Hoffnung auf eine bessere Tumorthherapie durch die Kombination von TTFields mit einem MPS1 Inhibitor wecken. Diese könnte nicht nur bei GBM-Patienten, sondern auch bei Patienten mit anderen soliden Tumoren zu besseren Therapieerfolgen führen.

5. Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme gehört aufgrund der hohen Proliferationsrate und raschen Infiltration zu den am schwersten zu therapierenden Tumoren. Seit 2011 gibt es durch Tumor Therapie Felder (TTFields) eine neue Möglichkeit der Therapie, die zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens von 14,6 Monate auf 20,5 Monate geführt hat. TTFields sind elektrische Wechselfelder mit einer geringen Intensität und intermediären Frequenz, welche über Elektroden auf der Kopfhaut in den Tumor übertragen werden. Die Hauptwirkung der TTFields besteht, ähnlich chemischen Spindel-schädigenden Agentien, in der Mitose-Störung. Monopolar-spindle-1 (MPS1), eine Schlüsselkomponente des mitotischen Spindelkontrollpunkts, welcher normalerweise Spindelschäden repariert, wurde in dieser Arbeit inhibiert, sodass die durch TTFields verursachten Spindelschäden nicht mehr korrigiert werden konnten. Es wurde untersucht, inwieweit der TTFields Effekt durch eine Kombination mit MPS1 Inhibition verstärkt werden kann. Dazu wurde an Tumorzellen der Linie GaMG und U-87MG die Zellzahl im Time Course und nach Beendigung der TTFields Behandlung gemessen. Wir konnten in der Tat nachweisen, dass bei der Kombinationsbehandlung eine deutlich frühere Reduktion der Zellzahlen im Vergleich zu den Einzeltherapien aufgetreten war. Ebenfalls kam es unter der Kombinationstherapie zu einer Netto-Reduktion der Zellzahl, und nicht nur zu einer Proliferationsinhibition der Tumorzellen wie bei den Einzeltherapien. In Zellzyklus-Analysen und Apoptose-Messungen mittels Fluoreszenzfärbungen und mithilfe durchflusszytometrischer Technik zeigte sich, dass die Zellen, die mit einer Kombinationsbehandlung behandelt worden waren, vermehrt mehrpolige Spindelfiguren ausbildeten. Schließlich konnten wir nachweisen, dass die Apoptose-Rate in jener Zellpopulation am höchsten war, welche eine Kombinationsbehandlung aus TTFields und MPS1 Inhibition erhalten hatte. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei der Kombination aus den nebenwirkungsarmen TTFields und den derzeit in klinischen Studien getesteten MPS1 Inhibitoren um eine erweiterte multimodale Therapie-Option bei Glioblastoma multiforme handeln könnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Dolecek, T.A., et al., *CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009*. Neuro Oncol, 2012. 14 Suppl 5: p. v1-49.
2. Hanif, F., et al., *Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment*. Asian Pac J Cancer Prev, 2017. 18(1): p. 3-9.
3. Kleihues, P. and L.H. Sobin, *World Health Organization classification of tumors*. Cancer, 2000. 88(12): p. 2887.
4. Kruchko, C., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015*. Neuro-Oncology, 2018. 20(suppl_4): p. iv1-iv86.
5. Thakkar, J.P., et al., *Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. 23(10): p. 1985-96.
6. Wrensch, M., et al., *Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature*. Neuro Oncol, 2002. 4(4): p. 278-99.
7. Mathews, J.D., et al., *Cancer risk in 680,000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians*. BMJ, 2013. 346: p. f2360.
8. Reni, M., et al., *Central nervous system gliomas*. Crit Rev Oncol Hematol, 2017. 113: p. 213-234.
9. Deltour, I., et al., *Time trends in brain tumor incidence rates in Denmark, Finland, Norway, and Sweden, 1974-2003*. J Natl Cancer Inst, 2009. 101(24): p. 1721-4.
10. Davis, M.E., *Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment*. Clin J Oncol Nurs, 2016. 20(5 Suppl): p. S2-8.
11. Farrell, C.J. and S.R. Plotkin, *Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes*. Neurol Clin, 2007. 25(4): p. 925-46, viii.
12. Posti, J.P., et al., *Presenting symptoms of glioma in adults*. Acta Neurol Scand, 2015. 131(2): p. 88-93.
13. Zhang, X., et al., *Glioblastoma multiforme: Molecular characterization and current treatment strategy (Review)*. Exp Ther Med, 2012. 3(1): p. 9-14.
14. Agnihotri, S., et al., *Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013. 61(1): p. 25-41.
15. Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Neurologie, *Gliome*. 2014 [cited 2018, 8 Dec]; Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-099l_S2k_Gliome_2015-06-abgelaufen.pdf.
16. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathol, 2016. 131(6): p. 803-20.
17. Ohgaki, H. et al., *The definition of primary and secondary glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2013. 19(4): p. 764-72.
18. Li, R., et al., *Comprehensive portrait of recurrent glioblastoma multiforme in molecular and clinical characteristics*. Oncotarget, 2015. 6(31): p. 30968-74.

19. Zhang, C., et al., *IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma*. Neuro Oncol, 2013. 15(9): p. 1114-26.
20. Capper, D. et al., [Classification of gliomas. Current progress and perspectives]. Nervenarzt, 2015. 86(6): p. 672, 674-6, 678-80, passim.
21. Molenaar, R.J., et al., *Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses*. Oncogene, 2018. 37(15): p. 1949-1960.
22. Stummer, W., et al., *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial*. Lancet Oncol, 2006. 7(5): p. 392-401.
23. Senft, C., et al., *Optimizing the extent of resection in eloquently located gliomas by combining intraoperative MRI guidance with intraoperative neurophysiological monitoring*. J Neurooncol, 2012. 109(1): p. 81-90.
24. Iacob, G. et al., *Current data and strategy in glioblastoma multiforme*. J Med Life, 2009. 2(4): p. 386-93.
25. Wilson, T.A., et al., *Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics*. Surg Neurol Int, 2014. 5: p. 64.
26. Laperriere, N., et al., *Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review*. Radiother Oncol, 2002. 64(3): p. 259-73.
27. Roa, W., et al., *Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial*. J Clin Oncol, 2004. 22(9): p. 1583-8.
28. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. 352(10): p. 987-96.
29. Agarwala, S.S. et al., *Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma*. Oncologist, 2000. 5(2): p. 144-51.
30. Cambruzzi, E., *The role of IDH1/2 mutations in the pathogenesis of secondary glioblastomas*. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 2017. 53: p. 338-344.
31. Mehta, M., et al., *Critical review of the addition of tumor treating fields (TTFields) to the existing standard of care for newly diagnosed glioblastoma patients*. Crit Rev Oncol Hematol, 2017. 111: p. 60-65.
32. Stupp, R., et al., *NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality*. Eur J Cancer, 2012. 48(14): p. 2192-202.
33. Kirson, E.D., et al., *Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(24): p. 10152-7.
34. Stupp, R., et al., *Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial*. JAMA, 2015. 314(23): p. 2535-43.
35. Hottinger, A.F., et al., *Tumor treating fields: a novel treatment modality and its use in brain tumors*. Neuro Oncol, 2016. 18(10): p. 1338-49.
36. Giladi, M., et al., *Mitotic disruption and reduced clonogenicity of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo by tumor treating fields*. Pancreatology, 2014. 14(1): p. 54-63.

37. Swanson, K.D., et al., *An Overview of Alternating Electric Fields Therapy (NovoTTF Therapy) for the Treatment of Malignant Glioma*. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2016. 16(1): p. 8.
38. Novocure, *Optune-Instructions for use*. 2016 [cited 2016, 3 Dec]; Available from: https://www.optune.com/Content/pdfs/Optune_IFU_8.5x11.pdf.
39. Lacouture, M.E., et al., *Characterization and management of dermatologic adverse events with the NovoTTF-100A System, a novel anti-mitotic electric field device for the treatment of recurrent glioblastoma*. *Semin Oncol*, 2014. 41 Suppl 4: p. S1-14.
40. Heinrich, P.C., *Biochemie und Pathobiochemie*. 2014, Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 978-364-21797-2-3
41. Skoufias, D.A., et al., *Mitosis persists in the absence of Cdk1 activity when proteolysis or protein phosphatase activity is suppressed*. *J Cell Biol*, 2007. 179(4): p. 671-85.
42. Musacchio, A. et al., *The spindle-assembly checkpoint in space and time*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(5): p. 379-93.
43. Lara-Gonzales P., *The spindle assembly checkpoint*. *Current Biology*, 2012. 20(22): p. 966-980.
44. Lodish, H., et al., *Molecular Cell Biology*. 2016: W. H. Freeman. ISBN: 0716776014
45. Mogilner, A. and E. Craig, *Towards a quantitative understanding of mitotic spindle assembly and mechanics*. *Journal of Cell Science*, 2010. 123(20): p. 3435-3445.
46. Rieder, C.L., et al., *Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle*. *J Cell Biol*, 1994. 127(5): p. 1301-10.
47. Jemaa, M., et al., *Characterization of novel MPS1 inhibitors with preclinical anticancer activity*. *Cell Death Differ*, 2013. 20(11): p. 1532-45.
48. Tannous, B.A., et al., *Effects of the selective MPS1 inhibitor MPS1-IN-3 on glioblastoma sensitivity to antimitotic drugs*. *J Natl Cancer Inst*, 2013. 105(17): p. 1322-31.
49. Davies, A.M., U. Weinberg, and Y. Palti, *Tumor treating fields: a new frontier in cancer therapy*. *Ann N Y Acad Sci*, 2013. 1291: p. 86-95.
50. Branter, J., et al., *Tumour treating fields in a combinational therapeutic approach*. *Oncotarget*, 2018. 9(93): p. 36631-36644.
51. Gera, N., et al., *Tumor treating fields perturb the localization of septins and cause aberrant mitotic exit*. *PLoS One*, 2015. 10(5): p. e0125269.
52. Tatsumoto, T., et al., *Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis*. *J Cell Biol*, 1999. 147(5): p. 921-8.
53. Kinoshita, M., et al., *Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins*. *Dev Cell*, 2002. 3(6): p. 791-802.
54. Estey, M.P., et al., *Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission*. *J Cell Biol*, 2010. 191(4): p. 741-9.
55. Norman, L.L., et al., *Cell blebbing and membrane area homeostasis in spreading and retracting cells*. *Biophys J*, 2010. 99(6): p. 1726-33.
56. Frömbling, G.E., *Verstärkung der Wirkung von TTFelds durch Inhibition des mitotischen Spindelkontrollpunktes*. In press, *Neurochirurgische Klinik und Poliklinik*. 2019, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg.

57. Porat, Y., et al., *Determining the Optimal Inhibitory Frequency for Cancerous Cells Using Tumor Treating Fields (TTFields)*. J Vis Exp, 2017(123).
58. Hahn, M., *Die Wirkung von TTFields auf Glioblastomzellen in Kombination mit dem Inhibitor des mitotischen Kontrollpunktes MPS-IN3-3 und dem Therapeutikum Vincristin*. In press, *Neurochirurgische Klinik und Poliklinik*. 2019, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg.
59. Kessler, A.F., et al., *Effects of tumor treating fields (TTFields) on glioblastoma cells are augmented by mitotic checkpoint inhibition*. Cell Death Discov, 2018. 4: p. 12.
60. Murphy R.F., Basic flow cytometry theory. Flow cytometry talks. Purdue University Cytometry Laboratories. 2006. [cited 2020, 4 Apr]; Available from: <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.htm>.
61. Touat, M., et al., *Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights*. Ann Oncol, 2017. 28(7): p. 1457-1472.
62. Kirson, E.D., et al., *Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields*. Cancer Res, 2004. 64(9): p. 3288-95.
63. Giladi, M., et al., *Alternating electric fields (tumor-treating fields therapy) can improve chemotherapy treatment efficacy in non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo*. Semin Oncol, 2014. 41 Suppl 6: p. S35-41.
64. Giladi, M., et al., *Mitotic Spindle Disruption by Alternating Electric Fields Leads to Improper Chromosome Segregation and Mitotic Catastrophe in Cancer Cells*. Sci Rep, 2015. 5: p. 18046.
65. Kirson, E.D., et al., *Chemotherapeutic treatment efficacy and sensitivity are increased by adjuvant alternating electric fields (TTFields)*. BMC Med Phys, 2009. 9: p. 1.
66. Mun, E.J., et al., *Tumor-Treating Fields: A Fourth Modality in Cancer Treatment*. Clin Cancer Res, 2018. 24(2): p. 266-275.
67. Zhu, P. and J.J. Zhu, *Tumor treating fields: a novel and effective therapy for glioblastoma: mechanism, efficacy, safety and future perspectives*. Chin Clin Oncol, 2017. 6(4): p. 41.
68. Jutras, G., et al., *Procarbazine, lomustine and vincristine toxicity in low-grade gliomas*. Curr Oncol, 2018. 25(1): p. e33-e39.
69. Joglekar, A.P., *A Cell Biological Perspective on Past, Present and Future Investigations of the Spindle Assembly Checkpoint*. Biology (Basel), 2016. 5(4).
70. Matson, D.R. and P.T. Stukenberg, *Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways*. Mol Interv, 2011. 11(2): p. 141-50.
71. Roninson, I.B., *Tumor cell senescence, mitotic catastrophes, and their consequences*. Cancer Research, 2005. 65(9 Supplement): p. 1470-1470.
72. Narita, M. and S.W. Lowe, *Senescence comes of age*. Nat Med, 2005. 11(9): p. 920-2.
73. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(20): p. 9363-7.
74. Cucullo, L., et al., *Very low intensity alternating current decreases cell proliferation*. Glia, 2005. 51(1): p. 65-72.
75. Giladi, M., et al., *Microbial growth inhibition by alternating electric fields*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. 52(10): p. 3517-22.

76. Maure, J.F., E. Kitamura, and T.U. Tanaka, *Mps1 kinase promotes sister-kinetochore bi-orientation by a tension-dependent mechanism*. *Curr Biol*, 2007. 17(24): p. 2175-82.
77. Plesca, D., et al., *DNA damage response and apoptosis*. *Methods Enzymol*, 2008. 446: p. 107-22.
78. Kajstura, M., et al., *Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms*. *Cytometry A*, 2007. 71(3): p. 125-31.
79. Wenger, C., et al., *Modeling Tumor Treating Fields (TTFields) application in single cells during metaphase and telophase*. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2015. 2015: p. 6892-5.
80. Neuhaus, E., et al., *Alternating Electric Fields (TTFields) Activate Cav1.2 Channels in Human Glioblastoma Cells*. *Cancers (Basel)*, 2019. 11(1).
81. Singh, S.S., et al., *Comparison of ACINUS, caspase-3, and TUNEL as apoptotic markers in determination of tumor growth rates of clinically localized prostate cancer using image analysis*. *Prostate*, 2009. 69(15): p. 1603-1610.
82. Murphy, J., et al., *Optune(R): Practical Nursing Applications*. *Clin J Oncol Nurs*, 2016. 20(5 Suppl): p. S14-9.
83. Kesari, S., et al., *Tumor-treating fields plus chemotherapy versus chemotherapy alone for glioblastoma at first recurrence: a post hoc analysis of the EF-14 trial*. *CNS Oncol*, 2017.
84. Eder, J.P., et al., *422P First-in-human study of the monopolar spindle 1 (Mps1) kinase inhibitor BAY 1161909 in combination with paclitaxel in subjects with advanced malignancies*. *Annals of Oncology*, 2018. 29(suppl_8).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der primären Tumoren des ZNS.....	- 1 -
Abbildung 2: Verteilung der primär malignen Tumoren des ZNS	- 2 -
Abbildung 3: Applikation der Arrays auf der Kopfhaut	- 12 -
Abbildung 4: Zellzyklusphasen	- 15 -
Abbildung 5: Der mitotische Spindelkontrollpunkt	- 16 -
Abbildung 6: Mögliche Bindungsarten von Spindelfasern an Schwester-Kinetochore.....	- 18 -
Abbildung 7: Darstellung einzelner Teilchen in einem elektrischen Feld	- 21 -
Abbildung 8: Darstellung eines Dipols in einem inhomogenen elektrischen Wechselfeld	- 22 -
Abbildung 9: Veranschaulichung des Time Course und End of Treatment Experiment	- 32 -
Abbildung 10: End of Treatment Experiment	- 33 -
Abbildung 11: Inovitro® Laboratory Research System	- 34 -
Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Versuches mit allen Ansätzen.....	- 38 -
Abbildung 13: Zellzählgerät Scepter 2.1	- 39 -
Abbildung 14: FACS Canto II.....	- 41 -
Abbildung 15: Zellzyklus-Analyse	- 43 -
Abbildung 16: Zellpopulation im Annexin V Assay	- 45 -
Abbildung 17: Relative Zellzahl von U-87MG Zellen im Vergleich zu der Medium-Kontrolle	- 50 -
Abbildung 18: Zellzahlanalyse von U-87MG im Zeitverlauf (A: 24 h, B: 48 h, C: 72 h)	- 51 -
Abbildung 19: Änderung der Zellzahl der Zelllinie U87MG nach 72 h im Vergleich zu t0	- 52 -
Abbildung 20: Zellzahlanalyse von GaMG im Zeitverlauf (A: 24 h, B: 48 h, C: 72 h).....	- 53 -
Abbildung 21: Änderung der Zellzahl der Zelllinie GaMG nach 72 h im Vergleich zu t0	- 53 -
Abbildung 22: End of treatment Experiment	- 54 -
Abbildung 23: Zellzahlen von U87MG Zellen 72 h nach Ende der 72 stündigen Erstbehandlung -	55 -
Abbildung 24: Spindelfärbungen von GaMG Zellen nach 72 h Behandlungszeit	- 56 -
Abbildung 25: Zellen von U87MG in den unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen	- 57 -
Abbildung 26: Prozentsatz der U-87MG Zellpopulation, welche sich nach 72 h Behandlung in der G1-Phase (A) und der G2-Phase (B) befand	- 58 -
Abbildung 27: Exemplarische Messreihe der U-87MG Zellen im Annexin-Assay	- 60 -
Abbildung 28: Relative Fluoreszenzintensität im TUNEL Assay von U87MG nach 72 h.....	- 61 -

Für die Verwendung der Vorlagen für alle modifizierten Abbildungen wurde die Genehmigung eingeholt.

Abkürzungsverzeichnis

APC/C	Anaphase promoting complex/ cyclosome
AZ	AZ 3146
BE	Behandlungsende
PBS	Phosphate buffered saline
Bub	Budding-uninhibited-by- benzimidazole
BubR	Budding-uninhibited-by- benzimidazole-related
Cdc20	cell-division-cofactor 20
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eot	End of treatment
FSC	Forward scatter
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GBM	Glioblastoma multiforme
GEF	guanine nucleotide exchange factor
IDH	Isocitratdehydrogenase
IN-3	MPS1-IN-3
KP	Kontrollpunkt
KT	Kinetochor

Mad	Mitotic-arrest-deficient
MCC	Mitotic checkpoint complex
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
M-Phase	Mitose-Phase
MPS1	monopolar-spindle-1
MRT	Magnetresonanztomographie
MT	Mikrotubuli
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonukleinsäure
SAC	Spindle assembly checkpoint
S-Phase	Synthese-Phase
SSC	Side scatter
ST	Strahlentherapie
TMZ	Temozolomid
TTFields	Tumor Treating Fields
TUNEL	Terminal deoxyribonucleotidyl-transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling
USA	United States of America
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf-Ingo Ernestus und Herrn Priv.-Doz. Dr. Carsten Hagemann für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas im Tumorbiologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg bedanken. Herrn Hagemann gebührt auch herzlichen Dank für die stetigen Anregungen und Verbesserungen der Laborarbeit, den Manuskripten und Vorträgen. Außerdem gilt mein besonderer Dank Dr. med. Almuth Keßler als meine Betreuerin, die sich nicht vor früh-morgendlichen Besprechungsterminen scheute und deren Gespräche nicht nur lehrreich für die Forschung waren. Auch den anderen Mitgliedern des Tumorbiologischen Labors möchte ich danken, vor allem Siglinde Kühnel und Elisabeth Karl, die mich in Zellkulturarbeiten und Labormethoden eingewiesen und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Dank gebührt selbstverständlich auch dem Gutachter der Zweitkorrektur Herrn Prof. Dr. Matthias Eyrich. Schließlich möchte ich mich auch bei Novocure™ für die Bereitstellung der Geräte und die stetige Hilfsbereitschaft zur Sichtung von Fehlerquellen bedanken.

Die durchflusszytometrischen Daten wurden am BD FACS Canto 2.0 erhoben, welche wir in enger Zusammenarbeit mit der Strahlentherapie Würzburg unter Leitung von Frau Prof. Dr. Tcholpon Djuzenova durchführen konnten. Für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung von Vanessa Fiedler soll hier gedankt werden.

Danken möchte ich auch den beiden Erstlesern dieser Arbeit, meinem Freund Philipp Schrüfer und meinem Studienfreund Thomas Siedler für das bereitgestellte Fachwissen und das Korrekturlesen des dermatologischen und des physikalischen Abschnitts. Meinem Freund Philipp möchte ich außerdem für die Motivation und Unterstützung für unzählige Wochenendarbeiten danken.

Schließlich gebührt meinen Eltern Carmen und Johann Gross mein allerherzlichster Dank für die uneingeschränkte, bedingungslose und tatkräftige Unterstützung während meines Studiums und der Erstellung dieser Doktorarbeit. Ihr habt mich immer, in allen Hoch- und auch Tiefphasen während der Laborarbeit, den zahlreichen Bibliothek-Gängen und natürlich in allen Prüfungen begleitet und unterstützt. Ohne euch wäre eine solche Forschungsarbeit nicht möglich gewesen – Danke!

Schriftenverzeichnis (Auszug)

Artikel

Effects of tumor treating fields (TTFields) on glioblastoma cells are augmented by mitotic checkpoint inhibition.

Almuth F. Kessler, Greta E. Frömbling, Franziska Gross, Mirja Hahn, Wilfrid Dzokou, Ralf-Ingo Ernestus, Mario Löhr, Carsten Hagemann, J. Cell Death Discovery volume 4, Article number: 77 (2018)

Vortrag

Augmentation of the Tumor-Treating-Fields effect on glioblastoma cells by inhibition of the mitotic checkpoint kinase MPS-1

Franziska Gross, Sektionstagung Neuroonkologie der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, 21.10.2016, Düsseldorf.

Postervorträge

Tumor-treating fields (TTFields) effects on glioblastoma cells are augmented by mitotic checkpoint inhibition

Almuth F. Kessler, Greta E. Frömbling, Franziska Gross, Mirja Hahn, Wilfrid Dzokou, Ralf-Ingo Ernestus, Mario Löhr, Carsten Hagemann. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018; 2018 Apr 14-18; Chicago, IL. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2018;78(13 Suppl):Abstract nr 1860.

Augmentation of Tumor Treating Fields (TTFields) effects on Glioblastoma cells by mitotic checkpoint inhibition

Almuth F. Kessler, Franziska Gross, Mirja Hahn, Thomas Linsenmann Ralf-Ingo Ernestus, Mario Löhr, Carsten Hagemann M0359; 68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), 7. Joint Meeting mit der Society of British Neurological Surgeons (SBNS); Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie; Society of British Neurological Surgeons; Magdeburg; 20170514-20170517; MI.04 Tumor 11