

**Experimentelle Wachstumshemmung von humanen
Glioblastomzellen durch TERT-Inhibitor Eribulin in
Kombination mit Tumor Treating Fields**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Piet Erik Beusker
aus Oelde

Gießen, 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Neuroonkologisches Zentrum

Gutachter: Prof. Dr. med. Marco Stein, MHBA

Gutachter: Prof. Dr. med. Till Acker

Tag der Disputation: 26. März 2024

Für meine Eltern.

*Alle deutschsprachigen Universitäten haben sich zur **sprachlichen Gleichbehandlung** von Männern, Frauen und Menschen mit diverser Geschlechtsidentität verpflichtet. Als Teil der universitären Gemeinschaft ist es auch dem Autor der vorliegenden Dissertationsschrift ein **wichtiges Anliegen**, **geschlechtergerecht** zu formulieren und **niemanden zu diskriminieren**.*

*Um einen **konstruktiven Lesefluss** zu schaffen und die **Komplexität** langer Sätze geringer zu halten, wird bei **Personenbezeichnungen** und **personenbezogenen** Hauptwörtern in der vorliegenden Dissertationsschrift das **generische Maskulinum** verwendet. Entsprechende Begriffe gelten im Sinne der **Gleichbehandlung** grundsätzlich und zu jeder Zeit für **alle Menschen und Geschlechter**.*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Problemdarstellung	1
1.2 Das humane Glioblastom	2
1.2.1 Epidemiologie	2
1.2.2 Einteilung	2
1.2.3 Molekulargenetik	4
1.2.4 Das Therapieprinzip: ein multimodaler palliativer Ansatz	7
1.2.5 Das humane Gliosarkom	11
1.3 Das TERT-Protein und seine Rolle im Tumorzellzyklus 	12
1.3.1 Kanonische Funktionen	12
1.3.2 Regulation der Genexpression und Rolle in entarteten Zellen	13
1.3.3 Telomerase als therapeutisches Target	14
1.3.4 Nicht-kanonische Funktionen	14
1.4 TERT-Inhibitor Eribulin und sein antiproliferatives Potenzial	16
1.4.1 Herkunft und Anwendung	16
1.4.2 Eribulin als TERT-Inhibitor	18
1.4.3 Eribulin als Spindelgift	20

1.4.4 Eribulin im Glioblastom: Aktuelle Studien.....	22
1.5 Tumor Treating Fields: neue Wege in der Glioblastomtherapie.....	24
1.5.1 Therapieidee	24
1.5.2 Theoretischer Hintergrund und Wirkmechanismen	25
1.5.3 Anwendung	25
1.5.4 Kombinationsbehandlungen mit TTFields im Glioblastom: Aktuelle Studien	27
1.6 Zielsetzung.....	30
2 Material und Methoden	34
2.1 Material	34
2.1.1 Geräte	34
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	36
2.1.3 Chemikalien.....	39
2.1.4 Zellkultur.....	40
2.1.5 Inhibitoren und Farbstoffe	41
2.2 Methoden.....	42
2.2.1 Zellkultur.....	42
2.2.2 Untersuchtes Patientenkollektiv	43
2.2.3 MTT-Assay	46
2.2.4 Experimentelle Glioblastomtherapie im inovitro™-System	48
2.2.5 Zellzählung	51

2.2.6 Clonogenic Assay.....	52
2.2.7 Fluorescence-activated cell sorting (FACS).....	54
2.2.8 Interaktionsanalyse	56
2.2.9 Statistische Auswertung	58
3 Ergebnisse	61
3.1 Patientenkollektiv	61
3.2 Die Auswirkungen von Eribulin auf humane Glioblastomzellen.....	61
3.2.1 Vorbemerkung.....	61
3.2.2 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen	62
3.2.3 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Astrozyten	64
3.2.4 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen abhängig von der Applikationsdauer..	65
3.2.5 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen abhängig vom TERT-Promotor-Mutationsstatus.....	66
3.2.6 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen abhängig vom MGMT-Promotor-Methylierungsstatus	67
3.2.7 Eribulin erreicht ein vollständiges Ansprechen in humanen Glioblastom-Zelllinien	68

3.2.8 Eribulin senkt die klonogene Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen	70
3.2.9 Eribulin steigert die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen	71
3.3 Die Auswirkungen von TTFields auf humane Glioblastomzellen.....	72
3.3.1 TTFields senken die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen	72
3.3.2 TTFields senken die klonogene Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen	73
3.3.3 TTFields steigern die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen	74
3.4 Die Wirksamkeit von Eribulin in Kombination mit TTFields in humanen Glioblastomzellen.....	75
3.4.1 Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen.....	75
3.4.2 Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen mit Tendenz zur Abhängigkeit von der Verdopplungszeit.....	76
3.4.3 Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die klonogene Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen in Abhängigkeit von der Zelllinie	78

3.4.4 Die Kombination von Eribulin und TTFields steigert die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen.....	79
3.4.5 Eribulin und TTFields zeigen additive sowie unteradditive Kombinationseffekte in humanen Glioblastomzellen	80
3.5 Die Wirksamkeit von Eribulin und TTFields in humanen Gliosarkomzellen	82
3.5.1 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Gliosarkomzellen.....	82
3.5.2 TTFields senken die überlebende Zellfraktion in humanen Gliosarkomzellen	83
3.5.3 Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Gliosarkomzellen .	84
3.5.4 Eribulin und TTFields zeigen einen synergistischen Kombinationseffekt in humanen Gliosarkomzellen	85
3.6 Produkt-Moment-Korrelationen zwischen den erfassten Messgrößen	86
4 Diskussion	88
4.1 Fragestellung und Ziel der Arbeit	88
4.2 Material und Methoden	89
4.2.1 MTT-Assay	89
4.2.2 inovitro™-System	90
4.2.3 Zellzählung	92

4.2.4 Clonogenic Assay.....	93
4.2.5 FACS.....	95
4.2.6 Reagenzien	96
4.2.7 Interaktionsanalyse	96
4.3 Ergebnisse	99
4.3.1 Die Auswirkungen von Eribulin auf humane Glioblastomzellen	99
4.3.1.1 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen	99
4.3.1.2 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Astrozyten.....	100
4.3.1.3 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen abhängig vom TERT-Promotor-Mutationsstatus	101
4.3.1.4 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen abhängig vom MGMT-Promotor-Methylierungsstatus.....	104
4.3.1.5 Eribulin erreicht ein vollständiges Ansprechen in humanen Glioblastomzellen	107
4.3.1.6 Eribulin senkt die klonogene Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen	109
4.3.1.7 Eribulin steigert die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen.....	110

4.3.1.8	Abschließende Bewertung der experimentellen Ergebnisse in Bezug auf eine mögliche klinische Anwendung von Eribulin bei Patienten mit Glioblastom.....	112
4.3.2	Die Auswirkungen von TTFields auf humane Glioblastomzellen	113
4.3.2.1	TTFields senken die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen	113
4.3.2.2	TTFields senken die klonogene Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen.....	114
4.3.2.3	TTFields steigern die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen	115
4.3.3	Die Wirksamkeit von Eribulin in Kombination mit TTFields in humanen Glioblastomzellen	118
4.3.3.1	Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen	119
4.3.3.2	Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen mit Tendenz zur Abhängigkeit von der Verdopplungszeit	121
4.3.3.3	Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die klonogene Zellfraktion in humanen	

Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen	122
4.3.3.4 Die Kombination von Eribulin und TTFields steigert die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen	125
4.3.3.5 Eribulin und TTFields zeigen additive sowie unteradditive Kombinationseffekte in humanen Glioblastomzellen	126
4.3.3.6 Abschließende Bewertung der experimentellen Ergebnisse in Bezug auf eine mögliche klinische Anwendung der Kombinationsbehandlung bei Patienten mit Glioblastom.....	127
4.3.4 Die Wirksamkeit von Eribulin und TTFields in humanen Gliosarkomzellen.....	128
4.3.4.1 Eribulin hat antiproliferative Effekte auf humane Gliosarkomzellen	128
4.3.4.2 TTFields senken die überlebende Zellfraktion in humanen Gliosarkomzellen.....	130
4.3.4.3 Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Gliosarkomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen	130

4.3.4.4 Eribulin und TTFields zeigen einen synergistischen Kombinationseffekt in humanen Gliosarkomzellen	131
4.3.4.5 Abschließende Bewertung der experimentellen Ergebnisse in Bezug auf eine mögliche klinische Anwendung von Eribulin und TTFields bei Patienten mit Gliosarkom.....	131
4.3.5 Produkt-Moment-Korrelationen zwischen den erfassten Messgrößen.....	132
4.4 Zukunftsausblick und Implikationen	134
5 Zusammenfassungen.....	137
5.1 Zusammenfassung der Dissertation in deutscher Sprache	137
5.2 Summary of the dissertation in English language	139
6 Abbildungsverzeichnis	141
7 Tabellenverzeichnis	144
8 Abkürzungsverzeichnis	145
9 Literaturverzeichnis	147
10 Publikationsverzeichnis.....	164
10.1 Publierte Abstracts	164
10.2 Sonstige Vorträge und Poster	165
11 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation.....	167
12 Danksagung	169

1 Einleitung

1.1 Problemdarstellung

Das humane Glioblastom gehört zu den aggressivsten und tödlichsten Hirntumoren des Menschen. Die mediane Überlebenszeit beträgt ab Diagnosestellung etwa 8 Monate und es steht keine kurative Therapie zur Verfügung (Ostrom et al., 2021). Die palliativen Therapiekonzepte beziehen die Therapiemodalitäten der operativen Resektion, Chemotherapie sowie Strahlentherapie mit ein, dennoch sind diese heute nicht im Stande, eine vollständige Heilung zu erzielen. Dies liegt neben der intraparenchymalen Metastasierung des Tumors auch daran, dass derzeit keine pharmakologische Systemtherapie mit durchschlagendem Erfolg zur Verfügung steht. Die vorliegende Arbeit betrachtet daher einen neuen Therapieansatz mit der Substanz Eribulin. Hierbei handelt es sich um ein Spindelgift und Inhibitor des Proteins Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT). Zusätzlich soll dessen Kombination mit der modernen Therapiemodalität Tumor Treating Fields (TTFields) untersucht werden, zu welcher die Suche nach einer optimalen Partnersubstanz ins Zentrum der Aufmerksamkeit der experimentellen neuroonkologischen Forschung gerückt ist.

1.2 Das humane Glioblastom

1.2.1 Epidemiologie

Das Glioblastom ist mit einem Anteil von 49,1 % der häufigste maligne Hirntumor des Erwachsenenalters sowie mit einem Anteil von 58,4 % das häufigste Gliom des Menschen. Die Inzidenz beträgt etwa 3,23 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner pro Jahr, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen. Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei etwa 65 Jahren. (Ostrom et al., 2021) Diese Daten verdeutlichen die Relevanz der Forschung zur Verbesserung der Glioblastomtherapie.

1.2.2 Einteilung

Hirntumoren werden nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) 2021 eingeteilt. Hierbei werden nur noch Tumoren, die sich histologisch als diffuses Gliom darstellen, als Glioblastome bezeichnet, sofern sie einen Wildtyp im Gen Isocitratdehydrogenase 1 (IDH1) mit erhaltener nukleärer Expression des Alpha-Thalassämie-Retardierungssyndrom-X-Genproduktes (ATRX) aufweisen und zusätzlich entweder die histologischen Kriterien charakteristischer Nekrosen oder Gefäßproliferaten oder die molekularen Kriterien einer TERT-Promotor-Mutation, einer Amplifikation im Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Gen oder eines Chromosom 7-Zugewinns beziehungsweise eines Chromosom 10-Verlustes erfüllen. Befindet sich der Tumor jedoch in der Mittellinie und liegen zusätzlich charakteristische molekulare

Veränderungen des sogenannten H3-K27-Gens vor, so wird die Entität als „Diffuses Mittelliniengliom, H3-K27-alteriert, ZNS-WHO-Grad 4“ bezeichnet. Ist bei vorliegendem IDH1-Wildtyp die nukleäre ATRX-Expression nicht mehr nachweisbar und sind zusätzlich molekulare Kriterien wie eine sogenannte G34R/V-Mutation des Histon H3-Gens erfüllt, so wird von einem „Diffusen hemisphärischen Gliom, H3-G34-mutiert, ZNS-WHO-Grad 4“ gesprochen. (Louis et al., 2021)

Liegt eine IDH1-Mutation gepaart mit den histologischen Kriterien charakteristischer Nekrosen oder Gefäßproliferaten vor, so wird seit 2021 nicht mehr von dem ehemals so bezeichneten „sekundären Glioblastom“, sondern von einem „Astrozytom, IDH-mutiert, ZNS-WHO-Grad 4“ gesprochen. (Louis et al., 2021)

Am Glioblastom erkranken vermehrt männliche Patienten mit einem medianen Alter bei Diagnosestellung von 62 Jahren. Die mediane Überlebenszeit unter Ausschöpfung aller therapeutischen Möglichkeiten beträgt etwa 15 Monate. Die ehemals als „sekundäres Glioblastom“ bezeichnete, heute „Astrozytom, IDH-mutiert, ZNS-WHO-Grad 4“ genannte Entität kommt deutlich seltener vor und weist ein jüngeres medianes Erkrankungsalter sowie eine bessere Prognose auf. (Louis et al., 2016) An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit dem Glioblastom, IDH1-Wildtyp, ZNS-WHO-Grad 4 beschäftigt.

1.2.3 Molekulargenetik

Heutzutage spielt eine Vielzahl von molekulargenetischen Markern eine entscheidende Rolle für die Tumorklassifikation, Therapieplanung und Prognose. Im Folgenden werden nur die drei für diese Arbeit relevanten Marker und Veränderungen vorgestellt.

Zur Klassifikation der Glioblastome wird zunächst der IDH1-Mutationsstatus bestimmt. Wie bereits oben erläutert weisen Glioblastome hier per definitionem eine Wildtypsequenz auf (Louis et al., 2021).

Der Marker mit der höchsten Relevanz für die Therapieplanung ist heute der sogenannte O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Promotor-Methylierungsstatus. Es handelt sich dabei um eine epigenetische Veränderung in der Promotorregion des MGMT-Gens, welches einen Bestandteil des körpereigenen Reparatursystems der Desoxyribonukleinsäure (DNA) bildet. Liegt eine Hypermethylierung Cytosin- und Guanin-reicher Sequenzen der Promotorregion, den sogenannten CpG-Inseln, vor, so ist die Expression dieses Gens vermindert und die Aktivität der MGMT in den Tumorzellen nimmt ab. Die genannte Veränderung liegt in etwa 40 % der Glioblastome vor und geht mit einer verbesserten Prognose einher. Ist der Promotor nicht methyliert, so weisen die Zellen eine physiologische Expression der MGMT auf. (Riede & Werner, 2017) Die Konsequenzen für die Planung der therapeutischen Maßnahmen werden in Kapitel 1.2.4 erklärt.

Der dritte vorzustellende und für diese Arbeit entscheidende Marker ist der TERT-Promotor-Mutationsstatus. Es handelt sich um eine Substitutionsmutation in der Promotorregion, von der zwei relevante Varianten existieren. Der Cytosin-Thymin-Austausch an Position 228 Basenpaare (bp) (C228T) macht etwa 77,5 % der Alterationen aus. Die dazu analoge C250T-Variante, korrespondierend zur Position 146 bp, macht etwa 20,8 % aus (Killela et al., 2013). Alle anderen Mutationsvarianten verteilen sich laut derselben Studie auf die verbleibenden 1,7 % und werden daher in den für die vorliegende Arbeit genutzten Analysen des Instituts für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen nicht standardmäßig mit untersucht. Der TERT-Promotor-Mutationsstatus ist ebenfalls ein wichtiger prognostischer Marker, wie Yuan et al. in einer Metaanalyse von Studien, die den prädiktiven Wert des TERT-Promotor-Mutationsstatus in Bezug auf das Gesamtüberleben von Glioblastompatienten untersuchten, herausfanden (Yuan et al., 2016). Zudem konnten die Autoren ein erhöhtes Risiko für die Entstehung maligner Gliome feststellen, das mit dem Vorliegen von TERT-Genpolymorphismen verbunden war. Diese hohe prognostische Relevanz spiegelt sich schließlich auch in der Aufnahme des TERT-Promotor-Mutationsstatus als hinreichendes Klassifikationskriterium für Glioblastome in die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems 2021 wider.

Killela et al. untersuchten 1.230 Tumoren verschiedenster Entitäten und fanden eine TERT-Mutation in 83 % aller untersuchten adulten,

ehemals als primäre Glioblastome bezeichneten Tumoren wie in Abbildung 1 dargestellt. Keine andere Entität wies einen so hohen Anteil der Tumoren mit TERT-Mutation auf, beispielhaft seien die Anteile der TERT-mutierten Tumoren in Ovarialkarzinomen mit weniger als 17 %, in Astrozytomen mit weniger als 15 % und in Mamma-Karzinomen sogar mit 0 % genannt (Killela et al., 2013). Speziell sei noch auf die Gruppe der ehemals sekundären Glioblastome eingegangen. Diese wurden von Killela et al. in einer Gruppengröße von $n = 5$ untersucht und wiesen in keinem Fall eine TERT-Mutation auf. Dieser Umstand ist neben den vorgestellten epidemiologischen und prognostischen Aspekten mit dafür verantwortlich, dass sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit dem ehemals als primäres Glioblastom bezeichneten Tumor mit IDH1-Wildtyp-Sequenz beschäftigt.

Die Relevanz des TERT-Genprodukts in Bezug auf die in dieser Arbeit vorgenommene experimentelle Wachstumshemmung der Glioblastome wird in den Kapiteln 1.3 und 1.4 näher erläutert.

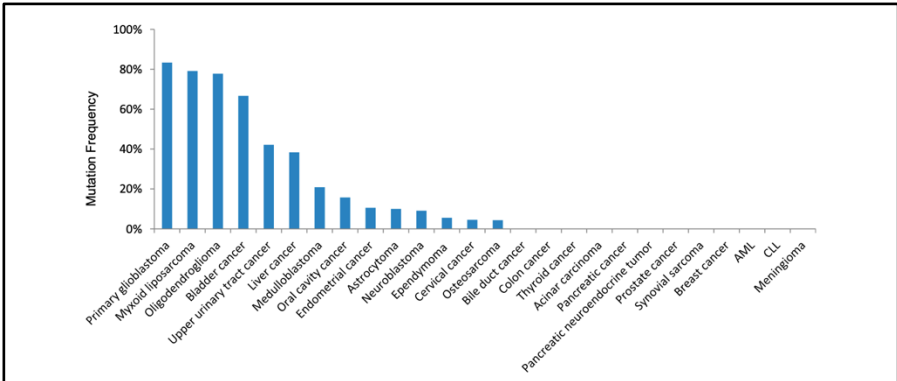


Abbildung 1: TERT-Mutationsfrequenz nach Tumorentitäten (Killela et al., 2013).

Die höchste Mutationsfrequenz im TERT-Promotor findet sich mit über 80 % im Glioblastom. Das Astrozytom hingegen weist etwa 15 % mutationstragende Tumoren auf und das Mammakarzinom zeigt nahezu keine mutationstragenden Tumoren.

1.2.4 Das Therapieprinzip: ein multimodaler palliativer Ansatz

Die Therapie des humanen Glioblastoms folgt immer einem palliativen Ansatz, denn eine vollständige und damit kurative Resektion ist in aller Regel nicht möglich (Hacke, 2016). Dies liegt daran, dass bei Diagnosestellung die Tumorzellen bereits viel tiefer in das Gehirn eingewachsen sind, als es makroskopisch und auch mit modernen bildgebenden Verfahren zu erkennen ist (Henker, 2019). Im Folgenden sollen die aktuell gültigen Therapieempfehlungen anhand der S2k-Leitlinie „Gliome“, herausgegeben von der Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie im Jahr 2021, erläutert werden.

Diese empfiehlt als Standardtherapie des Glioblastoms primär eine möglichst vollständige operative Entfernung oder eine Biopsie des Tumors sowie anschließend eine Strahlentherapie der erweiterten Tumorregion mit 60 Gy Zielvolumendosis und zusätzlicher Chemotherapie mit dem Alkylanz Temozolomid (TMZ), welche danach für weitere 6 Zyklen als Erhaltungstherapie fortgeführt wird. Für ältere beziehungsweise klinisch relevant eingeschränkte Patienten empfiehlt die Leitlinie eine fakultative Anpassung der Therapie in Form einer Hypofraktionierung der Radiotherapie sowie einer Ausweitung der erhaltenden Chemotherapie auf bis zu 12 Zyklen. Die Leitlinie empfiehlt im Anschluss an eine erfolgreiche Radiotherapie die Möglichkeit einer Behandlung mit elektrischen Wechselfeldern, auf die in dieser Arbeit in Kapitel 1.5 ausführlich eingegangen wird, individuell mit den Patienten zu diskutieren. Die Leitlinie weist in Bezug auf den MGMT-Promotor-Methylierungsstatus darauf hin, dass sowohl der Verzicht auf Temozolomid bei nicht methyliertem MGMT-Promotor als auch die Hinzunahme des ebenfalls alkylierenden Lomustin bei methyliertem MGMT-Promotor individuell diskutiert werden sollen und derartige Anpassungen der Therapie kein Standardvorgehen darstellen. (Wick et al., 2021)

Die Entscheidung zwischen einer möglichst vollständigen Resektion und einer Biopsie des Tumors sollte laut Aksu et al. anhand der Einschätzung getroffen werden, ob durch eine vollständige Resektion eine Verbesserung der Symptomatik des Patienten und keine weiteren neurologischen Defizite durch die operativen Maßnahmen

zu erwarten sind (Aksu et al., 2018). Präoperativ kann dem Patienten eine Lösung von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) oral verabreicht werden, um das Unterscheidungsvermögen zwischen zu entfernendem Tumorgewebe und funktionellem gesunden Gewebe zu verbessern (Stummer et al., 2008). Durch die Umwandlung von den metabolisch aktiven Glioblastomzellen kommt die Tumormasse intraoperativ beim Blick durch das filterversehene Mikroskop rötlich fluoreszierend zur Darstellung. Die Entscheidung zur Verwendung dieser Technik obliegt dem jeweiligen Zentrum. Im neuroonkologischen Zentrum des Universitätsklinikums Gießen und Marburg wird die Färbung der Tumorzellen mit 5-ALA bei allen Operationen von Patienten mit Gliomen durchgeführt. Bei Tumorlokalisationen in der Nähe von eloquenten Arealen kann darüber hinaus im Wach-Setting mit intraoperativem Mapping operiert werden, um die Operationssicherheit zu erhöhen (Aksu et al., 2018). Ist aufgrund des durch die Operation zu erwartenden neurologischen Defizits keine radikale Resektion möglich, kann eine erweiterte, offene Biopsie mit Tumorverkleinerung sinnvoll sein (Hacke, 2016).

In Bezug auf die Anwendung von Temozolomid muss auf die Einschränkung hingewiesen werden, dass dieses als alkylierendes Zytostatikum aus der Gruppe der Hydrazine bei nicht-methyliertem MGMT-Promotor nicht sinnvoll sein kann, da das zum körpereigenen DNA-Reparatursystem gehörende Enzym MGMT die durch Temozolomid bewirkte Methylierung der Guanine wieder aufhebt (Yu

et al., 2020). Laut den Autoren bleibe die DNA der Tumorzellen bei Patienten mit negativem MGMT-Promotor-Methylierungsstatus sehr viel stabiler und die Wirkung des therapeutischen Alkylans sei stark herabgesetzt. Dem gegenüber stehen in der Nutzen-Risiko-Abwägung die emetogenen und myelotoxischen Nebenwirkungen von Temozolomid, sodass dessen Entfernung aus dem Therapieregime bei herabgesetzter Wirkung durch das MGMT-Enzym individuell diskutiert werden muss (Wick et al., 2021). Für neuere Systemtherapeutika wie Tyrosinkinaseinhibitoren, Angiogeneseinhibitoren oder Immuntherapeutika konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt kein Nutzen für das Gesamtüberleben nachgewiesen werden, wie ein Review von Touat et al. sowie eine Metaanalyse von Wang et al. zu modernen, zielgerichteten Therapieverfahren bei Patienten mit Glioblastom gezeigt haben (Touat et al., 2017; W. L. Wang et al., 2019). Touat et al. führen dies insbesondere auf die Pharmakokinetik der Substanzen in Bezug auf die Blut-Hirn-Schranke zurück. Diese sei in Glioblastomen zumeist zwar universell gestört, jedoch nicht notwendigerweise in infiltrativen, nicht anreichernden Bereichen des Tumors. Dieses heterogene Setting in Bezug auf die Blut-Hirn-Schranke erfordere spezielle Substanzen, die eine hohe ZNS-Penetration aufweisen. (Touat et al., 2017)

Aus diesem Grund stellt Temozolomid seit 2005 den Standard der Systemtherapie des Glioblastoms dar. In Kapitel 1.4 wird unter anderem auf die Erfüllung dieser Eigenschaft durch die Substanz

Eribulin eingegangen, welche den Hauptgegenstand dieser Arbeit darstellt.

1.2.5 Das humane Gliosarkom

Das humane Gliosarkom definiert sich über das zusätzliche Vorliegen einer mesenchymalen Zelldifferenzierung neben der hochmalignen astrozytären Komponente des Glioblastoms (Actor et al., 2002). In der Literatur wird das Gliosarkom daher zumeist als Variante des Glioblastoms und nicht als eigenständige Tumorentität gesehen. Dabei geht man davon aus, dass beide histopathologischen Anteile einen gemeinsamen monoklonalen Ursprung haben, der in einer hochmalignen astrozytären Differenzierung zu proliferieren beginnt und im Verlauf mesenchymale Aberrationen entwickelt (Reis et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die genomischen Veränderungen bei Gliosarkomen denen der Glioblastome bis auf das Fehlen einer EGFR-Überexpression sehr ähnlich sind und insgesamt eine höhere genomische Stabilität bei Gliosarkomen vorliegt (Reis et al., 2000).

Die WHO teilt das Gliosarkom ebenfalls den hochmalignen Gliomen vom Grad IV zu. Diese seltene Neoplasie kommt etwa einmal unter 50 Glioblastomen vor und weist eine Häufung des Auftretens im Temporallappen auf. Von den Autoren wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Gliosarkom und Glioblastom in Bezug auf Alter, Geschlecht, Ethnie, Tumorgroße festgestellt. Die klinischen Erscheinungen sowie die diagnostischen und therapeutischen Prinzipien entsprachen in der obigen Studie denen des Glioblastoms.

Die Prognose erscheint für Patienten mit Gliosarkomen jedoch etwas schlechter als beim Glioblastom. (Kozak et al., 2009)

Insgesamt weisen Glioblastom und Gliosarkom auf allen Ebenen viele Gemeinsamkeiten auf und unterliegen ähnlichen Schwierigkeiten in der Therapie. Aus diesem Grund sollen in der vorliegenden Arbeit die am Glioblastom durchgeführten Untersuchungen erstmals auch an humanen Gliosarkomzellen durchgeführt werden.

1.3 Das TERT-Protein und seine Rolle im Tumorzellzyklus

1.3.1 Kanonische Funktionen

Das TERT-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 5 lokalisiert und bildet zusammen mit der Telomerase-Ribonukleinsäure-Komponente (TERC), welche als Vorlage aus Ribonukleinsäure (RNA) für die zu synthetisierende DNA dient, das Enzym Telomerase. Hierbei handelt es sich um ein Enzym des Zellkerns, welches unter physiologischen Bedingungen als RNA-abhängige-DNA-Polymerase für die Verlängerung der Chromosomenenden, den Telomeren, in Stammzellen verantwortlich ist. Hierzu verlängert die katalytische Untereinheit TERT das Telomer mit Thymin-, Adenin- und Guanin-haltigen Nukleotiden der Sequenz TTAGGG, welche der komplementären Sequenz zur TERC-RNA-Vorlage entspricht. In somatischen Zellen ist das Gen für gewöhnlich stillgelegt, sodass mit der Zeit eine kontinuierliche

Verkürzung der Telomere einsetzt. Die Funktion des TERT-Proteins als Enzym der Telomerverlängerung bezeichnet man auch als kanonische oder klassische Funktion. (Ćukušić et al., 2009)

1.3.2 Regulation der Genexpression und Rolle in entarteten Zellen

Von pathologischem Interesse ist das Gen deswegen, weil eine maligne Entartung von Zellen häufig mit einer Überexpression des TERT-Gens verbunden ist, wodurch potenziell eine Immortalisierung herbeigeführt werden kann. Nicht entartete, somatische Zellen können aufgrund der Telomerverkürzung nur eine begrenzte Zahl an Zellteilungen durchlaufen, bis eine kritische Telomerlänge erreicht ist und der programmierte Zelltod eingeleitet wird. Dieses Phänomen bezeichnet man als „Hayflick-Grenze“ (Shay & Wright, 2000). Die Überaktivität der Telomerase mache es den Tumorzellen laut den Autoren möglich, diese Grenze nicht zu überschreiten und als immortalisierte Population ungehindert zu proliferieren. Über alle Entitäten hinweg findet sich in etwa 90 % der Tumoren eine Überexpression des TERT-Gens, welches die schnelle Proliferation durch unzählige Zellteilungen erst möglich macht (Ćukušić et al., 2009).

Allerdings fanden Killela et al. über zahlreiche Entitäten hinweg nur eine Mutationsrate des TERT-Promotors von 18,8 %, die ebenfalls mit einer Erhöhung der Genexpression assoziiert ist (Killela et al., 2013). Diese Diskrepanz zwischen Mutationsfrequenz und Expressionserhöhung lässt sich dadurch erklären, dass eine erhöhte Expression nicht nur durch eine Promotormutation zu Stande

kommen kann. Diese kann auch durch Mutationen in regulativen Transkriptionsfaktorgenen wie MYC, Menin und weiteren) oder durch epigenetische, mutationsunabhängige Veränderungen wie einer Trimethylierung der Histonproteine H3K9 und H4K20 entstehen (Kyo et al., 2008; Marion et al., 2009).

1.3.3 Telomerase als therapeutisches Target

In vielen Ansätzen wurde versucht, das beschriebene System der Telomerverlängerung therapeutisch zu inhibieren, um dem Tumor sein Proliferationspotenzial zu nehmen. Zusätzlich verspricht diese therapeutische Idee ein geringes Ausmaß an Nebenwirkungen, da vitale, somatische Körperzellen TERT nicht exprimieren und somit von einer Therapie nicht beeinträchtigt würden. Man musste jedoch feststellen, dass die Zellen über ein zweites System zur Telomerverlängerung verfügen, das sogenannte Alternative lengthening of telomeres (ALT) (Cesare & Reddel, 2010). Dieses System basiert auf homologer Basenrekombination und macht die therapeutische Inhibition der Telomerase nahezu gänzlich unwirksam (Maida & Masutomi, 2015). In Kapitel 1.3.4 wird vorgestellt, inwiefern eine Inhibition der TERT-Funktionen auf eine andere Weise dennoch ein sinnvolles Target zur Tumorbekämpfung darstellen kann.

1.3.4 Nicht-kanonische Funktionen

Die nicht-kanonischen Funktionen des TERT-Proteins bestehen in vielerlei Wegen, den Zellzyklus und damit das Tumorstadium indirekt zu beeinflussen und zu kontrollieren. So verfügt TERT nicht

nur über die oben beschriebene RNA-abhängige-DNA-Polymerase-Aktivität, sondern auch über eine RNA-abhängige-RNA-Polymerase-Aktivität (RdRP) (Yamaguchi et al., 2014). Diese dient den Autoren zu Folge zur Herstellung von double-stranded-RNA (dsRNA), welche zu small-interfering-RNA (siRNA) umgebaut werden kann. Die siRNA wiederum ist im Rahmen des Gen-Silencings dazu in der Lage, sequenzabhängig eine spezifische Suppression bestimmter Transkripte vorzunehmen (Watanabe et al., 2008). Auf diese Weise ist das TERT-Protein in die gezielte An- und Ausschaltung proliferationsrelevanter Gene eingebunden, was ihm eine Schlüsselrolle im Tumorzellzyklus zuschreibt.

Des Weiteren kommt es zur Komplexbildung von TERT mit dem Protein des Brahma-related gene 1 (BRG1) und dem nukleären Guanosintriphosphat (GTP)-bindenden Protein Nukleostigmin zum sogenannten TERT-BRG1-Nukleostigmin-Komplex (TBN-Komplex) (Yamaguchi et al., 2014). Eine Überexpression dieses TBN-Komplexes führt wiederum zu einer erhöhten Kanzerogenität und fördert die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) sowie die Entstehung von Tumorstammzellen (Maida & Masutomi, 2015). Dieser richtungsgebende Einfluss auf die Tumorprogression verdeutlicht die hohe Relevanz des TERT-Proteins in Tumorzellen.

In jüngsten Untersuchungen der nicht-kanonischen Funktionen von TERT im Dictyostelium discoideum-Modell fanden Nassir et al., dass TERT-mutierte Organismen irreguläre Fruchtkörper von zu geringer

Größe formten. So zeigten sie erstmalig, dass TERT in den Schleimpilzen die Regulation des Größenwachstums eines Gewebes beeinflusst, welche eine entscheidende Rolle für die Proliferation von Krebszellen spielt (Nassir et al., 2019).

Die vorgestellten, nicht-kanonischen Funktionen von TERT üben einerseits evidenten Einfluss auf maligne Entartung und Proliferation aus und weisen andererseits eine hohe Spezifität für Krebszellen auf. Zudem liegt eine therapeutisch nutzbare TERT-Mutation im Hauptteil der Glioblastome vor, wie bereits in Kapitel 1.2.3 vorgestellt wurde. Aus diesen Gründen sollen die nicht-kanonischen Funktionen des TERT-Proteins im Folgenden in den Fokus der therapeutischen Überlegungen gerückt werden.

1.4 TERT-Inhibitor Eribulin und sein antiproliferatives Potenzial

1.4.1 Herkunft und Anwendung

Da sich die Inhibition der oben beschriebenen kanonischen Funktionen des TERT-Proteins als unwirksam zeigte, konzentriert sich diese Arbeit nun auf einen Inhibitor, der die nicht-kanonischen Funktionen des Zielproteins hemmen und damit die Tumorprogression vermindern soll.

Eribulin ist, wie in Abbildung 2 dargestellt, ein strukturell vereinfachtes, synthetisches Analogon des natürlich vorkommenden Halichondrin B, welches ein zytotoxischer Metabolit aus dem Meeresschwamm *Halichondria okadae* ist, der überwiegend an der

pazifischen Küste von Japan zu finden ist (Hirata, 1986). Bereits in den Achtzigerjahren konnte für Halichondrin B in vitro und in vivo im Mausmodell eine antitumoröse Wirkung gegenüber Melanomzellen und Leukämiezellen nachgewiesen werden (Hirata, 1986). Heute wird es in der Behandlung von Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Mammakarzinom eingesetzt, bei denen es in der Vorbehandlung mit Taxanen und Anthrazyklinen zu einer weiteren Progression der Erkrankung gekommen ist. In der Phase-III-Studie EMBRACE konnte mit Eribulin erstmalig für eine Substanz in Einzelbehandlung bei stark vorththerapierten Patienten mit Brustkrebs ein signifikanter Nutzen auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden (Twelves et al., 2010). Eine zweite zugelassene Anwendung besteht in der Behandlung des metastasierten, therapierefraktären Liposarkoms (Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2018). Die wichtigsten, häufig beschriebenen Nebenwirkungen von Eribulin, die mehr als ein Viertel der behandelten Patienten betreffen, sind Übelkeit, Erbrechen, Neutropenie, Anämie, Haarausfall, Fatigue, periphere Neuropathie und Obstipation (Bronson et al., 2011). Um dem Auftreten von Neutropenien vorzubeugen, können unterstützende Wachstumsfaktoren gegeben werden (Fujisawa et al., 2018). Eribulin wird nahezu nicht metabolisiert und hauptsächlich mit der Fäzes ausgeschieden (Bronson et al., 2011). Insgesamt wird Eribulin in der klinischen Anwendung jedoch als gut verträglich beschrieben (Fujisawa et al., 2018; Inoue et al., 2016).

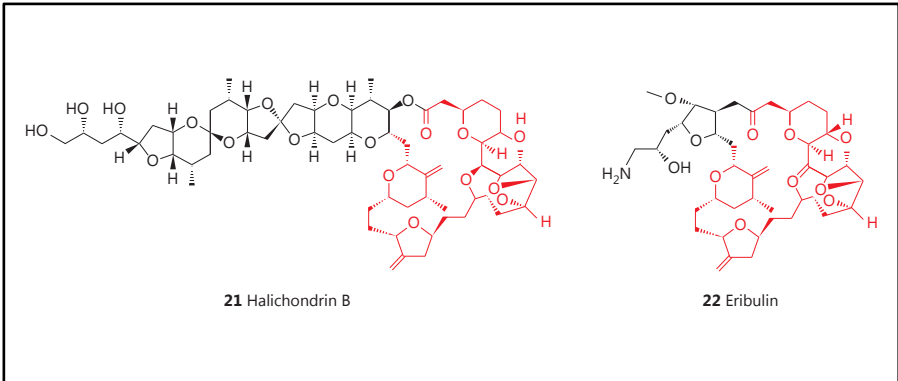


Abbildung 2: Eribulin als Abkömmling des natürlich vorkommenden Halichondrin B (Modifiziert nach Cragg & Pezzuto, 2016).

Die Abbildung zeigt die Ähnlichkeit des synthetisch hergestellten Eribulin mit dem natürlich vorkommenden Halichondrin B aus dem Meeresschwamm *Halichondria okadae* in den Strukturformeln. Es handelt sich bei den verwandten Stoffen um Polyether-Makrolide beziehungsweise makrozyklische Ketone.

1.4.2 Eribulin als TERT-Inhibitor

Yamaguchi et al. fanden im Vergleich von Eribulin-sensitiven Ovarialkarzinom-Zelllinien, die eine halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von weniger als 100 nM aufwiesen, mit Eribulin-resistenten Zelllinien, deren IC_{50} oberhalb von 100 nM lag, eine erhöhte TERT-Expression in den Eribulin-sensitiven Zelllinien. Sie konnten zeigen, dass eine Suppression der TERT-Genexpression in diesen Zelllinien zu einer verminderten antiproliferativen Wirkung von Eribulin führte. Es wurde ebenfalls die Expression des mit TERT assoziierten Proteins BRG1 gemessen, welches in Eribulin-sensitiven Zellen in einem erheblich höheren Ausmaß nachwiesen werden konnte. (Yamaguchi et al., 2014)

Darüber hinaus konnten Maida et al. mit Hilfe eines in vitro-RdRP-Assays zeigen, dass Eribulin ein direkter Inhibitor des TBN-Komplexes ist und damit dessen RdRP-Aktivität hemmt, wie Abbildung 3 zeigt. Bei den verwendeten Konzentrationen kam es nicht zu einer Inhibition der Telomeraseaktivität, was nahelegt, dass die antiproliferativen Effekte direkt auf die Inhibition der RdRP-Aktivität zurückzuführen sind. Die Wissenschaftler haben auch überprüft, ob Paclitaxel als klassisches Spindelgift ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die RdRP-Aktivität der TERT hat. Diese Hypothese konnte widerlegt werden, sodass der RdRP-inhibitorische Effekt als spezifisch für Eribulin unter den Spindelgiften angesehen werden kann. (Maida & Masutomi, 2015)

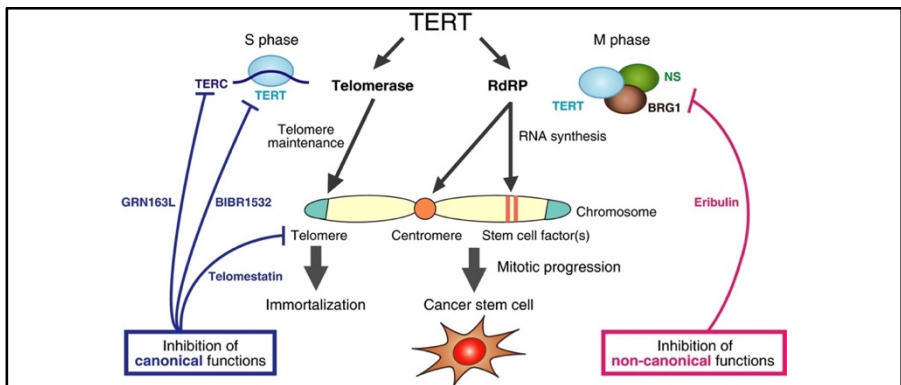


Abbildung 3: Funktionen des TERT-Proteins (Maida & Masutomi, 2015).

Das Schema zeigt den Angriffspunkt von Eribulin am TBN-Komplex, dessen Inhibition die nicht-kanonischen Funktionen des TERT-Proteins unterbindet. Die Telomerase-Aktivität bleibt von Eribulin unbeeinflusst.

Ein weiterer, TERT-unabhängiger Wirkmechanismus von Eribulin besteht in der gezielten Hemmung von Tumorstammzellen. So wurde in den Eribulin-sensitiven Zelllinien eine stärkere Fähigkeit zur Formung einer Sphärenmorphologie gefunden, welche als Charakteristikum von Tumorstammzellen angesehen wird. Bereits zuvor hatte man gesehen, dass Eribulin dazu in der Lage ist, den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition in Mammakarzinomzellen umzukehren und eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET) auszulösen. Diese Befunde sprechen dafür, dass Eribulin vor allem Tumorstammzellen angreift, da diese phänotypisch stark mit EMT-Markern assoziiert sind. Diese Eigenschaft ist günstig für eine antitumorale Therapie, da das Tumorwachstum in den treibenden Zellen unterbunden wird. (Yoshida et al., 2014)

1.4.3 Eribulin als Spindelgift

Bevor man jedoch zu diesen Erkenntnissen gelangte, war bereits bekannt, dass Eribulin auch auf eine andere Weise antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen ausübt. Es handelt sich bei Eribulin um ein Spindelgift, genauer ein nicht-Taxan-basiertes Zytostatikum, welches in das Mikrotubuli-System der Zelle eingreift.

Die klassischen krebstherapeutischen Spindelgifte greifen in dieses System auf zwei verschiedene Arten ein. Die Vinca-Alkaloide binden freies Tubulin und hemmen dadurch die Polymerisation mit den bestehenden Tubuli. Der Spindelapparat kann sich nicht aufbauen und wird durch spontane Hydrolyse zerstört. Die Taxane hingegen

binden GTP-gebundenes β -Tubulin am Mikrotubulus und hemmen dadurch die Depolymerisation, was den physiologischen Zustand der sogenannten dynamischen Instabilität stört. Beide Spindelgifte führen zum Stillstand der Mitose in der Metaphase der Mitose. (Smith et al., 2010)

Eribulin bindet, ähnlich wie die Vinca-Alkaloide, die Plus-Enden der Mikrotubuli mit hoher Affinität und verhindert deren Längenwachstum (Smith et al., 2010). Obwohl Eribulin dieselbe Bindestelle am Tubulin wie Vinblastin nutzt, unterscheidet sich der Wirkmechanismus jedoch grundlegend darin, dass Eribulin im Gegensatz zu Vinblastin keinen Einfluss auf die Mikrotubuliverkürzung nimmt (Jordan et al., 2005). Es handelt sich somit um einen reinen Mikrotubuli-Polymerisationsinhibitor, was Eribulin im Spektrum der Mitosehemmstoffe einzigartig macht. Hierdurch wird zum einen die dynamische Instabilität gestört und zum anderen kommt es zur Sequestration der Tubulinmoleküle in unproduktive Aggregate und wiederum zum irreversiblen Zellzyklusarrest in der G2M-Phase (Towle et al., 2001). In der Endstrecke kommt es zu einer Inhibition des zentralen antiapoptotischen Regulatorproteins B cell lymphoma-2 (Bcl-2), welches dadurch die Einleitung der Apoptose nicht mehr verhindern kann (Towle et al., 2011).

Vergleicht man Eribulin in der Anwendung mit den klassischen Spindelgiften, so lassen sich einige wichtige Vorteile herausstellen. Erstens stellt Eribulin eine Möglichkeit dar, Tumoren zu behandeln, die aufgrund einer Tubulin-Mutation eine Taxanresistenz aufweisen

(Fujisawa et al., 2018; Inoue et al., 2016). Als mögliche Ursache für diesen therapeutischen Vorteil wird der einzigartige Wirkmechanismus angesehen (Cigler & Jain, 2012).

Ebenfalls auf die Unterschiedlichkeit des Wirkmechanismus zu den klassischen Spindelgiften stützt sich die Erklärung für die weitaus geringere Toxizität des Eribulins auf den Organismus, welche mit einem geringeren Ausmaß von unerwünschten Nebenwirkungen einhergeht (Vetter, 2011).

Ein dritter Vorteil von Eribulin besteht in seiner starken Fähigkeit, in das zentrale Nervensystem einzudringen, auf welche in Kapitel 1.4.4 näher eingegangen wird. Diese Fähigkeit ist vor allem für Vincristin als klassisches Spindelgift nicht gegeben (Gidding et al., 1999; Hacke, 2016).

Es ist gezeigt, dass Eribulin ein potentes Spindelgift mit einzigartigem Wirkmechanismus darstellt. Es weist einige Vorteile gegenüber den klassischen Spindelgiften auf, was ihm eine vielversprechende Rolle in der systemischen Therapie von Malignomen zuschreibt. Auf diesem Potenzial soll in der vorliegenden Arbeit aufgebaut werden und die Chancen von Eribulin als Tumorthapeutikum mit zweigliedrigem Wirkmechanismus experimentell untersucht werden.

1.4.4 Eribulin im Glioblastom: Aktuelle Studien

Takahashi et al. untersuchten die Wirkung von Eribulin auf humane Glioblastomzellen, darunter auch die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit verwendeten U-87MG-Zellen, in ausführlichen in vitro- und in

vivo-Experimenten. Zur Kontrolle wurden zwei Ovarialkarzinom-Zelllinien mit TERT-Wildtypsequenz verwendet. Sie fanden eine niedrigere IC₅₀ für alle sechs Zelllinien mit TERT-Mutation, eine Wachstumshemmung der Tumoren in U-87MG-xenotransplantierten Mäusehirnen in vivo mit zugleich längerem Überleben der Versuchstiere sowie eine starke Penetration der Blut-Hirn-Schranke. Hierbei zeigte sich eine vollständige Distribution der Substanz im Tumorgewebe bei nur geringfügiger und kurzzeitiger Belastung des gesunden Hirngewebes. Auch nach 24 Stunden konnten noch anhaltend hohe intratumorale Konzentrationen nachgewiesen werden, während das Blutplasma bereits nach 15 Minuten annähernd frei von der Substanz war. (Takahashi et al., 2019)

Kolb et al. fanden in vitro ebenfalls eine starke antiproliferative Wirkung von Eribulin in einer pädiatrischen Glioblastom-Zellkultur. In vivo wurden bei zwei von vier xenotransplantierten Mäusen eine hohe Aktivität des Eribulins nachgewiesen, sowie ebenfalls bei zwei der vier Versuchstiere ein nahezu vollständiges Ansprechen gefunden. (Kolb et al., 2013)

Über die Anwendung von Eribulin bei Patienten mit intrazerebralen Tumoren existieren Fallberichte, in denen eine Verkleinerung von zerebralen Mammakarzinom-Metastasen bei Behandlung mit Eribulin beobachtet wurde (A. Y. Chang & Ying, 2015; Matsuoka et al., 2013). Aktuell wird in Japan vom National Cancer Center Hospital in Tokyo die erste klinische Phase-II-Studie ENIGMA zur erstmaligen

Untersuchung der Wirkung von Eribulin auf Patienten mit rekurrentem Glioblastom durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Drucklegung der vorliegenden Arbeit lagen noch keine Ergebnisse vor.

1.5 Tumor Treating Fields: neue Wege in der Glioblastomtherapie

1.5.1 Therapieidee

Bei TTFields der Marke Optune® handelt es sich um ein Produkt der israelischen Firma Novocure Ltd. aus Haifa in Israel zur Therapie des neu diagnostizierten Glioblastoms, Glioblastomrezidivs und weiterer Tumorentitäten mithilfe elektrischer Wechselfelder. Zur Erzeugung der TTFields werden in der Regel vier Keramikgelpads mit integrierten Temperatursonden, sogenannten Transducer Arrays, auf die Kopfhaut des Patienten geklebt. Zwischen Kopfhaut und Pad wird ein Hydrogel aufgetragen, um die elektrische Leitfähigkeit zu erhöhen. Die genaue, individuelle Platzierung der Transducer Arrays wird anhand der aktuellen MRT-Aufnahmen des Patienten berechnet. Die Transducer Arrays sind an ein batteriebetriebenes Stromaggregat angeschlossen, welches zwischen diesen elektrische Wechselfelder mit niedriger Intensität von 1–3 V/cm und einer mittleren Frequenz von 200 kHz aufbaut, deren Feldlinien im Tumorbett senkrecht aufeinander stehen. Diese Wechselfelder sollen verschiedene Zellfunktionen, insbesondere jedoch die Mitose blockieren. (Novocure GmbH, 2020)

1.5.2 Theoretischer Hintergrund und Wirkmechanismen

Die Hemmung basiert auf der Beeinflussung von polaren Tubulindimeren und Septinmolekülen, welche als polymere Moleküle hohe Dipolmomente aufweisen. In der Folge wird daher vor allem der Spindelapparat beeinflusst, der eine entscheidende Rolle in der Mitosephase des Zellzyklus spielt. Es kommt bei Anwendung der elektrischen Felder zu einer Ausrichtung der Dipole entlang der elektrischen Feldlinien, wo sie Rotationskräften ausgesetzt sind und dadurch die physiologische Anordnung des kontraktiven Apparates verhindert wird (Kirson et al., 2004). Dadurch werden eine Bläschenbildung und Permeabilitätssteigerung der Membran, eine Verlängerung der Mitose, eine abnormale DNA-Aufspaltung zwischen Tochterzellen und schließlich Zellzyklusarrest und Apoptose ausgelöst (Tanzhu et al., 2022). Konnten Zellen trotz der oben genannten Ausrichtung der Dipole die Metaphase abschließen, kommt es aufgrund des physikalischen Phänomens der Dielektrophorese dazu, dass die polaren Moleküle wieder zurück in Richtung des Zentrums der Zelle gezogen werden, was ebenfalls zu Apoptose führen kann (Kirson et al., 2004).

1.5.3 Anwendung

Diese Therapieform erfordert eine hohe Compliance seitens des Patienten, da die empfohlene Anwendungsdauer mindestens 18 Stunden pro Tag über einen Zeitraum von bis zu mehreren Jahren beträgt. Dazu erhält der Patient einen speziellen Rucksack, in dem er

das Therapiesystem mit einem Gesamtgewicht von etwa 1,2 kg in seinem Alltag mitführen kann. (Novocure GmbH, 2020)

2017 konnten Stupp et al. in einer klinischen Phase-III-Zulassungsstudie EF-14 zeigen, dass die Behandlung mit TTFields und systemischer Temozolomid-Therapie bei Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom unabhängig vom MGMT-Promotor-Methylierungsstatus eine signifikante Erhöhung des progressionsfreien und des Gesamtüberlebens gegenüber einer Temozolomid-Einzelbehandlung bewirkt, wie in Abbildung 4 dargestellt. (Stupp et al., 2017) An dieser Stelle sei angemerkt, dass, in Anlehnung an die Ergebnisse der EF-14-Studie, in der vorliegenden Arbeit nur Glioblastomzellen aus Erstresektionen untersucht wurden.

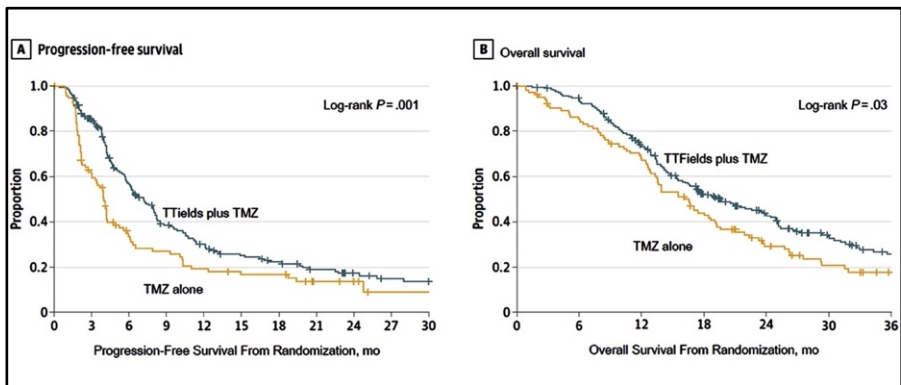


Abbildung 4: Kaplan-Meier-Plots von Patienten mit Glioblastom der EF-14 Studie: Vergleich von TTFields plus TMZ mit TMZ-Einzelbehandlung (Modifiziert nach Mehta et al., 2017).

Sowohl in Bezug auf das progressionsfreie Überleben (A) als auch auf das Gesamtüberleben (B) ist eine Verbesserung des Therapieergebnisses durch die Hinzunahme von TTFields zur Temozolomid-Einzelbehandlung erkennbar.

1.5.4 Kombinationsbehandlungen mit TTFields im Glioblastom: Aktuelle Studien

Zu dem vielfach untersuchten Forschungsgegenstand TTFields existieren in der Literatur zahlreiche interessante und vielversprechende Studien. Das folgende Kapitel nimmt ausschließlich diejenigen Arbeiten in den Fokus, welche Kombinationsbehandlungen von TTFields mit potenziellen Systemtherapeutika im Glioblastom untersuchen, um einen möglichst starken Bezug zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit herzustellen. Andere Therapiemodalitäten oder Tumorentitäten werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt.

Groves et al. führten bereits 2016 breit angelegte Experimente durch, in denen sie die Wirkung verschiedener potenzieller Systemtherapeutika in der Kombination mit TTFields in vitro an humanen Glioblastomzellen, darunter auch U-87MG-Zellen, untersuchten. Sie fanden hierbei eine Reduktion der Zellzahl durch TTFields in der Kombination mit Mefloquin, Metformin und Ganciclovir, machten jedoch keine Aussagen zu den vermuteten Mechanismen der synergistischen Wirkungen. (Groves et al., 2016)

Chang et al. untersuchten 2017 die Kombination von TTFields mit Withaferin A an humanen Glioblastomzellen in vitro, darunter auch U-87MG-Zellen. Sie fanden eine synergistische Hemmung des

Wachstums der Glioblastomzellen sowohl in Biolumineszenz- als auch durch hämozytometrischen Messungen. (E. Chang et al., 2017) Shteingauz et al. konnten zeigen, dass TTFields zu einer Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPK)-abhängigen Hochregulation der Autophagiemechanismen in Glioblastomzellen, darunter auch U-87MG-Zellen, führt. Außerdem wiesen sie nach, dass eine Kombination von TTFields mit dem Autophagie-Inhibitor Chloroquin zu einer dosisabhängigen Reduktion des Zellwachstums führt. Diese Beobachtungen nahmen die Wissenschaftler zum Anlass, der Autophagie eine Funktion als möglichen Escape-Mechanismus der Tumorzellen für TTFields zuzuschreiben. (Shteingauz et al., 2018)

Kessler et al. untersuchten die Kombination von TTFields mit dem Spindle Assembly Checkpoint-Inhibitor namens Monopolar Spindle 1 Kinase Inhibitor (MPS1-IN-3) an humanen Glioblastomzellen, darunter auch U-87MG-Zellen. Sie fanden eine gesteigerte Hemmung der Zellproliferation, eine Reduktion der Lebensfähigkeit der Tumorzellen, eine Verschiebung des Zellzyklus von der G1-Phase zur G2/M-Phase und einen Anstieg der Apoptoserate. (Kessler et al., 2018)

Jo et al. führten zahlreiche in vitro- und in vivo-Experimente zur Kombinationsbehandlung von TTFields mit Sorafenib in humanen Glioblastomzellen, darunter auch U-87MG-Zellen, durch. Sie fanden eine geringere Zellviabilität, eine Beschleunigung der Apoptose durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, eine Verstärkung der

Autophagie-Prozesse, einen G2/M-Arrest und eine Hemmung der Tumorzellmotilität und -invasivität sowie der Angiogenese. (Jo et al., 2018) Diese Ergebnisse wurden in einer jüngeren Studie von Kim et al. untermauert und ergänzt durch die mechanistische Zusatzkenntnis, dass die Kombination von Sorafenib und TTFIELDS zu einer Hemmung des Proteins Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3 (STAT3) führt (J.-Y. Kim et al., 2020).

Vargas-Toscano et al. konnten zeigen, dass der mammalian Target of Rapamycin-Modulator Rapalink-1 das Wachstum humaner Glioblastomzellen in synergistischer Weise reduzierte, wenn es in Kombination mit Temozolomid und TTFIELDS eingesetzt wurde. (Vargas-Toscano et al., 2020)

Zum Zeitpunkt der Drucklegung der vorliegenden Arbeit sind neben den oben genannten experimentellen Untersuchungen zur Kombinationsbehandlung von TTFIELDS mit potenziellen Systemtherapeutika bereits klinische Phase-1- und Phase-2-Studien mit den Substanzen Chloroquin, Bevacizumab, Marizomib, Nivolumab, Ipilimumab, Pembrolizumab und Niraparib im Gange, welche in einer Übersichtsarbeit von Wang et al. zusammengestellt wurden, zu denen jedoch noch keine Ergebnisse vorliegen (M. Wang et al., 2021).

Taphoorn et al. untersuchten darüber hinaus den Einfluss der Hinzunahme von TTFIELDS zur Standardtherapie des Glioblastoms auf die gesundheitsbezogene Lebensqualität (HRQoL) am Kollektiv

der bereits zuvor vorgestellten EF-14-Studie. Sie fanden mit Ausnahme von juckender Haut an den Kontaktstellen der Transducer Arrays keinen Unterschied zwischen beiden Therapiearmen, jedoch ein verlängertes verschlechterungsfreies Überleben im TTFields-Therapiearm. (Taphoorn et al., 2018)

Es ist gezeigt, dass TTFields als neue Therapieform einen enormen Fortschritt in der Glioblastomtherapie mit sich bringt. Das System eignet sich ausgezeichnet zur kombinierten Anwendung mit etablierten und experimentellen Systemtherapeutika. Insbesondere die Mitosehemmstoffe scheinen Kombinationspartner mit hohem synergistischem Potenzial darzustellen, was vermutlich auf der Ähnlichkeit der molekularen Wirkmechanismen der elektrischen Wechselfelder zu den Spindelgiften beruht. Von diesem Potenzial soll auch in dieser Arbeit bei der Untersuchung der Kombination von TTFields mit Mitosehemmstoff und TERT-Inhibitor Eribulin geschöpft werden.

1.6 Zielsetzung

Vor dem in der Einleitung beschriebenen Problemhintergrund hat die vorliegende Arbeit zunächst das Ziel, das Potenzial von Eribulin zur Wachstumshemmung des Glioblastoms experimentell zu bewerten. Hierzu sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist Eribulin grundsätzlich wirksam sowohl gegen etablierte Glioblastom-Modellzelllinien als auch gegen primäre Patientenzelllinien?
2. Wie reagieren humane Astrozyten auf Eribulin?
3. Ist die Wirksamkeit von Eribulin gegenüber humanen Glioblastomzellen abhängig von potenziellen Biomarkern wie TERT und MGMT?
4. Wie verhält sich die Wirksamkeit von Eribulin im Zeitverlauf?
5. Ist Eribulin in vitro in der Lage, ein vollständiges Ansprechen in humanen Glioblastomzellen zu erreichen?
6. Wie wirkt sich Eribulin auf die Vermehrungsfähigkeit humaner Glioblastomzellen aus?
7. Wie wirkt sich Eribulin auf die Apoptose humaner Glioblastomzellen aus?

Zur Vorbereitung auf eine umfassende Betrachtung der Kombinationsbehandlung sollen TTFields als Therapiemodalität in der Glioblastomtherapie in ihrer Wirksamkeit gegenüber etablierten Modellzelllinien und primären Patientenzelllinien untersucht werden. Hierzu sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie wirken sich TTFields auf die Vermehrungsfähigkeit humaner Glioblastomzellen aus?
2. Wie wirken sich TTFields auf die Apoptose humaner Glioblastomzellen aus?

Darauf aufbauend soll erstmalig das Potenzial von Eribulin als Kombinationspartner für TTFields abgeschätzt und die induzierten Effekte auf ein synergistisches Zusammenwirken beider Therapiemodalitäten hin untersucht werden. Hierzu sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Führt eine Kombination von Eribulin mit TTFields zu einer höheren Wirksamkeit im Vergleich zu den Einzeltherapien?
2. Ist die Wirkung der Kombinationsbehandlung abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der behandelten Zellen?
3. Wie wirkt sich die Kombinationsbehandlung auf die Vermehrungsfähigkeit und die Apoptose humaner Glioblastomzellen aus?
4. Welche Art von Kombinationseffekt liegt der gemeinsamen Anwendung der beiden Therapiemodalitäten in humanen Glioblastomzellen zugrunde?

Schließlich sollen die oben genannten Untersuchungen auch am Gliosarkom durchgeführt werden. Hierzu sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist Eribulin grundsätzlich wirksam gegen humane Gliosarkomzellen?
2. Sind TTFields grundsätzlich wirksam gegen humane Gliosarkomzellen?
3. Ist die Kombination von Eribulin und TTFields grundsätzlich wirksam gegen humane Gliosarkomzellen?

4. Welche Art von Kombinationseffekt liegt der gemeinsamen Anwendung der beiden Therapiemodalitäten in humanen Gliosarkomzellen zugrunde?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller, Firmensitz
Brutschrank HERAcell® 150i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Laborabzug	Heraeus Instruments GmbH, Osterode
Absaugsystem	Pfeiffer Vacuum GmbH, Asslar
Zentrifuge 5,7 kNm Labofuge® 400R	Heraeus Instruments GmbH, Osterode
Rüttler Vortex-2 Genie	Scientific Industries Inc., New York, USA
Wasserbad	Dinkelberg Labortechnik GmbH, Neu-Ulm
Laborwaage	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Universelles Mikrotiterplatten-Spektralphoto- meter	Bio-Tek Instruments Inc., Vermont, USA
Mikroskop Leica DM IL	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar

Akku-betriebene Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Pipette 2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 200 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
8-Kanal-Pipette elektronisch 300 µl	Sartorius AG, Göttingen
8-Kanal-Pipette mechanisch Finnpipette 50–300 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zählkammern nach Neubauer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön
Mechanischer Handstückzähler aus Metall T 120	Baumer IVO GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen
Lupe Vergrößerungsfaktor 2,5	Eschenbach Optik GmbH, Nürnberg
inovitro™ TTFields Applikationssystem	Novocure Ltd., Haifa, Israel
inovitro™ TTFields Petrischalen Keramik	Novocure Ltd., Haifa, Israel
Automatisches Zytometer Scepter™	Millipore Corporation, Billerica, USA
CellCulture® CO ₂ -Inkubator	Esco Micro Pte. Ltd., Singapur

Dampfsterilisator Varioklav®	HP Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Sterilcontainer	Aesculap AG, Tuttlingen
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
BD FACSCanto™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Software inovitro™	Novocure Ltd., Haifa, Israel
Software KCjunior v1.41	Bio-Tek Instruments Inc., Vermont, USA
Software BD FACSDiva™ 6.1.3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Software Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Washington, USA
Software IBM® SPSS® Statistics 26	IBM Corporation, New York, USA
Software GraphPad Prism 9	GraphPad Software, San Diego, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsgegenstand	Hersteller, Firmensitz
-----------------------------	-------------------------------

Serologische Pipette 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipette 5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipette 10 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen 20 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen 200 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäß 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäß 50 ml	Corning Science México S.A. de C.V., Reynosa, Tamaulipas, México
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Probenröhre 75 x 12 mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Platten 96 Wells	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Petrischalen 100 mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Petrischalen 35 mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

2 Material und Methoden

TC-Platten 6 Wells	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pasteurpipetten aus Glas	VWR International GmbH, Darmstadt
Haemocytometer Deckgläschen quadratisch 20 x 26 x 0,4 mm	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Deckgläschen rund 22 mm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kulturfläschchen 25 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kulturfläschchen 25 cm ² Cell+	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Filter Unit 33 mm	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Ireland
Einmalkanülen 20 G	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Einmalkanülen 18 G	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Spritzen 20 ml	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spain
Automatisches Zytometer Scepter™ Sensoren 60 µm	Millipore Corporation, Burlington, USA
Curwood Parafilm™ M Labor-Verpackungsfolie	Bemis Company Inc., Neenah, Wisconsin, USA

Containerfilter stericlin

Vereinigte Papierwarenfabriken
GmbH, Feuchtwangen

Bogenverpackungen Vlies
stericlin

Vereinigte Papierwarenfabriken
GmbH, Feuchtwangen

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Firmensitz
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-Propanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure 1 N	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kristallviolett-Lösung 1 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Deionisiertes Wasser	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Alconox® Detergens
Präzisionsreinigungspulver
Annexin V Binding Buffer

Alconox, Inc., New York, USA

BioLegend, Inc., San Diego,
USA

2.1.4 Zellkultur

Tabelle 4: Zellkultur

Kulturreagens

Dulbecco's Modified Eagle
Medium (DMEM 1X)

Fetal Bovine Serum (FBS)

Penicillin Streptomycin

0,05 % Trypsin-EDTA (1X)

CSC Complete Medium
4Z0-500

PRG-1 4Z0-610

PRG-2 4Z0-310

Hersteller, Firmensitz

Gibco, Thermo Fisher Scientific
Inc., Waltham, USA

Gibco, Thermo Fisher Scientific
Inc., Waltham, USA

Gibco, Thermo Fisher Scientific
Inc., Waltham, USA

Gibco, Thermo Fisher Scientific
Inc., Waltham, USA

Cell Systems Corporation,
Kirkland, Washington, USA

Cell Systems Corporation,
Kirkland, Washington, USA

Cell Systems Corporation,
Kirkland, Washington, USA

PRG-3 4Z0-410	Cell Systems Corporation, Kirkland, Washington, USA
CultureBoost™ 4CB-500	Cell Systems Corporation, Kirkland, Washington, USA
Tierische Wachstumsfaktoren	Cell Systems Corporation, Kirkland, Washington, USA
Attachment Factor 4Z0-201	Cell Systems Corporation, Kirkland, Washington, USA

2.1.5 Inhibitoren und Farbstoffe

Tabelle 5: Inhibitoren und Farbstoffe

Inhibitor/Farbstoff	Hersteller, Firmensitz
Eribulin (Halaven®)	Eisai Europe Ltd., Hertfordshire, UK
FITC Annexin V	BioLegend, Inc., San Diego, USA

Zur Inhibition des Zellwachstums wurde Eribulin (Halaven®) der Firma Eisai Europe Ltd. verwendet. Die Substanz liegt in der Injektionslösung aufgrund der höheren Stabilität als Eribulinmesylat vor. Ein Milliliter der Injektionslösung enthält Eribulinmesylat äquivalent zu 0,44 mg Eribulin. Der Hersteller gibt als sonstige Bestandteile Ethanol 5 % sowie Wasser für Injektionszwecke, Salzsäure und Natriumhydroxid zur pH-Einstellung ohne Konzentrationsangaben an. So wurde für die Untersuchungen eine 5 %-Ethanol­lösung als äquivalentes Lösungsmittel definiert und im MTT-Assay für die Kontrollgruppen verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in Zellkulturfläschchen in einem Brutschrank mit 37 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt. Je nach Wachstumsfortschritt wurden die Fläschchen alle 2 bis 14 Tage im Verhältnis 1:2 bis 1:20 geteilt. Zum Passagieren wurde zunächst das verbrauchte Zellmedium abgesaugt, mit 2 ml 0,05 % Trypsin für etwa 10 Sekunden gespült und anschließend mit 0,5 ml Trypsin inkubiert, um den bestehenden Zellrasen abzulösen. Nach mikroskopischer Bestätigung der vollständigen Ablösung der Zellen wurde die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 4,5 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) neutralisiert. Abschließend wurde nach dem gewünschten Teilungsverhältnis ein Teil der Zellsuspension entnommen und verworfen. Das Kulturfläschchen wurde erneut mit DMEM auf 5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt.

Das Passagieren der humanen Astrozyten erfolgte analog zu den Glioblastomzellen mit einzelnen Besonderheiten. Die Astrozyten wurden in mit Attachment Factor beschichteten Spezialfläschchen aufbewahrt. Der Vorgang des Ablöses der Zellen vor der Teilung umfasste hier drei spezielle Reagenzien anstelle von Trypsin. Nach dem Absaugen des verbrauchten Mediums wurde zunächst mit 2 ml CSC certified PRG-1 (PRG-1) gespült und anschließend wieder abgesaugt. Danach wurden 2 ml CSC certified PRG-2 (PRG-2) hinzugegeben und etwa 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Schließlich

wurden 2 ml CSC certified PRG-3 (PRG-3) hinzugegeben, um die proteolytische Aktivität des PRG-2 zu neutralisieren. Die nun entstandene Suspension wurde in einem separaten Röhrchen aufgefangen und ein entsprechender Anteil verworfen, um das gewünschte Verhältnis der Teilung zu erreichen. Die verbliebene Suspension wurde dann 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Das Pellet wurde mit 5 ml CSC Complete Medium resuspendiert und zurück in das Kulturfläschchen gegeben.

2.2.2 Untersuchtes Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt neun Zelllinien des humanen zentralen Nervensystems verwendet.

Bei den Zelllinien U-87MG und A-172 handelt es sich um Modellzelllinien des humanen Glioblastoms. Diese Zelllinien wurden künstlich immortalisiert und für den weltweiten Handel freigegeben. Sie dienen der laborübergreifenden Vergleichbarkeit von Untersuchungen, da sie eine konstante Vermehrungsfähigkeit besitzen und nahezu unbegrenzt verfügbar sind. Die Modellzelllinien U-87MG mit dem vollständigen Label ATCC® HTB-14™ und A-172 mit dem vollständigen Label ATCC® CRL-1620™ wurden von der Firma LGC Standards GmbH in Wesel bezogen. Demografische sowie molekulargenetische Informationen wurden von den Händlern übermittelt.

Die Patientenzelllinien 447, 455, 460, 425, und 461 wurden vom neuroonkologischen Zentrum am Universitätsklinikum Gießen und

Marburg bereitgestellt und umfassten fünf Patientenzelllinien molekulargenetisch nachgewiesener Glioblastome aus einem Entnahme- und Untersuchungszeitraum von 2016 bis 2019. Die molekulargenetischen Untersuchungen der Gene IDH1, MGMT und TERT wurden vom Institut für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgenommen. Die Untersuchungen wurden von der medizinischen Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen überprüft und unter dem Aktenzeichen 07/09 genehmigt. Die Einverständniserklärung der Patienten zur wissenschaftlichen Untersuchung ihrer Gewebeproben wurde vor der Tumoroperation durch einen aufklärenden Arzt eingeholt. Es erfolgte die retrospektive Analyse der Patientenakten und die Anlage einer Datenbank mit Erfassung des Geburtsdatums, des Geschlechts, der Tumorlokalisation sowie der relevanten molekulargenetischen Marker.

Bei der Zelllinie NCE-G-28 mit dem vollständigen Label NCE-G-28 handelt es sich um eine Modellzelllinie des humanen Gliosarkoms. Sie soll in der vorliegenden Arbeit die seltene, mit dem Glioblastom verwandte Entität des Gliosarkoms repräsentieren und mit dem Glioblastom verglichen werden. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Christopher Nimsky zur Verfügung gestellt.

Bei der Zelllinie ACBRI371 handelt es sich um eine Modellzelllinie physiologischer, humaner Astrozyten. Sie dienen in dieser Arbeit als Referenz für das gesunde Gliagewebe des Hirns und sollen eine Abschätzung des Ausmaßes von potenziellen Nebenwirkungen von Eribulin ermöglichen. Die humanen Astrozyten wurden von der Firma Applied Cell Biology Research Institute in Kirkland, USA bezogen.

Im Laufe der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen wurden nicht für jedes Experiment alle der neun vorgestellten Zelllinien verwendet. Die konkrete Auswahl der untersuchten Zelllinien für jedes Telexperiment soll im Folgenden erklärt werden und ist darüber hinaus stets bei der Präsentation der Ergebnisse angegeben.

Die Untersuchungen zur Dosis-Wirkungs-Beziehung von Eribulin wurden an allen neun oben genannten Zelllinien durchgeführt.

Die Untersuchungen zur Wirksamkeit von Eribulin und TTFields im *inovitro*TM-System wurden an den Zelllinien U-87MG, A-172, 447, 455 und NCE-G-28 durchgeführt. Die Auswahl dieser Zelllinien erfolgte unter anderem anhand der Verdopplungszeit, da das *inovitro*TM-System eine gewisse Wachstumsgeschwindigkeit der im Versuch befindlichen Zellen benötigt, um seine Wirkung abbilden zu können. In der oben genannten Teilauswahl von fünf Zelllinien wurde die überlebende Zellfraktion durch Zellzahlmessung und die apoptotische Zellfraktion im Sinne der Annexin-positiven Zellfraktion durch FACS bestimmt.

Schließlich wurde in einer weiteren Teilauswahl der Zelllinien U-87MG, 447, und 455 nach der Behandlung im *inovitro*TM-System

zusätzlich die klonogene Zellfraktion durch Clonogenic Assay bestimmt. Die Zelllinien A-172 und NCE-G-28 wurden von diesen Untersuchungen ausgeschlossen, da sie sich aus praktischer Sicht für diesen Versuch als ungeeignet erwiesen. Gründe hierfür waren ein ausgeprägter Trypsin-induzierter Viabilitätsverlust der Zelllinie A-172 nach der Ernte der Zellen von den Deckgläsern sowie eine starke Neigung zur Aggregatbildung der Zelllinie NCE-G-28, welche die Erfassung der Koloniebildung stark verzerren würde.

2.2.3 MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein colorimetrisches Verfahren zur Messung der Zellviabilität, welches sich als der Anteil lebender, stoffwechselaktiver Zellen an einer Gesamtpopulation definiert. Es handelt sich um ein quantitatives Messverfahren, das sich die Reduktion des gelben, wasserlöslichen O=C1NC2=CC(=C(C=C2)N(C)C)N(C)C1 Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid zu blau-violetten, wasserunlöslichen Formazankristallen zu Nutze macht. Die Reaktion wird durch eine mitochondriale Dehydrogenase katalysiert und bildet in diesem Verfahren die metabolische Aktivität der Zellen ab, welche unter kontrollierten Bedingungen stark mit der Zellviabilität korreliert. Die Menge des umgesetzten Farbstoffs wird mit dem Photometer bei den Wellenlängen 562 nm und 630 nm gemessen und ist proportional zur Anzahl vitaler Zellen im jeweiligen Versuchsansatz.

Vor Beginn des Versuchs wurden die Zellen zunächst mittels einer Zählkammer nach Neubauer gezählt und anschließend 10^4 Zellen in

200 µl Medium je Vertiefung auf den 96-Well Mikrotiterplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt. Anschließend wurde in der Eribulingruppe der zu untersuchende Inhibitor Eribulin in verschiedenen Konzentrationen, gelöst in Nährmedium, auf die Zellen gegeben. Analog wurde die Kontrollgruppe mit den entsprechenden Verdünnungen von Ethanol 5 % versehen, was dem Lösungsmittel der Eribulin-Injektionslösung entsprach. 3 Wells zur internen Kontrolle erhielten einen Mediumwechsel. Nach weiteren 24 Stunden wurde das mit Eribulin beziehungsweise Ethanol gemischte Medium erneut abgesaugt und in jede Vertiefung 220 µl einer Lösung aus 100 mg MTT in 20 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gegeben und für 90 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die nun von den Zellen verstoffwechselte Lösung abgesaugt und in jede Vertiefung 100 µl einer Lösung aus 45 ml 2-Propanol und 5 ml Salzsäure 1 N gegeben, um die Zellen zu lysieren und das entstandene Formazan in Lösung zu bringen. Abschließend wurde die Absorption der Wells in einem Mikroplatten-Spektralphotometer bei den Wellenlängen von 562 nm und 630 nm gemessen und mit der KCjunior-Software erfasst. Es wurde ebenfalls ein Leerwert für zwei ungefüllte Wells erfasst und deren Mittelwert von jedem anderen Messwert abgezogen. Diese Messung wurde nach 48 Stunden und nach 72 Stunden nach Inhibitorzugabe in analogem Vorgehen mit den verbliebenen Mikrotiterplatten wiederholt. Für jede zu untersuchende Zelllinie und jeden Messzeitpunkt wurde der MTT-Assay mindestens dreimal durchgeführt.

2.2.4 Experimentelle Glioblastomtherapie im inovitro™-System

Im Folgenden sollen zunächst der Aufbau und die Funktionsweise des inovitro™-Systems erläutert werden. Anschließend wird das verwendete Versuchsprotokoll vorgestellt.

Eine Arbeitsplatte des inovitro™-Systems enthält 8 Petrischalen, welche im Folgenden auch als Dishes bezeichnet werden, die aus Keramik bestehen. An der Außenwand der Petrischale sind zwei Elektronenpaare angebracht, die innerhalb der Petrischale zwei elektrische Wechselfelder erzeugen. Die beiden Felder sind dabei senkrecht zueinander orientiert. Die Elektroden sind mit einem Sinuswellengenerator und einem Verstärker verbunden, welche die Anwendung von TTFields in einem Frequenzbereich von 50 bis 500 kHz ermöglichen. Die in dieser Arbeit verwendete elektrische Feldfrequenz betrug zu jeder Zeit 200 kHz. Dieser Wert hatte sich in verschiedenen vorherigen Arbeiten anderer Autoren als das Wirkmaximum der TTFields-Applikation sowohl an humanen Glioblastomzellen als auch an Ovarialkarzinomzellen herausgestellt (Porat et al., 2017; Voloshin et al., 2016). Des Weiteren verfügt das System über Sensoren zur Messung von Temperatur, Spannung und Widerstand an jeder Petrischale. Diese wurden während der Untersuchung kontinuierlich aufgezeichnet und ließen eine Beurteilung des technischen Ablaufs zu. So konnten Messreihen, die technischen Fehlern unterlagen, wie zum Beispiel einer unzureichenden Feldspannung, einfach erkannt und wiederholt werden.

Grundsätzlich sind die therapeutischen Effekte der TTFields von verschiedenen Parametern abhängig. Diese sind die elektrische Feldfrequenz, die Feldintensität, die Behandlungsdauer und die Ausrichtung der Felder zueinander (Porat et al., 2017). Die Feldfrequenz wurde in dieser Arbeit bei 200 kHz konstant gehalten. Die elektrische Feldintensität kann nur indirekt über die Inkubatortemperatur gesteuert werden. Diese wurde in den Versuchen der vorliegenden Arbeit bei 21 °C konstant gehalten. Porat et al. errechneten bei einer Temperatur von 21 °C eine elektrische Feldintensität von 1,41 V/cm im quadratischen Mittel (Porat Y, 2017). Die Behandlungsdauer wurde analog zu den Untersuchungen zu Eribulin für nahezu alle Teilexperimente auf 72 Stunden festgelegt. Auf eine Abweichung von dieser Behandlungsdauer in konkreten Einzelfällen wird im Verlauf näher eingegangen. Schließlich war die Ausrichtung der elektrischen Felder zueinander durch die Konstruktion des inovitro™-Systems festgelegt. Zu Beginn des Experiments wurden die Zellen der zu untersuchenden Zelllinien mit 0,05 % Trypsin aus dem Kulturfläschchen abgelöst und mit Hilfe des Scepter™ Cell Counter gezählt. Anschließend wurde die Suspension 5 Minuten lang bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden mit einer errechneten Menge DMEM resuspendiert, sodass eine Lösung entstand, in der sich 100 Zellen je Mikroliter befanden. Danach wurde die benötigte Anzahl 6-Dish-Platten mit kreisrunden Deckgläsern bestückt und anschließend je zu untersuchender Zelllinie 200 µl der

Suspension beziehungsweise 20.000 Zellen je Deckgläschen in 16 Replikaten ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Deckgläschen mit Hilfe einer Pinzette umgesetzt. Je 8 Replikate wurden in frische 6-Dish-Platten überführt, in die zuvor 2,5 ml DMEM oder Eribulin in der entsprechenden IC₅₀ je Replikat vorgelegt worden war. Die verbliebenen 8 Replikate wurden in die Keramik-Dishes des inovitro™-Systems überführt, die ebenfalls 2,5 ml DMEM oder Eribulin enthielten. So wurden die Kontroll- sowie die Eribulingruppe für 72 Stunden erneut bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, während die TTFields-Gruppe und die Kombinationsgruppe für 72 Stunden im inovitro™-System den TTFields ausgesetzt war. Nach 72 Stunden der Inkubation wurden die elektrischen Wechselfelder gestoppt und anschließend alle Zellen von den Deckgläschen geerntet. Hierzu wurde jedes Deckgläschen zunächst auf eine frische 6-Dish-Platte überführt und die Zellen mit 0,25 % Trypsin abgelöst. Dieser Vorgang dauerte je nach Zelllinie und deren Adhärenz bis zu 5 Minuten. Es wurde stets so lange mit Trypsin inkubiert und gespült, bis alle Zellen sichtbar vom Deckgläschen abgelöst waren. Der hier vorgestellte Versuchsaufbau ist eng an das empfohlene Vorgehen von Porat et al. beziehungsweise der Firma Novocure Ltd., Haifa, Israel angelehnt (Porat et al., 2017).

Da in den Zelllinien U-87MG und A-172 eine ungleich stärkere Wachstumshemmung durch die TTFields-Behandlung als in den übrigen Zelllinien beobachtet wurde, wurden zusätzliche Versuche mit einer kürzeren TTFields-Applikation durchgeführt. Hierzu wurden

die entsprechenden Proben nicht simultan mit Eribulin-Applikation an den TTFields-Generator angeschlossen, sondern erst 36 Stunden später, sodass sich die Applikationsdauer auf nur 36 Stunden bis zum Ende der Behandlung verkürzte. Diese Anpassung der Applikationsdauer ist bei der Vorstellung der entsprechenden Ergebnisse gesondert indiziert.

Bei der Zelllinie U-87MG wurde trotz Eribulin-Applikation in IC_{50} -Dosierung eine ungleich stärkere Wachstumshemmung als in den übrigen Zelllinien beobachtet, sodass auch in dieser Behandlungsgruppe zusätzliche Versuche mit einer geringeren Eribulin-Konzentration durchgeführt wurden. Hierzu wurden die entsprechenden Proben mit nur drei Viertel der IC_{50} -Dosis, also einer Konzentration von 0,15615 nM behandelt. Diese Anpassung der Eribulindosis ist bei der Vorstellung der entsprechenden Ergebnisse gesondert indiziert.

Für die Auswertung der Versuche kamen insgesamt drei verschiedene Methoden zur Erfassung der verschiedenen Messgrößen zum Einsatz. Im Folgenden sollen diese Methoden vorgestellt werden.

2.2.5 Zellzählung

Der erste Weg der Auswertung bestand in der direkten Zellzählung. Hierzu wurden die abgelösten Zellen mit dem Scepter™ Cell Counter gezählt und anschließend das Verhältnis der Zellzahl jeder Probe zum Mittelwert der Kontrolle bestimmt. Die so ermittelten Verhältnisse sollen im Folgenden als „überlebende Zellfraktion“ bezeichnet

werden und zur ersten Abschätzung der Zytotoxizität der verschiedenen Therapieformen dienen.

Auf der Grundlage der mittels Zellzählung erhobenen Daten wurden mit Hilfe des exponentiellen Modells

$$Z(t) = Z_0 \times 2^{\frac{t}{T_2}}$$

die Verdopplungszeiten für alle Zelllinien errechnet, die mit TTFields behandelt wurden. Hierbei war t die Zeit in Tagen, Z_0 die Ausgangszellzahl von 20.000 Zellen je Deckgläschen, T_2 die Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie in Tagen und $Z(t)$ die Zellzahl zu einem bestimmten Messzeitpunkt t in Tagen.

2.2.6 Clonogenic Assay

Der zweite Weg der Auswertung bestand in der Durchführung eines Clonogenic Assay. Hierzu wurden je Deckgläschen aus der abgelösten Suspension 500 Zellen in 2 ml DMEM auf einer frischen 6-Dish-Platte ausplattiert. Diese Platten wurden anschließend bis zu 3 Wochen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Während dieser Zeit wurden die ausplattierten Zellen fortlaufend unter dem Mikroskop beobachtet. Sobald sich auf der Platte der Kontrollzellen mehrere Kolonien von über 50 Zellen gebildet hatten, wurde die Färbung der Kolonien auf allen Platten des Versuchsdurchlaufes durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Dishes wurden mit PBS gespült. Anschließend wurde 1 ml Methanol der Temperatur -20 °C je Dish hinzugegeben und die Platte anschließend für 10 Minuten bei -20 °C inkubiert. Nach der

Inkubation im Eisfach wurde das Methanol abgesaugt und 0,8 ml einer 0,1 %-Lösung Kristallviolett in 25 % Methanol als Lösungsmittel je Dish hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde der Farbstoff abgesaugt und dreimal mit deionisiertem Wasser gespült. Danach wurden die Platten bei Raumluft getrocknet und die makroskopisch sichtbaren Kolonien aller Dishes mit Hilfe einer Lupe und eines Handzählers gezählt. Auch in dieser Auswertung wurde die Zahl der Kolonien einer jeden Probe zum Mittelwert der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt und so die „klonogene Zellfraktion“ bestimmt. Das Endergebnis eines Clonogenic Assay ist in Abbildung 5 exemplarisch dargestellt.

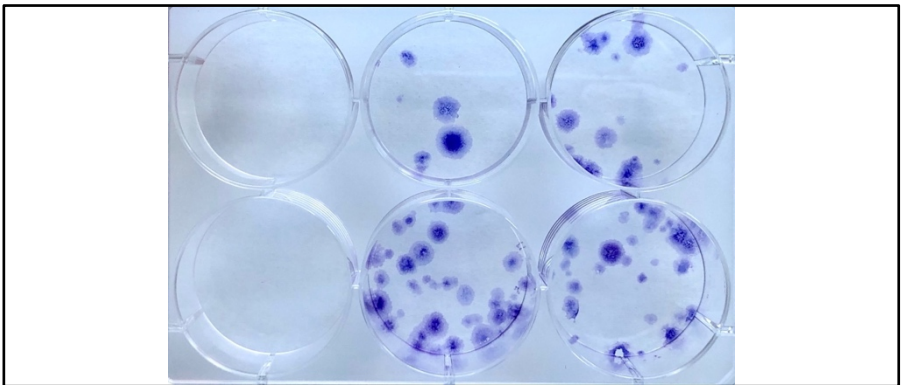


Abbildung 5: Clonogenic Assay nach dreiwöchiger Inkubationsdauer.

Die Abbildung zeigt exemplarisch das Endergebnis eines Clonogenic Assay nach dreiwöchiger Inkubationsdauer nach Therapieende. Es ist die unterschiedlich ausgeprägte Vermehrungsfähigkeit der Zellen anhand der angefärbten Kolonien der einzelnen Dishes zu erkennen.

2.2.7 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Als dritte Messgröße wurde in der Auswertung die apoptotische Zellfraktion aller Therapiegruppen mittels FACS-Analyse erfasst. Hierzu wurden die Zellen nach der Ernte von den Deckgläschen, der Zellzählung und der Entnahme der Zellen für den Clonogenic Assay in ein FACS-Tube gegeben. Die FACS-Proben wurden 5 Minuten bei 1000 RPM zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Die Pellets wurden in 100 µl Annexin V Binding Buffer aufgenommen. In der Kontrollgruppe wurde in jedem Versuchsdurchlauf für jede Zelllinie zusätzlich eine weitere FACS-Probe angelegt, die im weiteren Verlauf keine Färbung erhalten hat. Diese ungefärbte Probe diente der Erfassung der Autofluoreszenz der Zellen jeder Zelllinie durch das FACS-System. Diese Autofluoreszenz wurde bei der Messung der gefärbten Proben für jede Zelllinie individuell berücksichtigt. Den in Kalzium-Puffer gelösten Zellen wurde zunächst der Farbstoff Annexin-V-PE (Annexin) in einem Verhältnis von 1:100 zugegeben und die Probe mit einem Vortex-Gerät gerüttelt. Anschließend wurde die Probe für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Während des gesamten Arbeitsablaufes wurde streng darauf geachtet, dass die Lichtexposition aller Farbstoffe so gering wie möglich gehalten wurde. Nach der Dunkelinkubation wurde die Probe durch das FACS-System aspiriert und die Fluoreszenz der Zellen gemessen. Mit Hilfe der Software FACSDiva™ wurden die Fluoreszenzwerte für jedes gemessene Event in einem Zwei-Achsen-Koordinatensystem als Dot-Plot gegeneinander

aufgetragen. Jedes gemessene Event entsprach bei dieser Messmethode einer fluoreszierenden Zelle beziehungsweise einem Zellaggregat. In der ungefärbten Probe gemessene Werte im untersten Fluoreszenzbereich wurden als Zelltrümmer betrachtet und vom erfassten Messbereich für alle weiteren Messungen dieser Zelllinie ausgeschlossen. Ebenfalls wurde ein Sidescatter verwendet, um Dubletten und größere Zellaggregate von der Analyse auszuschließen.

Das Koordinatensystem wurde mit Hilfe eines Quadranten-Gates in die Bereiche Quadrant 1 (Q1) bis Quadrant 4 (Q4) unterteilt. Die Software errechnete anhand dieser vier Quadranten den Anteil der Events in jedem Quadranten in Bezug zu allen Events im vorher definierten Messbereich. Hierbei wurde der Anteil in Q3 als vitale Zellen, in Q2 und Q4 als Zellen in Apoptose und in Q1 als Zellen mit unspezifischem Zelltod gewertet. Die oben beschriebene Form der Datenerfassung und Interpretation ist in Abbildung 6 dargestellt. Zur Auswertung wurden die Anteile der Quadranten Q2 und Q4 zur Annexin-positiven Zellfraktion addiert, welche die „apoptotische Zellfraktion“ widerspiegelt. Der den unspezifischen Zelltod repräsentierende Anteil in Q1 wurde im analogen Vorgehen zu etablierten Arbeitsgruppen nicht in die Erfassung des apoptotischen Zelltods mit einbezogen (Giladi et al., 2015).

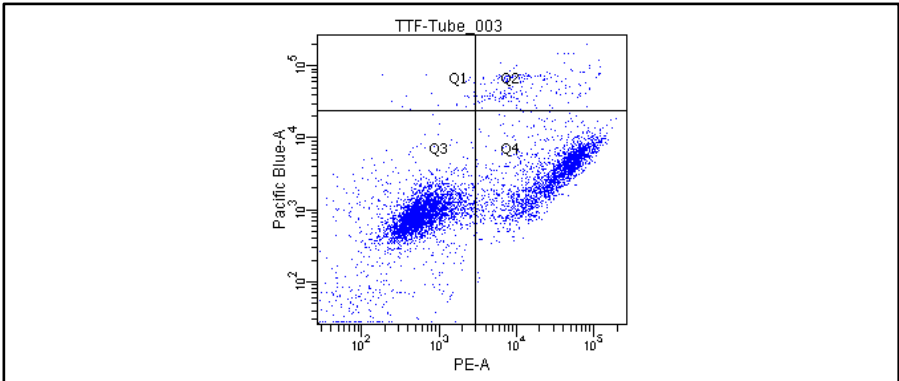


Abbildung 6: Erfassung der Fluoreszenz der gefärbten Zellproben mittels FACS.

Die Abbildung zeigt eine Darstellung der fluoreszierenden Events einer Probe nach TTFIELDS-Behandlung im Scatter-Dot-Plot, wie sie standardmäßig von der FACSDiva™-Software ausgegeben wird. Zu erkennen ist die deutliche Diskriminierung von drei Eventfraktionen, die die unterschiedlichen Konstellationen von Farbstoffbindungen repräsentieren.

2.2.8 Interaktionsanalyse

Um zu bewerten, ob der Kombinationseffekt auf einer einfachen Addition der Effekte der Einzelbehandlungen beruht, oder ob dem Zusammenwirken von Eribulin und TTFIELDS ein unter- oder überadditiver, beziehungsweise synergistischer Kombinationseffekt zugrunde liegt, wurde eine Interaktionsanalyse durchgeführt.

In der Literatur gibt es eine Vielzahl von mathematischen Methoden, mit denen eine Bewertung des Zusammenwirkens zweier therapeutischer Faktoren vorgenommen werden kann. Die in dieser Arbeit verwendete Methode stammt in ihrer ursprünglichen Form von Valeriote und Lin aus dem Jahre 1975 (Valeriote & Lin, 1975). Diese

arbeitet mit dem Terminus der Surviving Fraction, was der in dieser Arbeit verwendeten Messgröße der überlebenden Zellfraktion entspricht. Die Methode von Valeriote vergleicht das Produkt der überlebenden Zellfraktion in den Gruppen der Einzelbehandlungen mit der überlebenden Zellfraktion in der Kombinationsgruppe. Hierbei bewertet die Methode von Valeriote den Kombinationseffekt der beiden Behandlungsformen als additiv, wenn das Produkt der überlebenden Zellfraktion der Einzelbehandlungen den gleichen Wert annimmt wie die überlebende Zellfraktion der Kombinationsbehandlung. Sie bewertet den Kombinationseffekt als unteradditiv, wenn das Produkt der überlebenden Zellfraktion der Einzelbehandlungen einen kleineren Wert annimmt als die überlebende Zellfraktion der Kombinationsbehandlung. Sie bewertet den Kombinationseffekt als überadditiv beziehungsweise synergistisch, wenn das Produkt der überlebenden Zellfraktion der Einzelbehandlungen einen höheren Wert annimmt als die überlebende Zellfraktion der Kombinationsbehandlung. Die beschriebene Methode ist bereits über 45 Jahre alt, wird jedoch bis heute weiterhin an vielen Stellen angewandt, wie jüngste Veröffentlichungen aus der Forschung zu TTFields-Kombinationsmodellen zeigen (Giladi et al., 2017; E. H. Kim et al., 2016; Lee et al., 2019).

Analog hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit für jede Zelllinie das Produkt der mittleren überlebenden Zellfraktion der Gruppen Eribulin und TTFields gebildet und dieses als Grenzwert für einen additiven

Kombinationseffekt festgelegt. Anschließend wurden die im Folgenden als Kombinationsindices bezeichneten Verhältnisse der erhobenen Messwerte der überlebenden Zellfraktion der Kombinationsbehandlung zu dem beschriebenen Grenzwert gebildet und die zugehörigen 95 %-Konfidenzintervalle (95 %-KI) errechnet. Somit galt der Kombinationseffekt der Behandlungen mit Eribulin und TTFields als additiv, wenn das Konfidenzintervall den Wert 1 einschloss. Lag das Konfidenzintervall vollständig oberhalb von 1, galt der Kombinationseffekt als unteradditiv, lag es vollständig unterhalb von 1, so galt der Kombinationseffekt als überadditiv und damit synergistisch.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die Datenaufbereitung aller erhobenen Messwerte erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel.

Auf Basis der Messwerte der MTT-Assays wurden Probit-Analysen mit logarithmisch-transformierter x-Achse für alle verwendeten Zelllinien durchgeführt und so die IC_{50} für den Inhibitor Eribulin mit dem zugehörigen 95 %-Konfidenzintervall bestimmt. Die IC_{50} ist in diesem Versuchsaufbau jene Inhibitorenkonzentration, bei der genau 50 % der Ausgangspopulation noch eine Stoffwechselaktivität aufwiesen und damit genau 50 % Zellviabilität vorlag. Des Weiteren wurden die in den Probit-Analysen errechneten Viabilitäten gegen die Konzentration des Inhibitors aufgetragen und Dosis-Wirkungs-Kurven sowie Säulendiagramme erstellt. Zur Untersuchung eines vollständigen Ansprechens wurde dieses als das

experimentelle Erreichen einer inhibitorischen Konzentration mit 95 % Hemmung (IC_{95}) durch Eribulin definiert. Die IC_{95} gibt die Dosis Eribulin an, die appliziert werden muss, um in der untersuchten Population eine verbliebene Zellviabilität von 5 % zu erreichen. Die IC_{95} wurde hierzu für ausgewählte Zelllinien mittels Logit-Analyse berechnet, da dieses Verfahren eine genauere Schätzung der Randbereiche erlaubt. Die Berechnung der Dosis-Wirkungs-Beziehung mittels Probit- beziehungsweise Logit-Analyse wurde mit der Statistik-Software SPSS® Statistics durchgeführt. Für die Erstellung der Grafiken wurde das Statistik- und Grafikprogramm GraphPad Prism 9 verwendet.

In der statistischen Auswertung der Versuche im inovitro™-System wurden alle statistischen Analysen sowie die Erstellung aller Diagramme in GraphPad Prism 9 durchgeführt. Zu allen drei Messgrößen wurden die ermittelten Fraktionen zwischen zwei zu vergleichenden Gruppen mittels eines t-Tests für unabhängige Stichproben miteinander verglichen. Lagen mehr als zwei zu vergleichende Gruppen vor, wurde zunächst eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt und anschließend der Bonferroni-Post-hoc-Test angewendet. Zusätzlich wurde eine lineare Regressionsanalyse zum Zusammenhang der Verdopplungszeit und der überlebenden Zellfraktion in der Kombinationsbehandlung durchgeführt. Darüber hinaus wurden 95 %-Konfidenzintervalle für die Kombinationsindices der Interaktionsanalyse berechnet. Schließlich wurden Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten nach

Pearson zwischen den genannten drei Messgrößen berechnet. Schließlich wurden für jede Zelllinie Produkt-Moment-Korrelationen nach Pearson zwischen den genannten drei Messgrößen berechnet. In allen genannten statistischen Analysen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit p unterhalb des Signifikanzniveaus $\alpha = 0,05$ als statistisch signifikant gewertet. Die Erreichung höherer Signifikanzniveaus ist bei der Vorstellung der Ergebnisse stets mit angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Die Zusammensetzung des untersuchten Patientenkollektivs sowie die Teilauswahlen für einzelne Experimente wurden in Kapitel 2.2.2 vorgestellt. Im Folgenden wird eine Übersicht über die relevanten demografischen, klinischen sowie molekulargenetischen Parameter gegeben, welche in Tabelle 6 aufgezeigt sind.

Tabelle 6: Übersicht über die untersuchten Patientenzelllinien

„w“ = weiblich, „m“ = männlich, „0“ = negativer Mutations- bzw. Methylierungsstatus, „1“ = positiver Mutations- bzw. Methylierungsstatus

Zelllinie	Geschlecht	Alter	Lokalisation	TERT	MGMT
447	m	57	frontal, rechts	1	0
455	m	57	frontal, rechts	1	1
460	w	63	temporal, rechts	1	1
425	m	68	temporal, links	1	0
461	w	75	frontal, links	0	1

3.2 Die Auswirkungen von Eribulin auf humane Glioblastomzellen

3.2.1 Vorbemerkung

In allen durchgeführten Untersuchungen wurde die Wirkung von Eribulin auf humane Glioblastomzellen nach 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Die im Folgenden vorgestellten Messungen beziehen

sich, sofern nicht ausdrücklich anders angezeigt, ausschließlich auf die Messungen nach 72 Stunden, da nach dieser Applikationsdauer die stärkste antiproliferative Wirkung von Eribulin beobachtet wurde. Die Messungen der anderen Zeitpunkte wurden ebenfalls ausgewertet und es wird in Kapitel 3.2.4 auf diese Bezug genommen.

3.2.2 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen

Um die Grundsatzfrage zu klären, ob Eribulin überhaupt eine antiproliferative Wirkung auf Glioblastomzellen ausübt, wurden aufgrund ihrer hohen Repräsentativität zwei etablierte Modellzelllinien zur Untersuchung ausgewählt. Es zeigte sich in beiden Zelllinien eine starke antiproliferative Wirkung von Eribulin mit IC_{50} -Werten im subnanomolaren Bereich. Die Wirksamkeit von Eribulin wurde zudem an den fünf oben genannten Patientenzelllinien der Biobank des neuroonkologischen Zentrums am Universitätsklinikum Gießen und Marburg untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls eine starke antiproliferative Wirkung von Eribulin mit IC_{50} -Werten im subnanomolaren bis nanomolaren Bereich. Die einzelnen IC_{50} -Werte für jede Zelllinie sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführt. Abbildung 7 zeigt den sigmoidalen Verlauf der mittels Probit-Analyse errechneten Dosis-Wirkungs-Kurven für die Modellzelllinien (links) und die Patientenzelllinien (rechts).

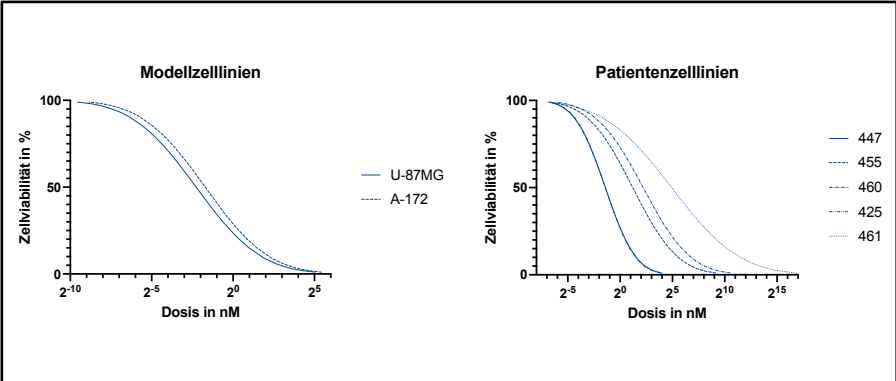


Abbildung 7: Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Eribulin in Modellzelllinien und Patientenzelllinien.

Die Abbildung zeigt den sigmoidalen Verlauf der mittels Probit-Analyse errechneten Dosis-Wirkungs-Kurve für die Modellzelllinien U-87MG und A-172 (links) sowie für die Patientenzelllinien 447, 455, 460, 425 und 461 (rechts). Für die Zelllinien 447 und 425 kommt es aufgrund einer hohen Ähnlichkeit im Dosis-Wirkungs-Profil zu einer Überlagerung der Kurven.

Tabelle 7: IC₅₀-Werte der Modellzelllinien in nM

Zelllinie	IC ₅₀	Untere Grenze	Obere Grenze
		95 %-KI	95 %-KI
U-87MG	0,2082	0,1486	0,2699
A-172	0,3057	0,1707	0,4482

Tabelle 8: IC₅₀-Werte der Patientenzelllinien in nM

Zelllinie	IC ₅₀	Untere Grenze	Obere Grenze
		95 %-KI	95 %-KI
447	0,3771	0,2676	0,4945
455	2,3261	1,7434	3,4254

460	4,6192	2,9746	9,3777
425	0,3763	0,2148	0,5564
461	30,3468	19,9160	53,4312

3.2.3 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Astrozyten

Zur Kontrolle und zur experimentellen Abschätzung potenzieller Nebenwirkungen von Eribulin im gesunden Hirngewebe wurde die Wirksamkeit von Eribulin an humanen Astrozyten untersucht. Es zeigte sich eine deutlich geringere, aber dennoch vorhandene antiproliferative Wirkung von Eribulin auf humane Astrozyten. Zur Gegenüberstellung wurde die IC_{50} der Astrozyten mit den Modellzelllinien verglichen. Die Konfidenzintervalle der Modellzelllinien überschritten sich nicht mit dem der humanen Astrozyten. Abbildung 8 zeigt die graphische Gegenüberstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven sowie der IC_{50} -Werte im Säulendiagramm.

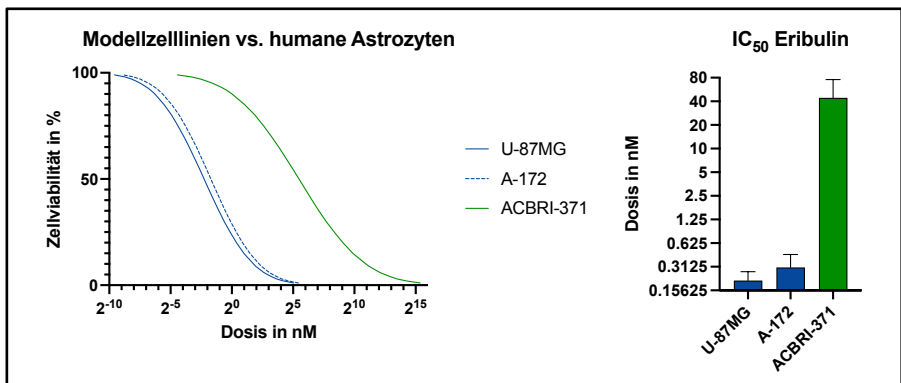


Abbildung 8: Dosis-Wirkungs-Beziehung von humanen Astrozyten gegenüber Modellzelllinien des Glioblastoms.

Die Abbildung zeigt den sigmoidalen Verlauf der mittels Probit-Analyse errechneten Dosis-Wirkungs-Kurven der Modellzelllinien und der humanen Astrozyten (links). Außerdem ist die geringere IC_{50} der Modellzelllinien im Vergleich zu humanen Astrozyten im Säulendiagramm zu erkennen (rechts).

3.2.4 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen abhängig von der Applikationsdauer

Um die Wirkung von Eribulin im Zeitverlauf zu untersuchen, wurde jeweils eine Modellzelllinie, eine Patientenzelllinie sowie die humanen Astrozyten zur Analyse der Messwerte nach 24, 48 und 72 Stunden ausgewählt. Es zeigte sich eine ansteigende antiproliferative Wirkung von Eribulin innerhalb der drei Zeitpunkte. Innerhalb aller untersuchten Zelllinien überschnitten sich die Konfidenzintervalle für die einzelnen Zeitpunkte nicht. Die einzelnen IC_{50} -Werte für jede Zelllinie sind in Abbildung 9 dargestellt.

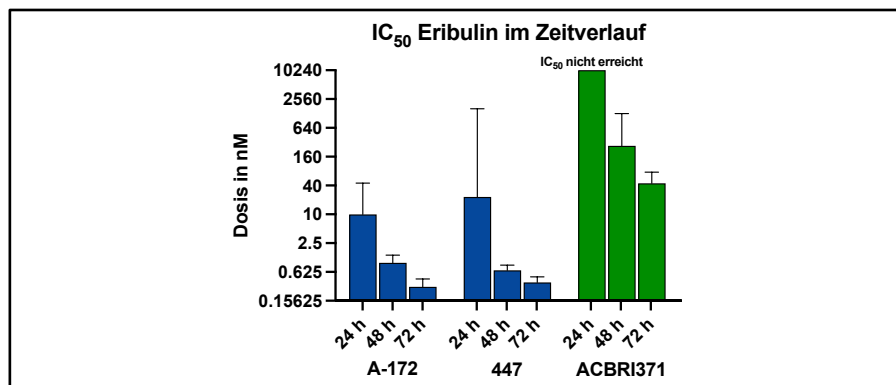


Abbildung 9: IC_{50} der Zelllinien A-172, 447 und der humanen Astrozyten im Zeitverlauf.

Die Abbildung zeigt die mittels Probit-Analyse errechneten IC_{50} -Werte sowie die zugehörigen 95 %-Konfidenzintervalle für die angegebenen Zelllinien zu je drei

unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Balken zeigen eine stetige Abnahme der IC_{50} im Zeitverlauf in allen untersuchten Zelllinien.

3.2.5 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen abhängig vom TERT-Promotor-Mutationsstatus

Zur Untersuchung der Frage, ob das Vorliegen einer Mutation im TERT-Promotor einen Unterschied in Bezug auf die antiproliferative Wirkung von Eribulin ausmacht, wurden die einzelnen Dosis-Wirkungs-Beziehungen mit den entsprechenden IC_{50} -Werten für jede Zelllinie berechnet und nach dem Vorliegen oder Fehlen einer Mutation sortiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt. Es fällt auf, dass Eribulin in allen Zelllinien, die eine TERT-Mutation aufweisen, eine stärkere antiproliferative Wirkung und damit eine niedrigere IC_{50} aufwies als in der Kontrollzelllinie 461, welche keine TERT-Mutation aufweist. Die Konfidenzintervalle aller Zelllinien mit positivem TERT-Promotor-Mutationsstatus überschritten sich nicht mit dem Konfidenzintervall der Vergleichszelllinie 461 mit negativem TERT-Promotor-Mutationsstatus.

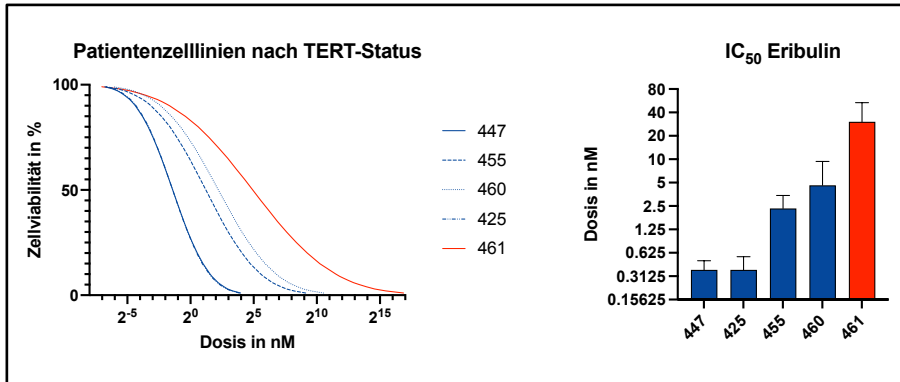


Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach TERT-Promotor-Mutationsstatus.

Dargestellt sind die mittels Probit-Analyse errechneten Dosis-Wirkungskurven für die TERT-positiven (blau) und die TERT-negativen (rot) Patientenzelllinien (links). Es ist zu erkennen, dass Eribulin in allen TERT-positiven Zelllinien eine stärkere antiproliferative Wirkung aufweist als in der TERT-negativen Vergleichszelllinie 461. Dies spiegelt sich auch in der IC₅₀-Darstellung im Säulendiagramm wider (rechts).

3.2.6 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen abhängig vom MGMT-Promotor-Methylierungsstatus

Des Weiteren wurde die Frage untersucht, ob das Vorliegen einer MGMT-Promotor-Methylierung zu einem Unterschied in der antiproliferativen Wirkung von Eribulin führt. Um die in dieser Untersuchung als Störvariable agierende TERT-Mutation zu eliminieren, wurde der Vergleich von MGMT-positiven und MGMT-negativen Zelllinien nur innerhalb der TERT-positiven Patientenzelllinien vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Es fällt auf, dass Eribulin in allen Zelllinien, die keine

MGMT-Promotormethylierung aufweisen, eine stärkere antiproliferative Wirkung und damit eine niedrigere IC_{50} aufwies, als in den Zelllinien, die einen positiven MGMT-Promotor-Methylierungsstatus aufweisen. Die Konfidenzintervalle aller MGMT-positiven Zelllinien überschritten sich nicht mit denen der MGMT-negativen Zelllinien.

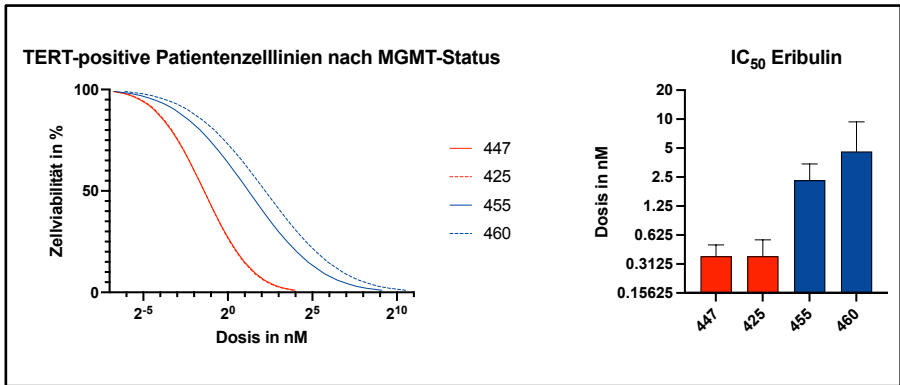


Abbildung 11: Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach MGMT-Promotor-Methylierungsstatus.

Dargestellt sind die mittels Probit-Analyse errechneten Dosis-Wirkungs-Kurven für die MGMT-positiven (blau) und die MGMT-negativen (rot) Zelllinien der TERT-positiven Subgruppe der Patientenzelllinien (links). Es ist zu erkennen, dass Eribulin in allen MGMT-negativen Zelllinien eine stärkere antiproliferative Wirkung aufwies als in den MGMT-positiven Zelllinien. Dies spiegelt sich auch in der IC_{50} -Darstellung im Säulendiagramm wider (rechts).

3.2.7 Eribulin erreicht ein vollständiges Ansprechen in humanen Glioblastom-Zelllinien

Um die Frage zu untersuchen, inwieweit Eribulin in der Lage ist, ein vollständiges Ansprechen in der Zellkultur zu erreichen, wurde mit je

einer Modellzelllinie und einer Patientenzelllinie sowie mit humanen Astrozytenzellen ein ausgeweiteter MTT-Assay mit Eribulin-Dosierungen bis 640 nM durchgeführt. Anschließend wurde die IC_{95} als Marker für ein vollständiges Ansprechen mittels Logit-Analyse errechnet. Eribulin war in beiden untersuchten Glioblastom-Zelllinien in der Lage, die IC_{95} zu überschreiten. Dabei lag die IC_{95} der Glioblastomzellen unterhalb der IC_{50} der humanen Astrozyten. In der humanen Astrozyten-Zelllinie wurde die IC_{95} im Experiment nicht überschritten. Dieser Umstand spiegelt sich im Ergebnis der Logit-Analyse wider. Die IC_{95} wurde in Werten von über 5000 nM geschätzt und gilt damit als nicht sinnvoll zu erreichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

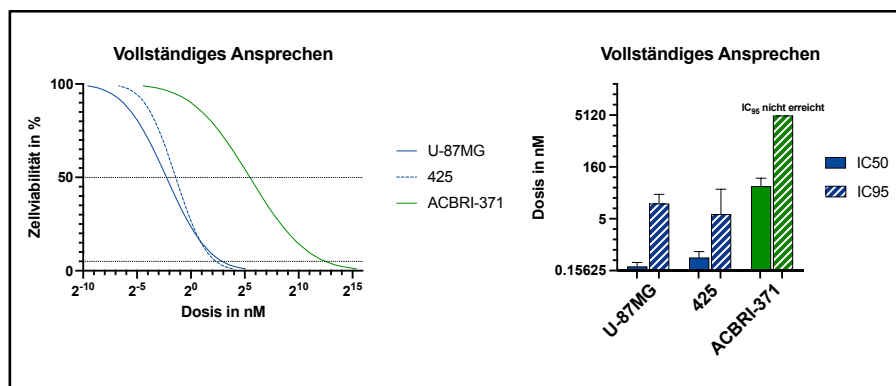


Abbildung 12: Eribulin erreicht ein vollständiges Ansprechen in humanen Glioblastomzellen.

Die Abbildung zeigt die mittels Logit-Analyse errechneten Dosis-Wirkungs-Kurven für die humanen Glioblastom-Zelllinien U-87MG und 425 sowie für humane Astrozytenzellen (links). Zusätzlich sind die Viabilitätswerte von 50 % und 5 % durch Parallelen zur x-Achse dargestellt, an deren Schnittpunkten mit den Graphen sich

die IC_{50} beziehungsweise IC_{95} jeder Zelllinie ablesen lassen. Des Weiteren zeigt die Abbildung für jede Zelllinie eine Gegenüberstellung der IC_{50} und der IC_{95} im Säulendiagramm (rechts).

3.2.8 Eribulin senkt die klonogene Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen

Mit Hilfe des Clonogenic Assay wurden die Auswirkungen von Eribulin auf die Vermehrungsfähigkeit humaner Glioblastomzellen erfasst. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Verringerung der klonogenen Zellfraktion durch Eribulin gegenüber der Kontrolle in allen untersuchten Zelllinien. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

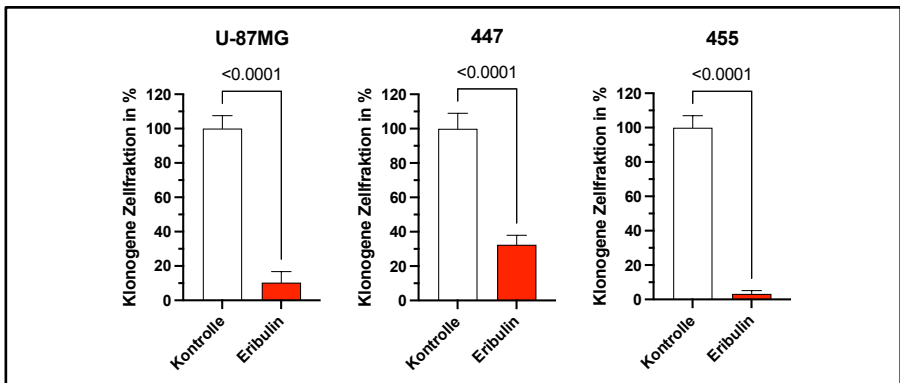


Abbildung 13: Eribulin senkt die klonogene Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der klonogenen Zellfraktion der Gruppen Eribulin und Kontrolle im Säulendiagramm für die angegebenen Zelllinien. Die Fehlerbalken zeigen eine Standardabweichung. Die Mittelwerte der Gruppen wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen. p -Werte unterhalb des Fehlerniveaus von

$\alpha = 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Darüber hinaus ist das Niveau der statistischen Signifikanz in der Abbildung verzeichnet.

3.2.9 Eribulin steigert die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen

Mit Hilfe von FACS wurden die Auswirkungen von Eribulin auf die Apoptose humaner Glioblastomzellen erfasst. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellfraktion durch Eribulin gegenüber der Kontrolle in allen untersuchten Zelllinien. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

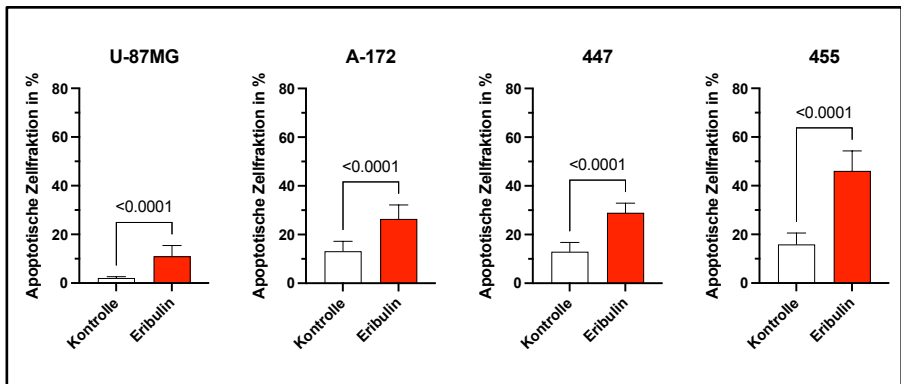


Abbildung 14: Eribulin steigert die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der apoptotischen Zellfraktion der Gruppen TTFields und Kontrolle im Säulendiagramm für die angegebenen Zelllinien. Die Mittelwerte der Gruppen wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen. p -Werte unterhalb des Fehlerniveaus von $\alpha = 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Darüber hinaus ist das Niveau der statistischen Signifikanz in der Abbildung verzeichnet.

3.3 Die Auswirkungen von TTFIELDS auf humane Glioblastomzellen

3.3.1 TTFIELDS senken die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen

Mit Hilfe von Zellzählung wurden die zytotoxischen Auswirkungen von TTFIELDS auf humane Glioblastomzellen erfasst. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Verringerung der überlebenden Zellfraktion durch TTFIELDS gegenüber der Kontrolle in allen untersuchten Zelllinien. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

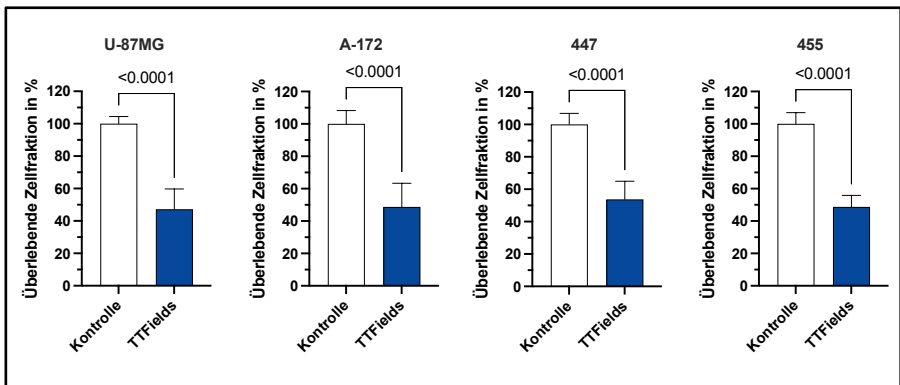


Abbildung 15: TTFIELDS senken die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der überlebenden Zellfraktion der Gruppen TTFIELDS und Kontrolle im Säulendiagramm für die angegebenen Zelllinien. Hierbei gelten Applikationsdauern der TTFIELDS-Behandlung von 36 h für die Zelllinien U-87MG und A-172, sowie von 72 h für die Zelllinien 447 und 455. Die Mittelwerte der Gruppen wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen. p -Werte unterhalb des Fehlerniveaus von $\alpha = 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

Darüber hinaus ist das Niveau der statistischen Signifikanz in der Abbildung verzeichnet.

3.3.2 TTFields senken die klonogene Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen

Mit Hilfe des Clonogenic Assays wurden die Auswirkungen von TTFields auf die Vermehrungsfähigkeit humaner Glioblastomzellen erfasst. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Verringerung der klonogenen Zellfraktion durch TTFields gegenüber der Kontrolle in allen untersuchten Zelllinien. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

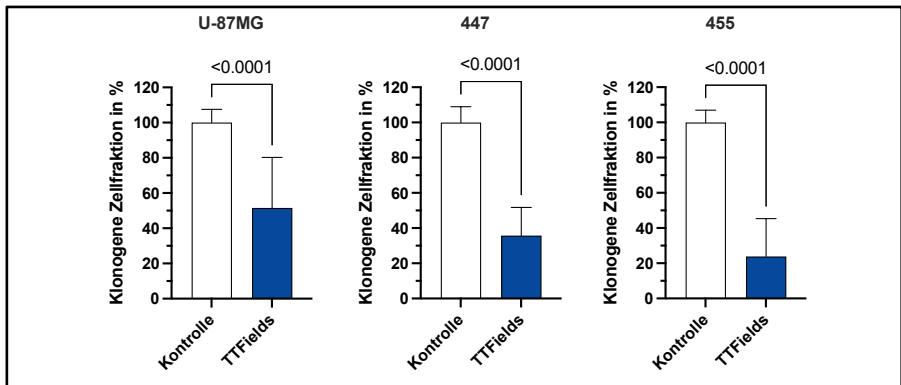


Abbildung 16: TTFields senken die klonogene Zellfraktion von humanen Glioblastomzellen.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der klonogenen Zellfraktion der Gruppen TTFields und Kontrolle im Säulendiagramm für die angegebenen Zelllinien. Die Mittelwerte der Gruppen wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen. p -Werte unterhalb des Fehlerniveaus von $\alpha = 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Darüber hinaus ist das Niveau der statistischen Signifikanz in der Abbildung verzeichnet.

3.3.3 TTFIELDS steigern die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen

Mit Hilfe von FACS wurden die Auswirkungen von TTFIELDS auf die Apoptose humaner Glioblastomzellen erfasst. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellfraktion durch TTFIELDS gegenüber der Kontrolle in allen untersuchten Zelllinien. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

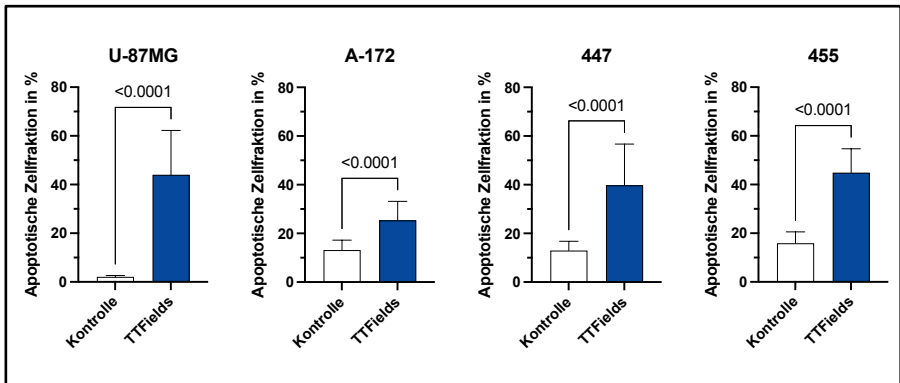


Abbildung 17: TTFIELDS steigern die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der apoptotischen Zellfraktion der Gruppen TTFIELDS und Kontrolle im Säulendiagramm für die angegebenen Zelllinien. Die Mittelwerte der Gruppen wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen. p -Werte unterhalb des Fehlerniveaus von $\alpha = 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Darüber hinaus ist das Niveau der statistischen Signifikanz in der Abbildung verzeichnet.

3.4 Die Wirksamkeit von Eribulin in Kombination mit TTFields in humanen Glioblastomzellen

3.4.1 Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen

Mit Hilfe von Zellzählung wurden die zytotoxischen Auswirkungen der Kombination von Eribulin und TTFields auf humane Glioblastomzellen erfasst. Es zeigte sich eine statistisch signifikant stärkere Verringerung der überlebenden Zellfraktion durch die Kombinationsbehandlung gegenüber den Einzelbehandlungen in allen untersuchten Zelllinien. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

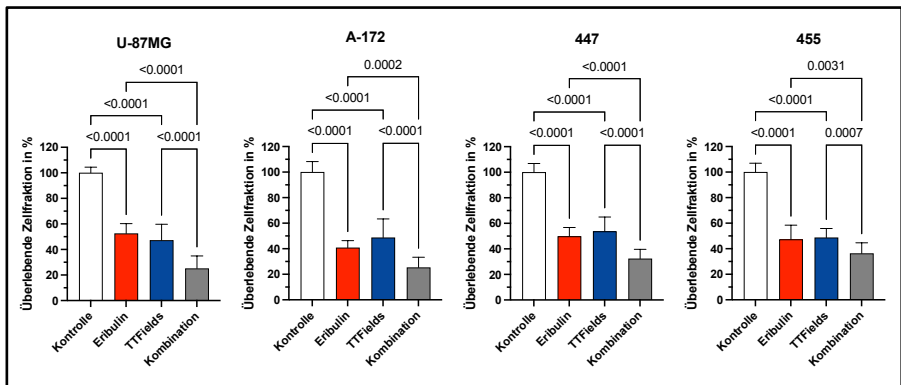


Abbildung 18: Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der überlebenden Zellfraktion der Gruppen Eribulin, TTFields, Kombination und Kontrolle im Säulendiagramm für die

angegebenen Zelllinien. Hierbei gelten Eribulin-Dosierungen entsprechend der IC_{50} für die Zelllinien A-172, 447 und 455 sowie in Höhe von drei Viertel der IC_{50} für die Zelllinie U-87MG. Darüber hinaus gelten Applikationsdauern der TTFields-Behandlung von 36 h für die Zelllinien U-87MG und A-172, sowie von 72 h für die Zelllinien 447 und 455. Die Mittelwerte der Gruppen wurden mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse gefolgt von einem Bonferroni-Test verglichen. p -Werte unterhalb des Fehlerniveaus von $\alpha = 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Darüber hinaus ist das Niveau der statistischen Signifikanz in der Abbildung verzeichnet.

3.4.2 Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen mit Tendenz zur Abhängigkeit von der Verdopplungszeit

Zunächst wurde nach dem unter Zellzählung beschriebenen Vorgehen die Verdopplungszeit für jede Zelllinie berechnet. Anschließend wurden die Daten zur überlebenden Zellfraktion nach TTFields-Behandlung gegen die Verdopplungszeit der untersuchten Zelllinie aufgetragen und einer linearen Regressionsanalyse unterzogen. Es ließ sich der Trend erkennen, dass eine höhere Verdopplungszeit stets mit einer höheren überlebenden Zellfraktion einher ging. Die lineare Regressionsanalyse ergab jedoch eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,0830$, womit die lineare Beziehung von Verdopplungszeit und überlebender Zellfraktion nach Kombinationsbehandlung keine statistische Signifikanz zum Niveau von $\alpha = 0,05$ erreichte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 und Abbildung 19 dargestellt.

Tabelle 9: Mittelwerte der Verdopplungszeit mit 95 %-Konfidenzintervallen

Zelllinie	Verdopplungszeit	Untere Grenze	Obere Grenze
	in d	95 %-KI	95 %-KI
U-87MG	0,99	0,96	1,02
A-172	1,16	1,04	1,28
447	2,00	1,64	2,36
455	3,17	2,21	4,12

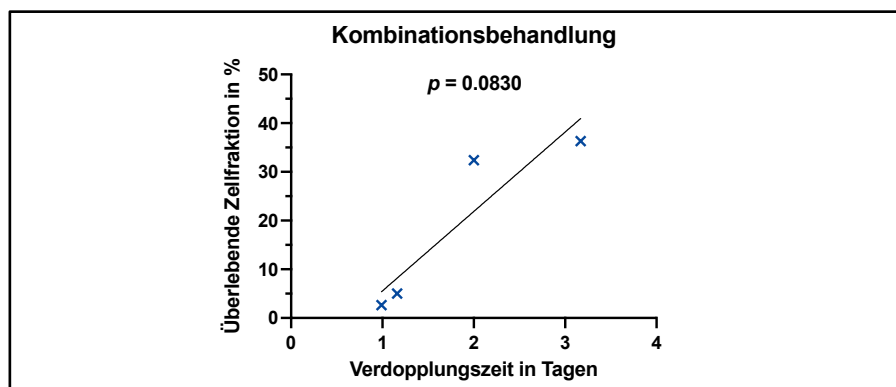


Abbildung 19: Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen mit Tendenz zur Abhängigkeit von der Verdopplungszeit.

Die Abbildung zeigt je einen Datenpunkt zur überlebenden Zellfraktion in Abhängigkeit von der Verdopplungszeit für die Zelllinien U-87MG, A-172, 447 und 455 mit einer zugehörigen Trendlinie. Die Applikationsdauer der TTFields-Behandlung betrug in allen Zelllinien 72 h.

3.4.3 Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die klonogene Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen in Abhängigkeit von der Zelllinie

Mit Hilfe des Clonogenic Assays wurden die Auswirkungen der Kombination von Eribulin und TTFields auf die Vermehrungsfähigkeit humaner Glioblastomzellen erfasst. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Verringerung der klonogenen Zellfraktion durch die Kombinationsbehandlung gegenüber der TTFields-Behandlung in allen Zelllinien. Darüber hinaus zeigte sich eine statistisch signifikante Verringerung der klonogenen Zellfraktion durch die Kombinationsbehandlung gegenüber der Eribulin-Behandlung in den Zelllinien U-87MG und 447. In der Zelllinie 455 waren die Mittelwerte der Kombinationsbehandlung zwar kleiner oder gleich dem jeweiligen Mittelwert der Eribulin-Behandlung, es wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

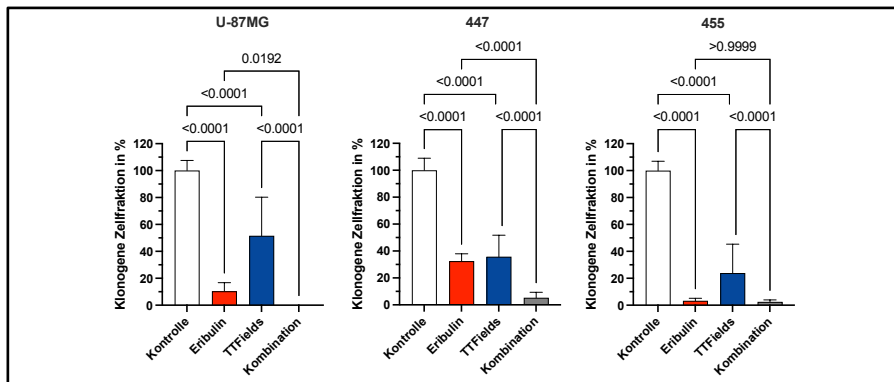


Abbildung 20: Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die klonogene Zellfraktion humaner Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen in Abhängigkeit von der Zelllinie.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der klonogenen Zellfraktion der Gruppen Eribulin, TTFields, Kombination und Kontrolle im Säulendiagramm für die angegebenen Zelllinien. Die Mittelwerte der Gruppen wurden mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse gefolgt von einem Bonferroni-Test verglichen. p -Werte unterhalb des Fehlerniveaus von $\alpha = 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Darüber hinaus ist das Niveau der statistischen Signifikanz in der Abbildung verzeichnet.

3.4.4 Die Kombination von Eribulin und TTFields steigert die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen

Mit Hilfe von FACS wurden die Auswirkungen der Kombination von Eribulin und TTFields auf die Apoptose humaner Glioblastomzellen erfasst. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellfraktion durch die Kombinationsbehandlung gegenüber den Einzeltherapien in allen untersuchten Zelllinien. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

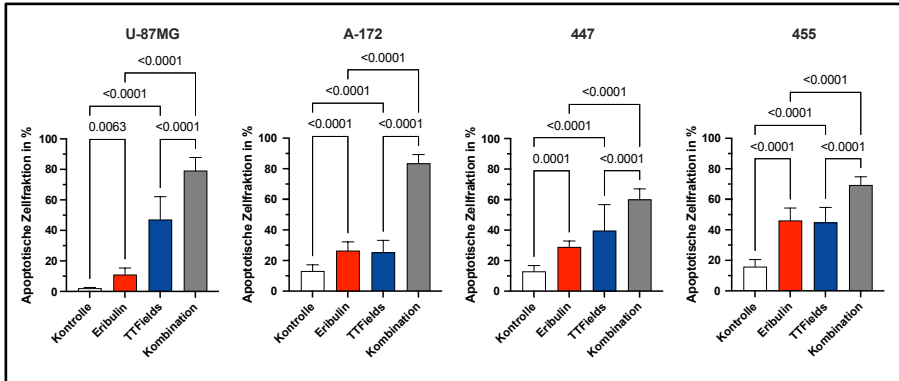


Abbildung 21: Die Kombination von Eribulin und TTFields steigert die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der apoptotischen Zellfraktion der Gruppen Eribulin, TTFields, Kombination und Kontrolle im Säulendiagramm für die angegebenen Zelllinien. Die Mittelwerte der Gruppen wurden mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse gefolgt von einem Bonferroni-Test verglichen. p -Werte unterhalb des Fehlerniveaus von $\alpha = 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Darüber hinaus ist das Niveau der statistischen Signifikanz in der Abbildung verzeichnet.

3.4.5 Eribulin und TTFields zeigen additive sowie unteradditive Kombinationseffekte in humanen Glioblastomzellen

Um die gezeigte Steigerung der Wachstumshemmung durch die Kombinationsbehandlung in ihrem Ausmaß bewerten zu können, wurde auf Basis der Daten zur überlebenden Zellfraktion eine Interaktionsanalyse mit Berechnung der Kombinationsindices durchgeführt. In dem hier verwendeten Modell galt der Kombinationseffekt der Therapiemodalitäten Eribulin und TTFields

als additiv, wenn das Konfidenzintervall den Wert 1 einschloss. Lag das Konfidenzintervall vollständig oberhalb von 1, galt der Kombinationseffekt als unteradditiv, lag es vollständig unterhalb von 1, so galt der Kombinationseffekt als überadditiv und damit synergistisch. Die Ergebnisse der Interaktionsanalyse sind in Abbildung 22 graphisch als Scatter-Dot-Plot gezeigt.

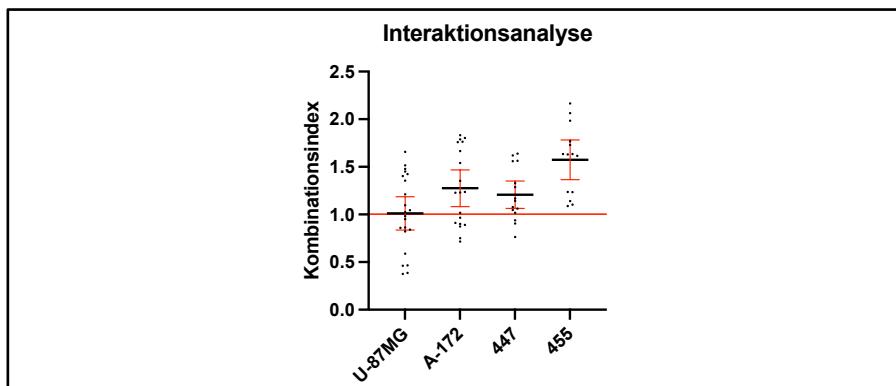


Abbildung 22: Ergebnisse der Interaktionsanalyse mit Berechnung der Kombinationsindices.

Die Abbildung zeigt die mittleren Kombinationsindices mit den zugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen für die Zelllinien U-87MG, A-172, 477 und 455. Konfidenzintervalle oberhalb der roten Markierungslinie repräsentieren einen unteradditiven Kombinationseffekt, Konfidenzintervalle unterhalb der roten Markierungslinie repräsentieren einen überadditiven, synergistischen Kombinationseffekt und Konfidenzintervalle, welche die rote Markierungslinie einschließen, repräsentieren einen additiven Kombinationseffekt.

3.5 Die Wirksamkeit von Eribulin und TTFields in humanen Gliosarkomzellen

3.5.1 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Gliosarkomzellen

Analog zu den Untersuchungen im Glioblastom wurde auch für die humanen Gliosarkomzellen der Zelllinie NCE-G-28 ein Dosis-Wirkungs-Profil für Eribulin errechnet. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine starke antiproliferative Wirkung auf Gliosarkomzellen von Eribulin mit einer IC_{50} im nanomolaren Bereich. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

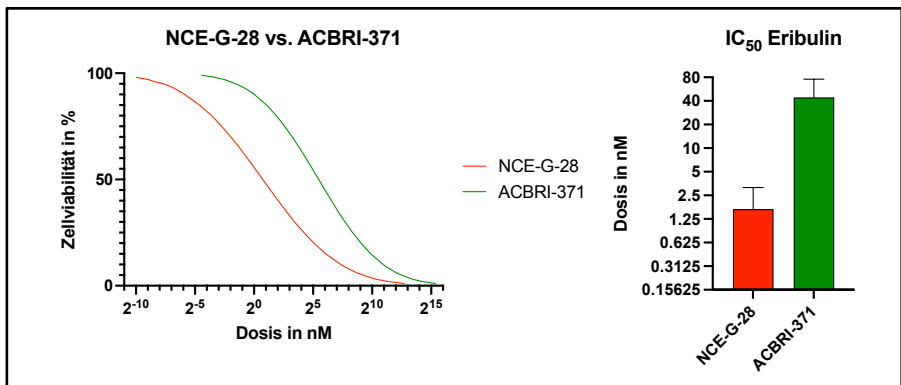


Abbildung 23: Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Gliosarkomzellen.

Die Abbildung zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve für die Zelllinie NCE-G-28 (links). Zur besseren Einordnung der antiproliferativen Wirkung von Eribulin auf NCE-G-28-Zellen ist die zuvor bereits vorgestellte Kurve der humanen Astrozyten ebenfalls dargestellt. Außerdem sind die IC_{50} -Werte beider Zelllinien im Säulendiagramm gegenübergestellt (rechts).

3.5.2 TTFields senken die überlebende Zellfraktion in humanen Gliosarkomzellen

Mit Hilfe von Zellzählung wurden die zytotoxischen Auswirkungen von TTFields auf humane Gliosarkomzellen erfasst. Analog zum Glioblastom zeigte sich eine statistisch signifikante Verringerung der überlebenden Zellfraktion nach TTFields-Behandlung gegenüber der Kontrolle. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

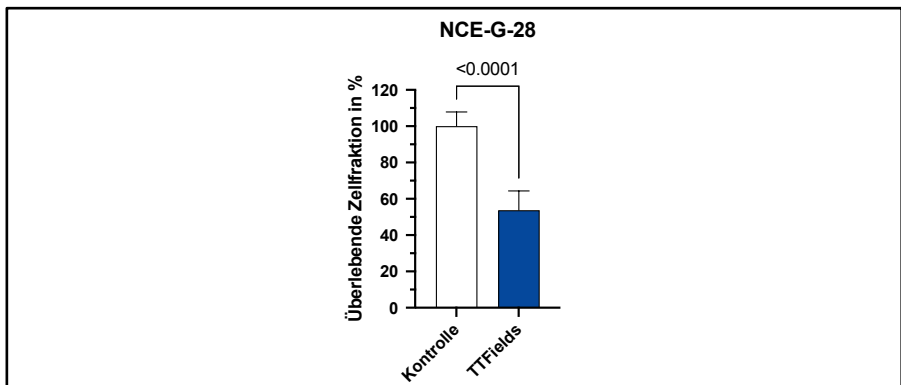


Abbildung 24: TTFields senken die überlebende Zellfraktion in humanen Gliosarkomzellen.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der überlebenden Zellfraktion der Zelllinie NCE-G-28 in den Gruppen TTFields und Kontrolle im Säulendiagramm. Die Mittelwerte der Gruppen wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen. p -Werte unterhalb des Fehlerniveaus von $\alpha = 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Darüber hinaus ist das Niveau der statistischen Signifikanz in der Abbildung verzeichnet.

3.5.3 Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Gliosarkomzellen

Mit Hilfe von Zellzählung wurden die zytotoxischen Auswirkungen der Kombination von Eribulin und TTFields auf humane Gliosarkomzellen erfasst. Analog zum Glioblastom zeigte sich eine statistisch signifikante Verringerung der überlebenden Zellfraktion nach Kombinationsbehandlung gegenüber beiden Einzelbehandlungen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.

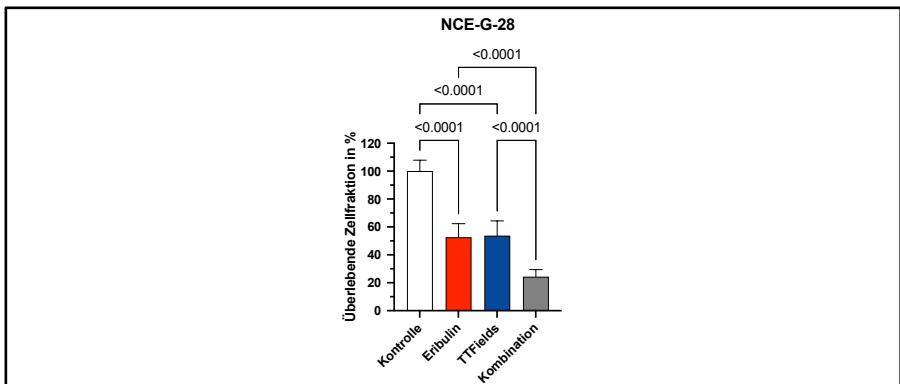


Abbildung 25: Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Gliosarkomzellen.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der überlebenden Zellfraktion der Zelllinie NCE-G-28 in den Gruppen Eribulin, TTFields, Kombination und Kontrolle im Säulendiagramm. Die Mittelwerte der Gruppen wurden mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse gefolgt von einem Bonferroni-Test verglichen. p -Werte unterhalb des Fehlerniveaus von $\alpha = 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Darüber hinaus ist das Niveau der statistischen Signifikanz in der Abbildung verzeichnet.

3.5.4 Eribulin und TTFelds zeigen einen synergistischen Kombinationseffekt in humanen Gliosarkomzellen

Um die gezeigte Steigerung der Wachstumshehmung durch die Kombinationsbehandlung in ihrem Ausmaß bewerten zu können, wurde auf Basis der Daten zur überlebenden Zellfraktion analog zum Vorgehen im Glioblastom in Kapitel 3.4.5 eine Interaktionsanalyse mit Berechnung der Kombinationsindices durchgeführt. Die Ergebnisse der Interaktionsanalyse sind in Abbildung 26 graphisch als Scatter-Dot-Plot gezeigt.

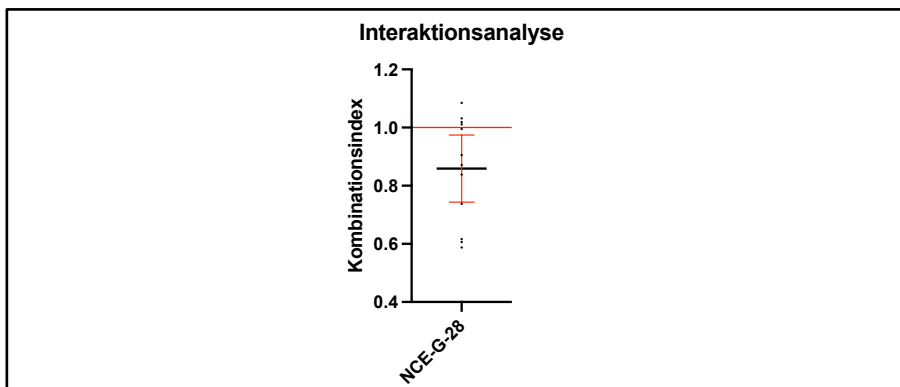


Abbildung 26: Ergebnisse der Interaktionsanalyse mit Berechnung des Kombinationsindex.

Die Abbildung zeigt den mittleren Kombinationsindex mit zugehörigem 95 %-Konfidenzintervallen für die Gliosarkom-Zelllinie NCE-G-28. Es ist zu erkennen, dass das Konfidenzintervall der Zelllinie NCE-G-28 vollständig unterhalb der roten Markierungslinie liegt, was einen überadditiven, synergistischen Kombinationseffekt anzeigt.

3.6 Produkt-Moment-Korrelationen zwischen den erfassten Messgrößen

Für alle erfassten Messgrößen wurden in jeder Zelllinie und jeder Therapiegruppe die Mittelwerte gesammelt und anschließend Pearson-Korrelationskoeffizienten zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen je zwei erfassten Messgrößen berechnet. Es zeigten sich ohne Ausnahme signifikant positive Korrelationen zwischen der überlebenden Zellfraktion und der klonogenen Zellfraktion sowie ohne Ausnahme signifikant negative Korrelationen zwischen der apoptotischen Zellfraktion und beiden anderen Messgrößen, die jeweils auf dem Niveau von $\alpha = 0,0001$ signifikant waren. Die zugehörigen Punktdiagramme sind in Abbildung 27 dargestellt.

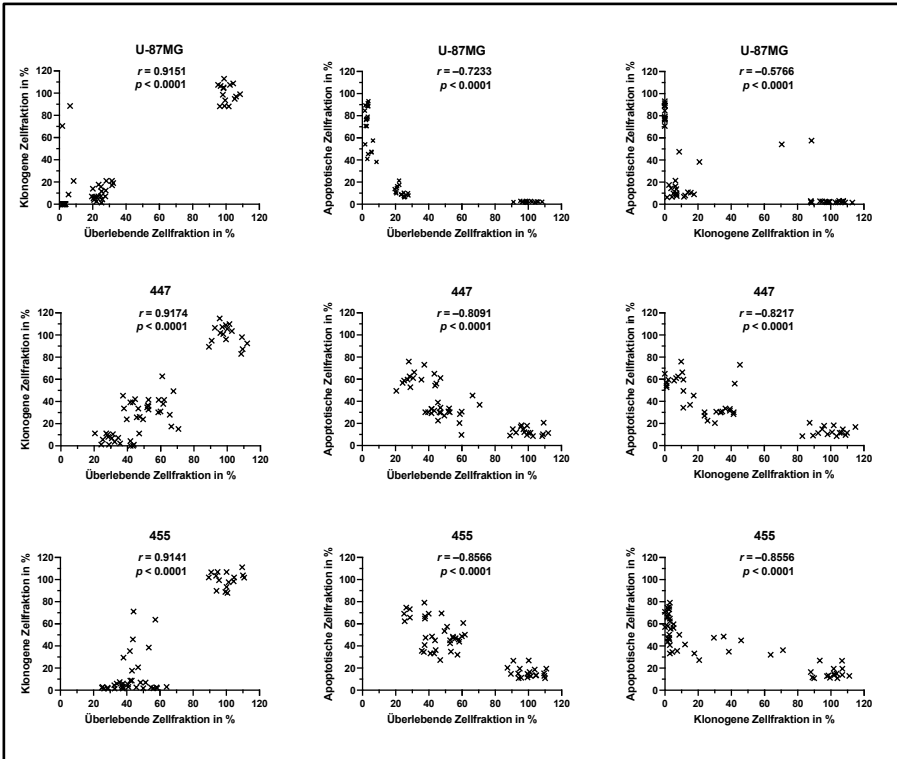


Abbildung 27: Produkt-Moment-Korrelationen der erfassten Messgrößen nach Zelllinien.

Die Abbildung zeigt für die Zelllinien U-87MG, 447 und 455 die Pearson-Korrelationsanalysen der Wertepaare aus je zwei erfassten Messgrößen. Die Pearson-Korrelationskoeffizienten r und die zugehörigen Irrtumswahrscheinlichkeiten p sind angezeigt.

4 Diskussion

4.1 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die Fragestellung und das Ziel der vorliegenden Arbeit können vor dem Hintergrund der vorgestellten Ergebnisse als beantwortet beziehungsweise erreicht angesehen werden.

Es galt zunächst, das Potenzial der Substanz Eribulin zur systemischen Therapie des Glioblastoms experimentell zu bewerten und eine Beeinflussung seiner Wirkung durch die Biomarker TERT und MGMT zu untersuchen. Alle sich daraus ergebenden Leitfragen, die in Kapitel 1.6 formuliert wurden, konnten durch die errechneten Dosis-Wirkungs-Beziehungen und die Ermittlung der jeweiligen IC_{50} beantwortet werden.

Darauf aufbauend sollte die Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung von Eribulin mit der modernen Therapiemodalität TTFields abgeschätzt und der Kombinationseffekt beider Behandlungsformen bewertet werden. Auch in diesem Teil der vorliegenden Arbeit konnten alle zuvor gestellten Fragen ausführlich beantwortet werden mit dem Ergebnis, dass Eribulin eine vielversprechende Partnersubstanz für die klinische Anwendung in Kombination mit TTFields sein könnte.

Schließlich sollten erstmalig Untersuchungen angestellt werden, inwieweit sich die im Glioblastom gefundene antiproliferative Wirkung beider Therapiemodalitäten auf das Gliosarkom übertragen lässt. Hierzu wurden erste Erkenntnisse gewonnen und die vorgestellten

Leitfragen konnten beginnend beantwortet werden. Damit aus diesen eine allgemeingültige Beurteilung abgeleitet werden kann, müssen zukünftig weitere Untersuchungen am Gliosarkom erfolgen.

In der Zukunft bleibt die Frage zu untersuchen, inwieweit sich die vielversprechenden experimentellen Erkenntnisse in Bezug auf Aspekte wie ZNS-Penetration und Nebenwirkungen in die klinische Anwendung übertragen lassen. Andere Arbeitsgruppen haben hierzu bereits vielversprechende experimentelle Ergebnisse präsentiert, sodass zukünftig eine Evaluation der Kombination beider Therapiemodalitäten zur Behandlung von Patienten mit Glioblastom angezeigt ist.

4.2 Material und Methoden

Im Folgenden sollen Limitationen, welche die verwendeten Materialien und Methoden mit sich brachten, aufgezeigt und deren Relevanz für die Untersuchungsergebnisse diskutiert werden.

4.2.1 MTT-Assay

Grundsätzlich ist der MTT-Assay nicht die einzige Möglichkeit, um Dosis-Wirkungs-Beziehungen und die IC_{50} eines Pharmakons zu ermitteln. Es gibt eine Vielzahl von Cell Viability Assays, die zur Untersuchung solcher Fragestellungen eingesetzt werden können. Der Adenosintriphosphat-Assay ist mit Abstand am sensitivsten, beinhaltet nur wenige Schritte, ist am schnellsten durchzuführen und weist die geringste Interferenz auf. In der Gruppe der

Tetrazolium-Reduktion-Assays stellt die Verwendung von MTT als positiv geladenes, membranpenetrierendes Reaktionsmolekül die klassische Variante dar. Die neueren Tetrazolium-Derivate wie 5-(2,4-disulfophenyl)-2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazolium (WST) sind negativ geladen und lassen sich direkt im Kulturmedium der Zellen lösen, was den Assay grundsätzlich einfacher und durch den nicht benötigten Schritt der Löslichkeitshandhabung mit Hilfe eines zweiten Reagenzes weniger fehleranfällig macht. Allerdings sind die neueren Tetrazolium-Derivate nicht in der Lage, die Zellmembran selbstständig zu penetrieren, sodass ein intermediärer Elektronenakzeptor wie Phenazin-Methylsulfat oder Phenazin-Ethylsulfat benötigt wird. Diese sind potenziell zelltoxisch, sodass eine Optimierung für die verwendeten Zelltypen und die individuellen Testbedingungen erforderlich sein kann. Hierbei gibt es häufig nur einen engen Konzentrationsbereich des Zwischenelektronenakzeptors, der zu einer optimalen Leistung führt, was die Verfahren riskanter macht. (Riss et al., 2004) Da es sich beim MTT-Assay um ein jahrelang erprobtes und vielfach eingesetztes, risikoarmes, sowie kostengünstiges Verfahren zur Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen an Zellkulturen handelt, wurde es auch in dieser Arbeit zur Methode der Wahl.

4.2.2 inovitro™-System

Es muss angemerkt werden, dass die Zellen der TTFields-Gruppen und die Zellen der Kontrollgruppen nicht innerhalb desselben Materials bezüglich der Petrischalen behandelt wurden. Die Zellen

der Kontrollgruppen wurden in 6-Well-Platten aus Plastik zur Einwegbenutzung behandelt, während die TTFields-Gruppen in den wiederverwendbaren Petrischalen des inovitro™-Systems aus Keramik behandelt wurden. Aus diesem Grund wurde vor Beginn der Experimente eine Bioäquivalenzuntersuchung in analogem Vorgehen zum Protokoll des Hauptexperimentes ohne wachstumshemmende Behandlungen durchgeführt und mittels MTT-Assay ausgewertet. Anhand der der Extinktionswerte beider Petrischalen-Typen konnte in einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ ein etwaiger Unterschied im Wachstumsverhalten ausgeschlossen werden konnte.

Darüber hinaus wurde im Laufe der Experimente die Beobachtung gemacht, dass das inovitro™-System nicht in der Lage war, an jedem Dish exakt gleiche elektrische Spannungen anzulegen. Diese schwankten über alle Dishes hinweg in einem Bereich von etwa 22 V bis 28 V und änderten sich auch im selben Dish über die Zeit. Da es sich bei diesem Phänomen um eine nicht beeinflussbare Geräteeigenschaft handelte, war es die einzig adäquate Form, mit dieser Schwankung umzugehen, die Dishes zufällig auf die vorgesehenen Anschlussplätze auf den Platten des inovitro™-Systems zu verteilen. So konnte eine mögliche ortsabhängige Varianz innerhalb des Systems zwischen den TTFields-Gruppen randomisiert und eine Kontrolle der beschriebenen Störvariable erreicht werden.

4.2.3 Zellzählung

In den Untersuchungen zur Auswirkung der Therapiemodalitäten Eribulin und TTFields in humanen Glioblastomzellen wurde das automatische Zytometer Scepter™ verwendet. Diese Messmethode bringt einige Vor- und Nachteile mit sich.

Auf der einen Seite bietet der Scepter™ eine schnell verfügbare Zellzählung, die keinerlei weitere Vorbereitungsschritte an der zu messenden Probe benötigt. Daher konnten die Proben unmittelbar nach der Ernte von den Deckgläschen gemessen werden. So konnte verhindert werden, dass weitere Zeit verging, in der die Zellen beispielsweise durch Trypsin hätten geschädigt werden können oder ein therapiebedingter Zellzerfall hätte stattfinden können.

Auf der anderen Seite waren die Messwerte des Scepter™ direkt von der Verlässlichkeit der Trypsinisierung der Zellen abhängig. Um gleiche Bedingungen in jeder Probe herzustellen, mussten sowohl alle Zellen vom Deckgläschen abgelöst werden als auch alle Zell-Zell-Kontakte gelöst werden, sodass alle in der Probe befindlichen Zellen einzeln in der Suspension vorlagen. Die Gewährleistung dieser Bedingungen ist keineswegs trivial, da sie eine ständige mikroskopische Kontrolle sowie ein zellschonendes Vorgehen benötigt. Als Limitation dieser Methode ist sicherlich die Dauer der Trypsinisierung anzusehen, die nicht beliebig gesteigert werden darf, da das Trypsin die Viabilität der Zellen bei zu langer Anwendung beeinflusst. Bedenkt man zusätzlich die unterschiedlichen Ausprägungen der Zell-Zell- und

Zell-Material-Kontakte der verschiedenen Zelllinien, so wird schnell klar, dass die Trypsinisierung die entscheidende Einflussgröße in der Methode der Zellzählung darstellt, die vermutlich eine gegenüber dem Zufall erhöhte Varianz in den erfassten Messdaten mit sich bringt.

4.2.4 Clonogenic Assay

Der Clonogenic Assay ist ein störanfälliges Verfahren, dessen Aussagekraft jedoch besonders hoch ist, sofern es korrekt durchgeführt wird.

Die starke Störanfälligkeit hängt vor allem mit der sehr geringen zu verwendenden Zellzahl von 500 Zellen je Probe zusammen, die aus Suspensionen mit völlig unterschiedlichen Zellkonzentrationen entnommen werden muss. So musste etwa aus einer Probe der Kombinationsbehandlung häufig ein sehr großes Volumen entnommen werden, damit 500 Zellen darin enthalten waren, während aus der Kontrollgruppe nicht selten ein um den Faktor 100 geringeres Volumen entnommen werden musste. Dass es bei derartig unterschiedlichen Zellkonzentrationen nicht zu relevanten Abweichungen von der Zielgröße von 500 Zellen kommt, erfordert sehr präzises Arbeiten.

Eine weitere Störanfälligkeit dieses Verfahrens besteht in der Ungleichbehandlung von Proben mit stark verschiedenen Zellkonzentrationen, zu der es zwangsläufig kommt, wenn man die Trypsinkonzentration in jeder ausplattierten Probe annähernd konstant halten will. So konnten beispielsweise Zellen aus der

Kontrollgruppe nach der Ernte ohne weitere Zwischenschritte ausplattiert werden, während Zellen aus Gruppen mit deutlich niedrigeren Zellkonzentrationen zunächst einer Zentrifugation mit anschließendem Absaugen des Überstandes unterzogen werden mussten.

Darüber hinaus besteht eine direkte Abhängigkeit zwischen der Genauigkeit des Clonogenic Assay mit der zuvor durchgeführten Zellzählung, da diese für die Ausplattierung der Kolonie-Zellen benötigt wird. So erhält der Clonogenic Assay als der Zellzählung nachgeschaltetes Verfahren eine zusätzliche Störanfälligkeit, da alle Limitationen, die für die Zellzählung gelten, somit auch den Clonogenic Assay betreffen.

Schließlich ist die Auswertung des Clonogenic Assay ebenfalls nicht trivial, sondern erfordert ein präzises und reliables Vorgehen der Untersucher. Dies zeigt sich an der Schwierigkeit, den Zeitpunkt abzugleichen, an dem in der Kontrollgruppe die mittlere Koloniegröße gerade bei 50 Zellen je Kolonie liegt und die Indikation zur Färbung aller zugehörigen Platten gegeben ist. Werden die Kolonien erst später gefärbt, so kann es bereits zu einer Verzerrung der klonogenen Fraktion in den Therapiegruppen kommen, da sich in der Kontrolle mehr Kolonien mit einer Größe von mehr als 50 Zellen gebildet haben. Um diese Verzerrung zu vermeiden, müssen die Kolonien mehrmals täglich auf ihre durchschnittliche Größe hin ausgezählt werden, was in 6-Well-Platten ohne hinterlegte Zählmatrix ebenfalls als störanfälliges Vorgehen einzustufen ist.

Dem gegenüber steht ein bei korrekter Durchführung sehr aussagekräftiges Verfahren, das im Gegensatz zur Zellzählung und zur FACS nicht nur eine Momentaufnahme der Proben nach Therapieende darstellt, sondern einen zellulären Prozess von bis zu 3 Wochen Dauer abbildet. So spiegelt ein ausgewerteter Clonogenic Assay das Verhalten einer Zellpopulation über einen langen Zeitraum nach abgeschlossener Therapie wider und erfasst damit auch später zu Grunde gehende Zellen mit, die etwa in der FACS noch als vital erkannt wurden. Diese hohe zeitliche Auflösung macht den Clonogenic Assay zu einem äußerst wichtigen und aussagekräftigen Bestandteil der vorliegenden Arbeit, auch wenn er gewisse Limitationen aufweist.

4.2.5 FACS

Die klassische Färbemethode für die Analyse des Zelltods verwendet neben dem in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Annexin V noch aus Propidiumiodid zur Erfassung der Zellen mit permeablen Membranen. Aufgrund von durch Propidiumiodid hervorgerufenen Limitationen für die Gerätewartung konnte der Farbstoff in dieser Arbeit nicht eingesetzt werden, sodass eine Differenzierung in frühe Apoptose und späte Apoptose beziehungsweise Nekrose hier nicht durchgeführt wurde. In der Zukunft müssen daher weitere Untersuchungen mit beiden Farbstoffen durchgeführt werden, um eine genauere Analyse des Zelltods nach Behandlung mit Eribulin und TTFelds zu ermöglichen.

4.2.6 Reagenzien

Die Halaven®-Injektionslösung ist grundsätzlich für den Einmalgebrauch konzipiert, es sind keine Präparate geringerer Volumina für den Forschungsgebrauch auf dem Markt verfügbar. Der Hersteller macht keine Angaben zur Haltbarkeit der angebrochenen Lösung in der Durchstechflasche über einen längeren Zeitraum. Spindeldreier et al. fanden in Stabilitätstests, dass die Konzentration von Eribulinmesylat über einen Zeitraum von 28 Tagen unabhängig von Konzentration, Containermaterial und Lagerungstemperatur unverändert blieb (Spindeldreier et al., 2014). Nicht zuletzt aufgrund des hohen Produktpreises der Halaven®-Injektionslösung wurde die Lösung vor dem Hintergrund der besseren Umsetzbarkeit über 6 Monate für die Untersuchungen verwendet. Hierzu wurden Teile der Lösung in sterile Eppendorfgeläße abgefüllt, um das Verunreinigungsrisiko zu minimieren. Die Wirksamkeit des Eribulins wurde während des Untersuchungszeitraums in mehreren internen Wirksamkeitskontrollen sichergestellt. Hierzu wurden MTT-Assays an bereits untersuchten Zelllinien wiederholt und die Ergebnisse miteinander korreliert. Auf diese Weise konnte ein Wirksamkeitsverlust der angebrochenen Injektionslösung ausgeschlossen werden.

4.2.7 Interaktionsanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktionsanalyse in einer abgewandelten Form nach Valeriote durchgeführt. Diese häufig

angewandte Methode ist jedoch nicht die aussagekräftigste, wie eine Analyse von Gregoriadis ergab (Gregoriadis, 2006). Im Jahr 1984 entwickelten Chou und Talalay ein komplexeres Modell zur Bewertung der Therapieeffekte von Kombinationsmodellen (Chou, 2006). Dieses basiert auf Dosis-Wirkungs-Beziehungen sowohl für die verwendeten Einzelbehandlungen als auch für die Kombinationsbehandlung, welche idealerweise zum selben Zeitpunkt ermittelt werden sollen. Daraus errechnet die von Chou publizierte und der Öffentlichkeit kostenlos zur Verfügung gestellte Software CompuSyn den sogenannten Combination Index, der den zugrunde liegenden Mechanismus des Zusammenwirkens beider Therapiefaktoren analog zur in der vorliegenden Arbeit verwendeten Definition bewertet.

Allerdings berechnet die von Chou entwickelte Software nicht nur die Dosis-Wirkungs-Beziehungen aller drei Therapieformen und den zugehörigen Combination Index, sondern auch weitere mathematische Konstrukte zur Bewertung des Zusammenwirkens von Therapiefaktoren. Diese sind beispielsweise das Isobologramm, welches als eine graphische Darstellung des Combination Index verstanden werden kann, und der Dose Reduction Index (DRI), der ein Maß für die Erhöhung der antiproliferativen Wirkung des einen Therapiefaktors ist, welche durch die kombinierte Anwendung mit dem anderen Therapiefaktor herbeigeführt wird. Die erhöhte Komplexität sowie der erhöhte Informationsgehalt der Methode von Chou legen nahe, dass deren Bewertung des Zusammenwirkens

zweier Therapiefaktoren eine größere Aussagekraft hat, als die Methode von Valeriotte.

Ein weiterer Kritikpunkt an der Methode von Valeriotte ist, dass es bei Unkenntnis der Dosis-Wirkungs-Beziehungen der einzelnen Therapiefaktoren zu einer Fehlbewertung des Kombinationseffektes kommen kann. Als Ursache dafür wird von Tiedge die mathematische Natur nicht-linearer Dosis-Wirkungs-Beziehungen angeführt (Tiedge, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der besseren Umsetzbarkeit jedoch auf die Methode von Valeriotte zurückgegriffen, welche wesentlich weniger eingegebene Datenpunkte benötigt, aber dennoch ein etabliertes Verfahren auf diesem Gebiet darstellt, wie zahlreiche Publikationen der letzten Jahre aus der Forschung zu TTFields-Kombinationsmodellen belegen (Giladi et al., 2017; E. H. Kim et al., 2016; Lee et al., 2019). Es muss jedoch angemerkt werden, dass zur endgültigen Bewertung des Zusammenwirkens von Eribulin und TTFields weitere experimentelle in vitro Arbeiten nötig sein werden, die auf der Grundlage von Dosis-Wirkungs-Beziehungen für alle drei Therapieformen mit der Methode von Chou arbeiten.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Die Auswirkungen von Eribulin auf humane Glioblastomzellen

4.3.1.1 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen

Takahashi et al. konnten bereits 2019 zeigen, dass Eribulin ausgeprägte antiproliferative Wirkung in humanen Glioblastomzellen zeigt (Takahashi et al., 2019). Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur antiproliferativen Wirkung der Einzelbehandlung mit Eribulin bestätigen diesen Befund deutlich. Inwieweit diese Wirksamkeit im Vorfeld jedoch durch potenzielle Biomarker abgeschätzt werden kann und welche weiteren zellulären Veränderungen die Eribulin-Behandlung mit sich bringt, soll in den folgenden Kapiteln diskutiert werden.

Zudem muss der Umstand, dass die Zelllinie U-87MG eine Diskrepanz zwischen den Werten für die Zellfraktion mit erhaltener Viabilität aus dem MTT-Assay und der überlebenden Zellfraktion aus der Zellzählung aufwies, kritisch betrachtet werden. Es hat sich gezeigt, dass aus einer Behandlung der mit Hilfe der Probit-Analyse geschätzten IC_{50} von 0,2082 nM eine überlebende Zellfraktion in der Zellzählung von nur 24,93 % resultiert. Eine Reduktion der Eribulindosis auf drei Viertel der IC_{50} , also 0,15615 nM führte daraufhin zu einer überlebenden Zellfraktion in der Zellzählung von 52,54 % und wurde demnach den Anforderungen an eine IC_{50} besser gerecht. Da die reduzierte Eribulindosis allerdings im mit Hilfe der

Probit-Analyse geschätzten Konfidenzintervall für die IC_{50} von [0,1486 nM; 0,2699 nM] liegt, ist die Divergenz durch den natürlichen Zufall sowie die Unterschiedlichkeit der beiden zugrunde liegenden Methoden ausreichend erklärt. Dass innerhalb des Konfidenzintervalls bereits kleine Änderungen in der Eribulindosis eine deutliche Änderung der überlebenden Zellfraktion beziehungsweise der Zellfraktion mit erhaltener Viabilität aufweisen, ist ebenfalls durch die Natur sigmoidaler Dosis-Wirkungs-Kurven erklärt, welche am Punkt der IC_{50} und damit auch in dessen Konfidenzintervall die größte Änderungsrate aufweisen.

4.3.1.2 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Astrozyten

In den Untersuchungen an humanen Astrozyten wurde eine deutlich geringere antiproliferative Wirkung von Eribulin beobachtet. Ob in der klinischen Anwendung allerdings eine antiproliferative Wirkung gegenüber vitalen Astrozyten beobachtet werden könnte, bleibt weiterhin fraglich. In in vivo-Untersuchungen konnten Takahashi et al. zeigen, dass es in fremdtransplantierten Mäusen zu einer hohen Anreicherung von Eribulin in Tumorzellen, jedoch nicht im intakten Hirngewebe kam (Takahashi et al., 2019). Dieser Umstand mag damit zusammenhängen, dass es innerhalb des Tumors zu Destruktionen der Blut-Hirn-Schranke kommt, welche im gesunden Hirngewebe nicht vorhanden sind (Fidler et al., 2002). Hier ist die Blut-Hirn-Schranke intakt und schützt das Gewebe vor zelltoxischen Substanzen wie Eribulin, sodass sich die in dieser Arbeit gezeigte antiproliferative Wirkung von Eribulin auf humane Astrozyten als

Vertreter des gesunden Hirngewebes im klinischen Setting vermutlich nicht in vergleichbarem Maße niederschlagen würde. Dies ist grundsätzlich als positiv zu bewerten, da durch die schützende Blut-Hirn-Schranke vermeintliche Nebenwirkungen, die bei der Affektion von Astrozyten durch Eribulin entstünden, möglicherweise verhindert würden. Zusätzlich lassen die vorgestellten Ergebnisse vermuten, dass eine eventuelle zytotoxische Wirkung auf humane Astrozyten nach Überwindung der Blut-Hirn-Schranke deutlich geringer ausfiele als auf Tumorzellen. Für dieses Phänomen wird nicht zuletzt die naturgemäß stark gesteigerte Verdopplungszeit der Tumorzellen gegenüber den vitalen Astrozyten eine erklärende Rolle spielen.

4.3.1.3 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen abhängig vom TERT-Promotor-Mutationsstatus

Die vorgestellten Ergebnisse haben eine Abhängigkeit der antiproliferativen Wirkung von Eribulin zugunsten der TERT-positiven Zelllinien gezeigt. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von Takahashi et al. überein, die ebenfalls eine stärkere antiproliferative Wirkung in TERT-positiven Zelllinien nachweisen konnten (Takahashi et al., 2019). Ein Vergleich der beiden Studienergebnisse in Bezug auf die IC₅₀-Werte ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Vergleich der ermittelten IC₅₀-Werte von Takahashi et al. mit der vorliegenden Arbeit

	Takahashi et al.	Vorliegende Arbeit
U-87MG	0,32 nM	0,21 nM
Modellzelllinien TERT-pos. (Median)	0,34 nM	0,26 nM
Patientenzelllinien TERT-pos. (Median)	0,66 nM	1,35 nM
Patientenzelllinien TERT-neg.	17,16 nM/n. A.	30,35 nM

Die geringen Unterschiede in den Ergebnissen können wiederum durch Unterschiede hinsichtlich Kollektivgröße, Kontrollgruppe, Methodik und Auswertung erklärt werden. Diese sind in

Tabelle 11 gegenübergestellt. Die beiden verwendeten Viability-Assays sind zwar miteinander verwandt und es besteht nur ein geringer methodischer Unterschied, dennoch ist der von Takahashi et al. genutzte WST-Assay mit einem erhöhten methodischen Risiko verbunden, das zur Verfälschung der Messwerte führen kann, wie bereits in Kapitel 2.2.3 erörtert.

Tabelle 11: Vergleich der von Takahashi et al. angewandten Methodik mit der vorliegenden Arbeit

	Takahashi et al.	Vorliegende Arbeit
TERT-pos. Modellzelllinien	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 2

TERT-pos. Patientenzelllinien	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 4
TERT-neg. Zelllinien	<i>n</i> = 2,	<i>n</i> = 1,
	Ovarialkarzinome	Glioblastom
Methode	WST-Assay	MTT-Assay

Die Abhängigkeit der antiproliferativen Wirkung von Eribulin vom TERT-Promotor-Mutationsstatus in der eigenen Studie ist aus verschiedenen Gründen unter Vorbehalt zu betrachten.

Zum einen muss darauf hingewiesen werden, dass das Institut für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen nur die beiden häufigsten Hotspots für Mutationen des TERT-Promotors untersucht, welche etwa 98,3 % aller Mutationen abdecken (Killela et al., 2013). Das Vorliegen einer Wildtypsequenz in diesen beiden Positionen schließt das Vorhandensein einer Genmutation an einer anderen Position des Gens daher nicht mit Sicherheit aus. So ist es prinzipiell möglich, dass die in dieser Arbeit als TERT-negativ betrachtete Zelllinie 461 tatsächlich doch Träger einer Mutation ist und diese lediglich nicht erfasst wurde, auch wenn deren vorgestellte IC₅₀ dies nicht vermuten lässt.

Zum anderen besteht der in Kapitel 1.3.2 vorgestellte Umstand, dass die TERT-Expression multifaktoriell bedingt und gerade in Krebszellen von vielen vorgeschalteten Onkogenen abhängig ist. So wäre es denkbar, dass in dieser Arbeit als TERT-negative Zelllinien betrachtete Zelllinien dennoch eine erhöhte TERT-Expression aufweisen. Mögliche Gene, die die TERT-Expression im Rahmen

einer malignen Entartung beeinflussen, sind beispielsweise MYC und Hypoxia induced factor 1 (Kyo et al., 2008).

Darüber hinaus ist es denkbar, dass Eribulin in zwei Zelllinien mit positivem TERT-Promotor-Mutationsstatus und unterschiedlich starker TERT-Expression eine unterschiedlich starke antiproliferative Wirkung aufweist. Die Höhe der TERT-Expression wurde in dieser Arbeit jedoch nicht erfasst.

Die vorgestellten nicht erfassten Einflussfaktoren lassen sich nur durch eine Messung der TERT-Expression mit Hilfe einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) in Echtzeit erfassen, wie sie bereits von Takahashi et al. zur Messung der TERT-Expression durchgeführt wurde (Takahashi et al., 2019). Somit muss die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Abhängigkeit der antiproliferativen Wirkung von Eribulin vom TERT-Promotor-Mutationsstatus unter Vorbehalt betrachtet werden, da deren quantitatives Ausmaß nur mit Hilfe einer Expressionsanalyse zu erfassen ist. Dennoch zeigen die Ergebnisse von Takahashi et al. und der vorliegenden Arbeit in ihrer Gesamtaussage eine hohe Übereinstimmung.

4.3.1.4 Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen abhängig vom MGMT-Promotor-Methylierungsstatus

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig beobachtet, dass ein negativer MGMT-Promotor-Methylierungsstatus humaner Glioblastomzellen mit einer höheren antiproliferativen Wirkung von

Eribulin einherging und konkreter, dass Eribulin in der Subgruppe der TERT-positiven und MGMT-negativen Zelllinien seine stärkste antiproliferative Wirkung entfaltete. Diesbezüglich machten Arita et al. 2016 die interessante klinische Beobachtung, dass Patienten mit TERT-positivem und MGMT-negativem Promotor-Mutations- beziehungsweise -Methylierungsstatus, verglichen mit den anderen molekularen Konstellationen der beiden Gene, die schlechteste Prognose aufwiesen. Dieses Ergebnis beruht nicht zuletzt auf der Tatsache, dass es nach den aktuellen Behandlungsempfehlungen keine wirksame Chemotherapie für Patienten mit negativem MGMT-Promotor-Methylierungsstatus und damit auch für die oben genannte Subgruppe gibt. Die Autoren fordern daher die Fokussierung auf das TERT-Protein als Zielstruktur zukünftig untersuchter Systemtherapien, da TERT-basierte Ansätze möglicherweise die Lösung für dieses strukturelle therapeutische Problem erbringen könnten. Nguyen et al. bestätigten die Entdeckung von Arita et al. bereits kurze Zeit später und konstatierten darüber hinaus, dass die prognostische Aussagekraft der MGMT-Promotormethylierung maßgeblich vom TERT-Promotor-Mutationsstatus abhängig ist (Nguyen et al., 2016). Sowohl Nguyen et al. als auch Arita et al. wiesen darauf hin, dass der biologische Mechanismus der Wechselwirkungen zwischen TERT-Mutation und MGMT-Promotor-Methylierung, der das Überleben der Patienten beeinflusst, noch unklar ist. Als eine hypothetische Erklärung nennen Arita et al. das breite Spektrum der biologischen Folgen einer TERT-Aktivierung, welche durch

RdRP-basiertes Gen-Silencing durchaus auch Einfluss auf die MGMT-assoziierte Genexpression nehmen könnte (Arita et al., 2016). Dieser Erklärungsansatz muss in der Zukunft näher untersucht werden.

Des Weiteren ist nicht abschließend geklärt, welcher der beiden untersuchten molekularen Marker den größeren Einfluss auf die antiproliferative Wirkung von Eribulin nimmt. Die vorliegenden Ergebnisse lassen zwar im Einklang mit der oben genannten Beobachtung von Arita et al. aufgrund der ungleich höheren IC_{50} der TERT-negativen Zelllinie 461 im Vergleich zur moderat erhöhten IC_{50} der MGMT-positiven Zelllinien 455 und 460 zwar vermuten, dass der TERT-Promotor-Mutationsstatus den stärkeren Einflussfaktor darstellt. Um diese Hypothese zu bestätigen, sind jedoch größere Kollektive insbesondere auf der TERT-negativen Seite nötig, damit Untersuchungen unter Konstanthaltung jeweils eines Parameters durchgeführt werden können. Derartige Untersuchungen sind in Zukunft angezeigt, um zu evaluieren, inwieweit beide Parameter unabhängig voneinander einen aussagekräftigen Biomarker für das Ansprechen der Erkrankung auf eine Eribulin-Behandlung darstellen. Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die experimentelle Eribulin-Behandlung im Glioblastom die oben genannte Forderung einer TERT-Fokussierung von Arita et al. erfüllt. Darüber hinaus zeigen die vorgestellten Ergebnisse, dass Eribulin gerade in der molekularen Subgruppe von Glioblastomen mit negativem MGMT-Promotor-Methylierungsstatus die stärkste

antiproliferative Wirkung zeigt, in der es laut Arita et al. aufgrund der schlechtesten klinischen Prognose und einem Fehlen von wirksamen Systemtherapien besonderer Forschungsanstrengungen bedarf. Damit stellen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen entscheidenden Zugewinn an Informationen für die Therapie des Glioblastoms dar. In Zukunft könnte Eribulin somit auch in MGMT-negativen Glioblastomen ein Hoffnungsträger für eine Systemtherapie werden.

4.3.1.5 Eribulin erreicht ein vollständiges Ansprechen in humanen Glioblastomzellen

Die Frage nach dem Erreichen eines vollständigen Ansprechens ist in der klinischen Onkologie von hoher Relevanz. Es bleibt nun zu klären, inwieweit sich dieser Aspekt bereits präklinisch in der Zellkultur untersuchen und bewerten lässt.

Die IC_{95} gilt in der Virologie als Anhaltspunkt für die Minimum effective concentration, welche zur Erreichung von viraler Inaktivität als therapeutischem Ziel aufrecht erhalten werden muss (Back et al., 2001; Regazzi et al., 2000). Um einen möglichen Weg der präklinischen Analyse bezüglich eines vollständigen Ansprechens auch in der experimentellen Onkologie zu finden, wurde das Erreichen einer solchen IC_{95} im experimentellen Setting in der vorliegenden Arbeit als vollständiges Ansprechen definiert. Diese konnte in beiden untersuchten Glioblastom-Zelllinien erreicht werden. Im Gegensatz dazu konnte für humane Astrozyten keine IC_{95} im experimentellen Setting erreicht werden. Dieser Umstand weckt

Hoffnungen bezüglich der potenziellen Nebenwirkungen von Eribulin im gesunden Hirngewebe, da er analog zur IC_{50} verdeutlicht, dass Eribulin auf Glioblastomzellen eine weitaus stärkere antiproliferative Wirkung als auf humane Astrozyten ausübt.

Bei noch genauerer Betrachtung der Werte fällt auf, dass die IC_{95} beider Glioblastom-Zelllinien sogar unterhalb der IC_{50} der Astrozyten lag. Dieses Verhältnis in der antiproliferativen Wirkung von Eribulin ist besonders vorteilhaft, da in einer möglichen klinischen Anwendung ein potenziell vollständiges Ansprechen des Tumors bei einer begrenzten Toxizität im gesunden Hirngewebe beobachtet werden könnte.

Die Frage nach einem vollständigen Ansprechen von humanen Glioblastomzellen auf eine experimentelle Eribulin-Behandlung wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit erstmalig untersucht und hierzu Ergebnisse präsentiert. Die abgeleiteten Erkenntnisse müssen allerdings unter Vorbehalt betrachtet werden, da es sich bei dem hier angewandten Verfahren nicht um eine etablierte Methode der experimentellen Onkologie handelt, sondern lediglich vergleichbare Überlegungen aus der Virologie auf das onkologische Setting übertragen wurden. Dieser Umstand spiegelt sich in der Tatsache wider, dass es in der Literatur keine Studien zu experimentell-onkologischen Fragestellungen bezüglich eines vollständigen Ansprechens zu finden gibt.

4.3.1.6 Eribulin senkt die klonogene Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Auswirkungen von Eribulin auf humane Glioblastomzellen in einem Clonogenic Assay erfasst. Die Erfassung der klonogenen Zellfraktion stellt einen hohen Informationsgewinn über die reine Zellzählung hinaus dar und ergänzt insbesondere die oben diskutierten, fundierten Analysen von Takahashi et al. um eine weitere Erkenntnis. Sie erlaubt neben der Zellzahl-basierten, quantitativen Evaluierung eine qualitative Aussage über den Zustand der Zellen nach abgeschlossener Eribulin-Behandlung. Mit Hilfe von direkter Zellzählung wurde die überlebende Zellfraktion bestimmt, allerdings sind diese überlebenden Zellen keineswegs vollständig funktionsfähig. Die Ergebnisse des Clonogenic Assay zeigen, dass nur ein geringer Teil der überlebenden Zellfraktion noch in der Lage ist, sich zu vermehren und diese Vermehrungsfähigkeit in einem Überwachungszeitraum von bis zu 3 Wochen auch nicht zurückerlangt. Tatsächlich wirkt die Eribulin-Behandlung daher also viel stärker, als die quantitative Auswertung durch Zellzählung nach IC_{50} -Gabe vermuten lässt. Diese qualitative Ergänzung zur quantitativen Dosis-Wirkungs-Beziehung für Eribulin im humanen Glioblastom stellt ein Alleinstellungsmerkmal der vorliegenden Arbeit dar, das in dieser Form zuvor nicht für das Glioblastom beschrieben worden ist.

Allerdings untersuchten Helfrich et al. im Jahr 2018 die Auswirkungen von Eribulin auf kleinzellige Lungenkarzinomzellen in Kombination

mit Radiotherapie mit Hilfe des Clonogenic Assay. Dabei fanden sie ebenfalls eine signifikante Verringerung der klonogenen Zellfraktion in der Eribulin-Gruppe (Helfrich et al., 2018). Darüber hinaus untersuchten Weiß et al. 2017 die Auswirkungen von Eribulin auf Ewing-Sarkomzellen in Kombination mit dem Polo-like-Kinase-1-Inhibitor BI 6727 ebenfalls mit Hilfe des Clonogenic Assay. Dabei fanden auch sie eine signifikante Verringerung der klonogenen Zellfraktion nach Eribulin-Einzelbehandlung (Weiß et al., 2017). Vor dem Hintergrund, dass die Auswirkungen von Eribulin auf humane Glioblastomzellen zuvor noch nie mit Hilfe des Clonogenic Assay evaluiert wurden, erhöht die Kongruenz der Befunde zwischen den vorgestellten Studien zu anderen Tumorentitäten und der vorliegenden Arbeit das Vertrauensniveau, das den erstmalig gefundenen Ergebnissen dieser Arbeit beigemessen werden darf.

4.3.1.7 Eribulin steigert die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen

Die einzigen veröffentlichten Voruntersuchungen zur Auswirkung von Eribulin auf die Apoptose von Krebszellen wurden im Jahr 2004 von Kuznetsov et al. durchgeführt. Die Autoren analysierten die Auswirkungen von Eribulin, damals noch „E7389“ genannt, auf histiozytäre Lymphomzellen mit Hilfe von Annexin-basierter FACS. Dabei fanden sie eine Erhöhung der Annexin-positiven Zellfraktion nach 12 und nach 22 Stunden einer Behandlung mit Eribulin in einer Konzentration von 100 nM (Kuznetsov et al., 2004). Diese Befunde

untermauern trotz abweichender Applikationsdauer, Dosis und untersuchter Tumorentität die in dieser Arbeit erstmals veröffentlichten Untersuchungsergebnisse zu den Auswirkungen von Eribulin auf die Apoptose humaner Glioblastomzellen.

Vergleicht man die vorgestellten Ergebnisse zur klonogenen Zellfraktion mit der erfassten nicht-apoptotischen Zellfraktion, so fällt auf, dass letztere nach Eribulin-Behandlung deutlich größer waren als die später erfasste klonogene Zellfraktion derselben Proben. Die Erfassung der apoptotischen Zellfraktion suggeriert daher zunächst, dass ein deutlich höherer Anteil der Zellen unmittelbar nach Therapieende noch vital sei als in den darauffolgenden Wochen im Clonogenic Assay tatsächlich bestätigt werden konnte. Die Schlussfolgerung muss sein, dass der Verlust der Vermehrungsfähigkeit nicht vollständig durch den Apoptosestatus direkt nach Therapieende erklärt wird. So wäre es beispielsweise denkbar, dass Zellen, die sich unmittelbar nach der Therapie noch nicht in der Apoptose befinden, im späteren Verlauf in diese eintreten und dadurch ihre Vermehrungsfähigkeit verlieren. Zu diesem Phänomen gibt es zwar keine Beschreibungen in der Literatur für die Eribulin-Behandlung, allerdings machten Giladi et al. 2015 ähnliche Beobachtungen für Zellen nach abgeschlossener TTFelds-Behandlung (Giladi et al., 2015). Diese werden in Kapitel 4.3.2.3 näher besprochen. Fest steht nach den vorgestellten Untersuchungen jedoch, dass nur weil eine Zelle unmittelbar nach

Therapieende keine Annexin-Positivität zeigt, dies nicht bedeutet, dass diese Zelle auch weiterhin in der Lage ist, sich zu vermehren.

Darüber hinaus muss angemerkt werden, dass sich die beiden miteinander verglichenen Verfahren grundlegend in ihrem zeitlichen Bezug zur analysierten Therapiemodalität unterscheiden. Während die Messung der apoptotischen Zellfraktion lediglich eine Momentaufnahme eines Biomarkers darstellt, bildet der Clonogenic Assay einen zellulären Prozess von mehreren Wochen ab, der eine Bewertung der tatsächlich vorhandenen Zellfunktion nach Abschluss einer Therapie erlaubt. Unter den oben genannten Gesichtspunkten lässt sich jedoch festhalten, dass sich die Ergebnisse beider Versuche trotz unterschiedlicher zeitlicher Auflösung gut miteinander vereinbaren lassen. Für zukünftige Studien in diesem Bereich wäre es interessant, die apoptotische Zellfraktion zu verschiedenen Zeitpunkten nach Abschluss der Therapie zu erfassen, um so eventuell eine noch höhere Kongruenz der Ergebnisse aus Clonogenic Assay und FACS belegen zu können.

4.3.1.8 Abschließende Bewertung der experimentellen Ergebnisse in Bezug auf eine mögliche klinische Anwendung von Eribulin bei Patienten mit Glioblastom

Die vorliegende Arbeit hat auf verschiedenen Wegen gezeigt, dass Eribulin eine vielversprechende Substanz für die Therapie des Glioblastoms ist. Die gefundenen Ergebnisse beinhalten eine hohe Wirksamkeit in Glioblastomzellen bei sehr niedrigen Dosierungen, eine schwerwiegende funktionelle Einschränkung der Tumorzellen

nach der Therapie, ein vollständiges Ansprechen der Tumorzellen im Sinne einer Erreichung der IC₉₅ ebenfalls im nanomolaren Bereich, eine Charakterisierung des Wirkprofils über die Zeit, eine deutlich geringere Schädigung vitaler humaner Astrozyten sowie eine erste Abschätzbarkeit des therapeutischen Erfolgs anhand der Biomarker TERT und MGMT. In Anbetracht der Vorgeschichte der Substanz als bereits gründlich untersuchtes sowie zugelassenes Chemotherapeutikum in der Therapie des Mammakarzinoms wird eine zukünftige Zulassung in der Glioblastomtherapie auch aus praktischer Sicht deutlich wahrscheinlicher. Abschließend kann für die Zukunft daher nur die dringende Empfehlung ausgesprochen werden, die Untersuchungen zu Eribulin im Glioblastom nach dem Vorbild des National Cancer Center Hospital in Tokyo und seiner Phase-II-Studie ENIGMA auf klinischer Ebene zu vertiefen.

4.3.2 Die Auswirkungen von TTFields auf humane Glioblastomzellen

4.3.2.1 TTFields senken die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen

Die Erkenntnis, dass TTFields unter experimentellen Bedingungen antiproliferative Wirkung auf humane Glioblastomzellen zeigen, ist gewiss nicht neu. Schließlich haben TTFields bereits eine Zulassung für Patienten mit Glioblastom in der Klinik und werden seit vielen Jahren untersucht. Die vorgestellten Daten dienen in dieser Arbeit als Basis für alle Folgeversuche mit TTFields. Sie bestätigen die korrekte Funktionsweise des inovitro™-Systems im eigenen Labor und die

Fähigkeit der Untersucher, reproduzierbare, laborübergreifend vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

4.3.2.2 TTFields senken die klonogene Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen

Zu dieser Aussage finden sich nur sehr wenige Daten in der Literatur. Die oben beschriebene Studie von Giladi et al. wandte den Clonogenic Assay erstmals als Methode zur Erfassung der Vermehrungsfähigkeit von Glioblastomzellen nach TTFields-Behandlung an. Sie fanden eine Verringerung der klonogenen Zellfraktion der TTFields-Gruppe sowie deren Abhängigkeit von der Verdopplungszeit der untersuchten Zelllinien (Giladi et al., 2015). Ersteres konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls statistisch signifikant belegt werden.

Eine weitere Studie von Porat et al. verwendete unter anderem den Clonogenic Assay, um eine Frequenzabhängigkeit der TTFields-Behandlung nachzuweisen (Porat et al., 2017). Dabei arbeiteten die Autoren mit einer Zelllinie aus dem humanen Ovarialkarzinom und einer Zelllinie aus dem Gliom der Ratte, sodass diese Messwerte nicht direkt mit den in der vorliegenden Arbeit an humanen Glioblastom-Zelllinienerhobenen Messwerten verglichen werden können. Die Aussage, dass eine TTFields-Behandlung die klonogene Zellfraktion gegenüber der Kontrolle senkt, ist jedoch in beiden Untersuchungen kongruent.

Dass die vorgestellten Daten mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen übereinstimmen, zeigt, dass der Clonogenic Assay

als Verfahren mit tendenziell hoher Störanfälligkeit im eigenen Labor verlässlich angewendet wurde. Die Daten zur klonogenen Zellfraktion von Zellen aus der TTFields-Gruppe dienen als Fundament für die Untersuchungen zu Eribulin und der Kombinationsbehandlung im Clonogenic Assay und stellen damit einen wichtigen Teil dieser Arbeit dar. Denn sowohl für Eribulin als auch für die Kombinationsbehandlung finden sich keine Daten zur klonogenen Zellfraktion in der Literatur, anhand derer die Güte der eigenen Experimente abgeschätzt werden könnte.

4.3.2.3 TTFields steigern die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen

Bislang gibt es nur wenige veröffentlichte Studien, die die Auswirkungen von TTFields auf die Apoptose von Krebszellen mit Hilfe von FACS untersucht haben. 2015 führten Giladi et al. Versuche mit Ovarialkarzinomzellen der etablierten Modellzelllinie A-2780 durch. Die Autoren fanden sowohl eine signifikante Verringerung der vitalen, nicht-apoptotischen Zellfraktion nach 48-stündiger TTFields-Applikation gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber der 24-stündigen TTFields-Applikation. Damit konnten sie erstmals eine Abhängigkeit der TTFields-induzierten Apoptose von der Applikationsdauer nachweisen. Analog verhielt es sich mit den Parametern der frühen und späten Apoptose. Hier konnten die Autoren ebenfalls eine signifikante Steigerung der Fraktionen gegenüber der Kontrolle und im Zeitverlauf nachweisen. Zusätzlich gelang den Autoren unter Einsatz des Caspase-Inhibitors

Z-VAD-FMK der erstmalige Nachweis darüber, dass die TTFields-vermittelte Apoptose von Caspasen abhängig ist. (Giladi et al., 2015)

Die einzige bisher veröffentlichte Studie zur Auswirkung von TTFields auf die Apoptose in humanen Glioblastomzellen stammt von Kessler et al. aus dem Jahr 2018. Die Autoren untersuchten U-87MG-Zellen nach 72-stündiger TTFields-Behandlung (Kessler et al., 2018). Auch in dieser Studie wurden lediglich die Annexin-positiven Zellen betrachtet und es fand keine Unterscheidung zwischen früher und später Apoptose statt. Die Autoren fanden einen Anstieg der Annexin-positiven Zellen nach TTFields-Behandlung gegenüber der Kontrolle. Darüber hinaus untersuchten sie den als IN-3 bezeichneten Inhibitor eines Schlüsselproteins des Spindle-assembly-checkpoint (SAC) in der Kombination mit TTFields. Sie konnten zeigen, dass die Kombinationsbehandlung zu einer signifikanten Erhöhung der apoptotischen Zellfraktion gegenüber der Einzelbehandlung mit TTFields führte. Damit stellt die Studie von Kessler et al. die ideale Vergleichsgrundlage für die vorliegende Arbeit dar. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten bestätigen den von Kessler et al. erstmals an humanen Glioblastomzellen gefundenen Effekt auf die Apoptose ein zweites Mal. Das zeigt, dass die komplexe Methodik der FACS-Analyse nach TTFields-Behandlung in beiden Studien äquivalent durchgeführt wurde und das System damit für die Untersuchungen zu Eribulin und der Kombinationsbehandlung, zu

deren Auswirkungen auf die Apoptose es keine Daten in der Literatur zu finden gibt, als validiert angesehen werden kann.

Darüber hinaus gibt es in der gemeinsamen Betrachtung der apoptotischen Zellfraktion und der überlebenden Zellfraktion dieselbe Beobachtung zu machen, die auch in Kapitel 4.3.1.7 besprochen wurde. Vergleicht man die Ergebnisse zur klonogenen Zellfraktion mit der apoptotischen Zellfraktion, so fällt auf, dass die erfasste, nicht-apoptotische Zellfraktion nach TTFields-Behandlung stets größer war als die klonogene Zellfraktion derselben Probe. Die Erfassung der Apoptose suggeriert also analog zur bereits besprochenen Beobachtung der Zellen nach Eribulin-Behandlung, dass ein deutlich höherer Anteil der Zellen nach Therapieende vital sei, als in den darauffolgenden Wochen im Clonogenic Assay tatsächlich bestätigt werden konnte. Die zuvor gezogene Schlussfolgerung, dass der Verlust der Vermehrungsfähigkeit nicht vollständig durch den aktuellen Apoptosestatus unmittelbar nach Behandlungsende erklärt wird, wird durch die vorgestellten Ergebnisse zur klonogenen Zellfraktion nach TTFields-Behandlung unterstützt.

Die Hypothese, dass Zellen, die sich unmittelbar nach der Therapie noch nicht in der Apoptose befinden, im späteren Verlauf in diese eintreten und dadurch ihre Vermehrungsfähigkeit verlieren, wird durch eine grundlegende Erkenntnis unterstützt, die Giladi et al. bereits 2015 gewannen. Die Autoren fanden heraus, dass sich die relevanten, TTFields-induzierten Zellschäden erst in der folgenden

Interphase nach einer unter TTFields-Behandlung durchlaufenen Mitose manifestieren. Es kommt also zu einem verzögerten Eintreten der Zellschäden nach der Therapie mit TTFields, sodass es wahrscheinlich ist, dass nicht alle Zellen unmittelbar nach Therapieende bereits den vollen Zellschaden ausgebildet und durch eine Annexin-Positivität erkennbar gemacht haben. Dieses Phänomen wurde in der Literatur zwar noch nicht beschrieben, jedoch lässt es sich aus den Daten von Giladi et al. aus dem Jahr 2015 ebenfalls ablesen (Giladi et al., 2015). Die Autoren fanden nach 48-stündiger Behandlung humaner Ovarialkarzinomzellen mit TTFields eine nicht-apoptotische Zellfraktion von etwa 75 %, jedoch nur eine klonogene Zellfraktion von etwa 50 %, was eine vergleichbare Diskrepanz dieser beiden Messgrößen wie in der vorliegenden Arbeit darstellt.

Ob diese Erklärung auch für Zellen nach Eribulin-Behandlung greift, oder ob dem andere Mechanismen zu Grunde liegen, ist zu diesem Zeitpunkt unklar. Da jedoch beide Therapieregime den Spindelapparat als zentralen Angriffspunkt in der sich teilenden Zelle gemeinsam haben, wird eine Ähnlichkeit der Mechanismen der Zellschadenmanifestation zumindest wahrscheinlicher.

4.3.3 Die Wirksamkeit von Eribulin in Kombination mit TTFields in humanen Glioblastomzellen

In der Literatur finden sich zur kombinierten Behandlung von TTFields und Eribulin weder Daten für das Glioblastom noch für andere Tumorentitäten. Die Untersuchungen zu dieser

Kombinationsbehandlung mit den drei erfassten Messgrößen überlebende Zellfraktion, klonogene Zellfraktion und apoptotische Zellfraktion stellen eine absolute Neuheit in der neuroonkologischen Forschung dar. Alle Methoden sind zuvor, wie bereits vorgestellt, durch andere Arbeitsgruppen und auch durch die vorliegende Arbeit an TTFields-behandelten Glioblastomzellen validiert worden. Daher stützen sich die vorliegenden, neuen Untersuchungen zur Kombination von TTFields und Eribulin auf ein sicheres Fundament, sodass ihren Ergebnissen ein hohes Vertrauensniveau beigemessen werden darf.

4.3.3.1 Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen

Die vorgestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass die Zugabe von Eribulin als Spindelgift und TERT-Inhibitor zu den ebenfalls spindelaktiven TTFields zu einer signifikanten Verstärkung der antiproliferativen Wirkung führt. Die Zellzahl-basierte Messung als rein quantitative Methode stellt das Grundgerüst für alle weiteren, auch qualitativen Untersuchungen dar. Es ist durch diese Arbeit erstmals gezeigt, dass die Kombination von Eribulin und TTFields allgemein stärker wirkt als die einzelnen Therapien. Die Erfassung der Zellzahlen kann jedoch keine Aussage darüber treffen, auf welchen Mechanismen die Steigerung der Zytotoxizität gründet und wie sie den Zustand der Zellen nach der Therapie beeinflusst. Auf die Beeinflussung des Zustandes der Zellen nach der

Kombinationsbehandlung wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

Ein großer Vorteil dieser Arbeit gegenüber vielen anderen Studien, die sich mit der Frage nach einer potenten Partnersubstanz für TTFields beschäftigt haben, ist das Vorliegen einer fundierten Dosis-Wirkungs-Beziehung der Partnersubstanz. Durch die Verwendung einer für jede Zelllinie individuell bestimmten IC_{50} konnte gewährleistet werden, dass der zytotoxische Effekt, der durch Eribulin hervorgerufen wird, in jeder Zelllinie nahezu das gleiche, kontrollierte Ausmaß annahm. So wurde sichergestellt, dass die Hinzunahme von TTFields zur Eribulin-Behandlung in jeder Zelllinie unter gleichen Bedingungen stattfand und die elektrischen Wechselfelder ihre volle Wirkung in einem definierten Zielkorridor der überlebenden Zellfraktion entfalten konnten. Verzerrungen in der Wirkung von TTFields etwa durch sehr starke oder sehr schwache Effekte des Eribulins in einer individuellen Zelllinie konnten auf diese Weise verhindert werden. Viele andere Arbeitsgruppen arbeiteten mit festen Konzentrationen des chemotherapeutischen Agens in jeder Zelllinie, wodurch keine gleichen Bedingungen bei der Applikation von TTFields herrschten (Kessler et al., 2018; Schneiderman et al., 2017; Voloshin et al., 2016).

Übertragen in den klinischen Anwendungszusammenhang könnten die gefundenen Ergebnisse eine Dosisreduktion der potenziellen Eribulin-Behandlung bei gleichzeitiger Steigerung des therapeutischen Effekts durch die Kombination mit TTFields

bedeuten. Auf diese Weise könnten Nebenwirkungen eingespart sowie das Outcome von Glioblastompatienten verbessert werden. Diese vielversprechenden experimentellen Neuinformationen sollten in Zukunft auf die nächsthöhere experimentelle Ebene des Tierversuchs gehoben werden, um in der Folge möglichst bald einer Erprobung am Menschen unterzogen werden zu können.

4.3.3.2 Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen mit Tendenz zur Abhängigkeit von der Verdopplungszeit

Giladi et al. zeigten 2015 erstmalig an zehn Zelllinien, dass die überlebende Zellfraktion nach TTFields-Behandlung eine positive Korrelation mit der Verdopplungszeit der Zellen aufweist (Giladi et al., 2015). Es handelte sich hierbei allerdings nicht nur um Glioblastomzellen, sondern um Krebszelllinien verschiedener Entitäten.

In Anlehnung an diesen Befund wurde in der vorliegenden Arbeit eine lineare Regressionsanalyse der Datenpaare aus Verdopplungszeit und überlebender Zellfraktion nach Kombinationsbehandlung durchgeführt, um den von Giladi et al. für eine Einzelbehandlung mit TTFields gezeigten Zusammenhang auch für die Kombinationsbehandlung mit Eribulin im hier verwendeten reinen Glioblastom-Kollektiv zu untersuchen. In den vorgestellten Daten war die Abhängigkeit der antiproliferativen Wirkung der Kombinationsbehandlung von der Verdopplungszeit zwar in ihrer Tendenz deutlich erkennbar, es konnte jedoch aufgrund der zu

geringen Anzahl an untersuchten Zelllinien keine statistische Signifikanz zum Niveau $\alpha = 0,05$ nachgewiesen werden. Zukünftig sollte es jedoch in möglichen Folgeuntersuchungen mit mehr als vier Zelllinien ohne Schwierigkeiten gelingen, die lineare Beziehung von überlebender Zellfraktion nach Kombinationsbehandlung und Verdopplungszeit nachzuweisen.

Aus dieser Beobachtung lassen sich relevante Schlussfolgerungen für die klinische Anwendung ziehen. Die experimentellen Daten legen nahe, dass die Kombinationsbehandlung von Eribulin und TTFIELDS bei Patienten, die an einem besonders aggressiven, schnell wachsenden Tumor leiden, eine stärkere Wirkung zeigen könnte. Dieses Grundprinzip ist allgemein bekannt für Therapien, die wie Eribulin und TTFIELDS einen zytostatischen Charakter haben. Somit lassen sich die bereits bekannten Gesetze der therapeutischen Onkologie auch auf den neuen Ansatz der Kombination von Eribulin und TTFIELDS übertragen, was die Aussagekraft der vorliegenden experimentellen Daten für die klinische Anwendbarkeit unterstreicht.

4.3.3.3 Die Kombination von Eribulin und TTFIELDS senkt die klonogene Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen

Die vorgestellten Ergebnisse basieren auf den validierten Ergebnissen zur Wirkung von TTFIELDS auf die klonogene Zellfraktion durch andere Arbeitsgruppen und die vorliegende Arbeit sowie den erstmals in dieser Arbeit veröffentlichten Ergebnissen zur Wirkung von Eribulin auf die klonogene Zellfraktion. Es konnte erstmals

gezeigt werden, dass die Kombinationsbehandlung nicht nur auf der quantitativen, zytotoxischen Ebene eine Verstärkung bewirkt, sondern auch auf der qualitativen Ebene der klonogenen Zellfraktion, also der aktiven Vermehrungsfähigkeit der Zellen. Die vorliegende Arbeit erlaubt erstmals eine Aussage über den Zustand humaner Glioblastomzellen nach erfolgter Kombinationsbehandlung von TTFields und Eribulin, die sich in zwei von vier Zelllinien in ihrer Vermehrungsfähigkeit deutlich eingeschränkt zeigten und die in weiteren zwei Zelllinien gänzlich erloschen war. Das reproduzierbare, vollständige Verlorengehen der aktiven Vermehrungsfähigkeit ausgewählter humaner Glioblastom-Zelllinien ist ein bisher unbekanntes Ergebnis bei Anwendung des Clonogenic Assay nach einfacher TTFields-Behandlung, wie Giladi et al. in einer Metaanalyse von bis zu 40 Zelllinien herausstellten (Giladi et al., 2018). Sie fanden eine maximale Einschränkung der klonogenen Zellfraktion um 88 % gegenüber der Kontrolle, jedoch niemals um 100 %. Daher wird es sehr wahrscheinlich, dass der vollständige Verlust der Vermehrungsfähigkeit auf die Hinzugabe von Eribulin zur TTFields-Behandlung zurückzuführen ist.

Hier stehen sich nun zwei in ihrer Grundaussprägung verschiedene Qualitäten von Therapieergebnissen gegenüber: Während die Kombinationsbehandlung auf der quantitativen, zytotoxischen Ebene zwar zu einer Verstärkung, aber nicht zu einer vollständigen Auslöschung der Zellpopulationen führte, konnte auf der qualitativen, klonogenen Ebene ein vollständiger Verlust der

Vermehrungsfähigkeit erreicht werden. Zusammen betrachtet lassen sich die Ergebnisse beider Messgrößen so interpretieren, dass nach der Kombinationsbehandlung zwar ein geringer Anteil an Tumorzellen überlebt, dieser jedoch in Bezug auf die Tumorzellproliferation nahezu vollkommen funktionslos ist. Die langen Inkubationszeiten der Kolonien von bis zu 3 Wochen machen darüber hinaus deutlich, dass die Tumorzellen nach der Kombinationsbehandlung keine Tendenz besitzen, die verlorene Vermehrungsfähigkeit zurückzuerlangen.

Diese erstmalig durch die vorliegende Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur klonogenen Zellfraktion der Glioblastomzellen nach Kombinationsbehandlung haben eine besondere Bedeutung für die Klinik. So wäre nach einer möglichen klinischen Anwendung der Kombinationsbehandlung am Patienten und einem anschließend bildmorphologisch festgestellten Resttumor davon auszugehen, dass dieser unter Umständen keine Vermehrungsfähigkeit mehr besitzt. Auf diese Weise könnten potenziell mehr Patienten für einen längeren Zeitraum im Stadium der stabilen Erkrankung gehalten werden als durch eine alleinige TTFIELDS-Behandlung, die bereits Einzug in die klinische Anwendung gefunden hat. Derartige Überlegungen bleiben zum Zeitpunkt ausdrücklich rein hypothetisch, wecken jedoch große Hoffnung in Bezug auf das Potenzial der Kombinationsbehandlung von Eribulin und TTFIELDS in der klinischen Anwendung.

4.3.3.4 Die Kombination von Eribulin und TTFields steigert die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen

Die vorgestellten Ergebnisse basieren auf den validierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen und der vorliegenden Arbeit zur Wirkung von TTFields auf die Apoptose sowie den erstmals in dieser Arbeit veröffentlichten Ergebnissen zur Wirkung von Eribulin auf die Apoptose. Auch diese Ergebnisse stellen eine Bewertung des Zustandes der Zellen nach der Kombinationsbehandlung als qualitativen Aspekt dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombinationsbehandlung den Anteil apoptotischer Zellen unter den überlebenden Zellen signifikant gegenüber den Einzelbehandlungen erhöht.

Wie nach den Einzelbehandlungen zeigt sich auch nach der Kombinationsbehandlung die bereits zuvor beobachtete Diskrepanz zwischen nicht-apoptotischer und klonogener Zellfraktion. Die nicht-apoptotische Zellfraktion lag auch nach der Kombinationsbehandlung stets deutlich höher als die klonogene Zellfraktion. Es gelten auch hier dieselben Überlegungen, wie nach Eribulin- beziehungsweise nach TTFields-Behandlung. Die Diskrepanz wird wahrscheinlich durch ein verzögertes Eintreten der Zellen nach Therapieende in die Apoptose erklärt, wodurch sich in der Folge eine deutlich geringere klonogene Zellfraktion ergibt.

4.3.3.5 Eribulin und TTFields zeigen additive sowie unteradditive Kombinationseffekte in humanen Glioblastomzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Kombinationsbehandlung von Eribulin und TTFields in humanen Glioblastomzellen untersucht. Nachdem in allen untersuchten Zelllinien durch verschiedene Messmethoden signifikant stärkere Behandlungseffekte der Kombinationsbehandlung gegenüber den Einzelbehandlungen nachgewiesen werden konnten, wurde in einem letzten Schritt ebenfalls erstmals der Kombinationseffekt beider Behandlungsmethoden durch eine Interaktionsanalyse quantifiziert und bewertet. Die Ergebnisse zeigten in einer Zelllinie einen additiven Kombinationseffekt sowie in drei Zelllinien einen unteradditiven Kombinationseffekt. Ein synergistischer Kombinationseffekt konnte in keiner Zelllinie nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis schmälert jedoch nicht das zuvor diskutierte Potenzial der Kombinationsbehandlung im Allgemeinen, da die Kombinationsbehandlung, wie zuvor diskutiert, in allen Zelllinien einen Mehrwert gegenüber den Einzelbehandlungen erbracht hat. Zudem ist dieses Ergebnis vor dem Hintergrund der geringen Anzahl an untersuchten Zelllinien als nicht definitiv einzuordnen. In Zukunft sind Untersuchungen an einer größeren Anzahl an Zelllinien angezeigt, um eine repräsentative Bewertung des Kombinationseffektes der beiden Therapieformen vornehmen zu können.

4.3.3.6 Abschließende Bewertung der experimentellen Ergebnisse in Bezug auf eine mögliche klinische Anwendung der Kombinationsbehandlung bei Patienten mit Glioblastom

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Kombinationsbehandlung von Eribulin und TTFields haben zur Folge, dass ihr ein hohes Potenzial für die klinische Anwendung bei Patienten mit Glioblastom beigemessen werden kann. Die vorgestellten Ergebnisse beinhalten eine stärkere Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung gegenüber beiden Einzelbehandlungen, einen stärkeren bis vollständigen Verlust der Vermehrungsfähigkeit der Tumorzellen nach der Therapie, ein vermehrtes Auftreten von Apoptose sowie eine höhere Wirksamkeit bei besonders aggressiven, schnellwachsenden Tumorzellen. Diese Ergebnisse lassen für die klinische Anwendung der Kombinationsbehandlung ein verbessertes Ansprechen der Tumorzellen sowie eine verspätete Resistenzentwicklung gegenüber Eribulin erwarten, wenn dieses in der Kombination mit TTFields eingesetzt wird. Darüber hinaus deuten die vorgestellten Ergebnisse auch auf die Möglichkeit einer potenziellen Dosisreduktion von Eribulin in der klinischen Anwendung hin, wodurch die aus der Mammakarzinom-Behandlung bekannten Nebenwirkungen gesenkt werden könnten.

Abschließend kann für die Zukunft daher nur die dringende Empfehlung ausgesprochen werden, auf diesem vielversprechenden Fundament aus klinisch erprobter TTFields-Behandlung sowie erster experimenteller Evidenz für die Wirksamkeit der

Kombinationsbehandlung mit Eribulin aufzubauen. Als nächstes muss die erforderliche Evaluation im Tiermodell erfolgen sowie auch die bereits erwähnten Untersuchungen zu Eribulin als Systemtherapie am Menschen fortgeführt werden. Auf diese Weise kann der größtmögliche Nutzen aus den vorliegenden Ergebnissen gezogen werden, um zukünftig im besten Fall eine Zulassung sowohl für die alleinige Eribulin-Behandlung als auch für die Kombinationsbehandlung mit TTFields bei Patienten mit Glioblastom zu erlangen.

4.3.4 Die Wirksamkeit von Eribulin und TTFields in humanen Gliosarkomzellen

Alle vorgestellten Ergebnisse zur Wirksamkeit der untersuchten Behandlungsmodalitäten in humanen Gliosarkomzellen stellen ohne Ausnahme eine Neuheit in der Gliosarkom-Forschung dar. Aus diesem Grund waren zum Zeitpunkt der hier vorgestellten Forschung in der Literatur keinerlei Studien publiziert, die eine vergleichende Diskussion mit der vorliegenden Arbeit erlauben. Die im Folgenden diskutierten Aspekte beziehen sich daher vor allem auf die Validität der Versuche und Ergebnisse sowie auf die klinische Relevanz der experimentellen Befunde.

4.3.4.1 Eribulin hat antiproliferative Effekte auf humane Gliosarkomzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Wirkung von Eribulin auf humane Gliosarkomzellen untersucht und es konnte gezeigt

werden, dass die Substanz auch in Zellen der mit dem Glioblastom nah verwandten Entität des Gliosarkoms eine starke antiproliferative Wirkung zeigt, welche sich in einer IC_{50} im nanomolaren Bereich widerspiegelt. Die gefundenen Ergebnisse legen daher nahe, dass Eribulin analog zum Glioblastom ein hohes Potenzial zur Etablierung einer wirksamen Systemtherapie für Patienten mit Gliosarkom aufweist.

Die Aussagekraft dieser Beobachtung muss allerdings kritisch diskutiert werden. Es kann anhand der vorliegenden Ergebnisse keine endgültige Aussage über die antiproliferative Wirkung von Eribulin im Gliosarkom getroffen werden, da nur eine Gliosarkom-Zelllinie untersucht wurde. Um die Wirkung von Eribulin im Gliosarkom allgemein besser charakterisieren zu können, bedarf es der Untersuchung weiterer Gliosarkom-Zelllinien. Allerdings ist die Verfügbarkeit von etablierten, humanen Modellzelllinien des Gliosarkoms weitaus geringer als für das Glioblastom. Eine vergleichsweise gut charakterisierte Gliosarkom-Zelllinie, die sich für zukünftige laborübergreifende Untersuchungen eignen könnte, ist die Zelllinie GS9L aus dem Gliosarkom der Ratte. Diese wurde unter anderem von McDonald et al. zur Untersuchung der Wirksamkeit von Hyperthermie in Kombination mit Röntgenstrahlen verwendet (McDonald et al., 2018). Darüber hinaus sind spezielle Untersuchungen zur Wirkung von Eribulin in Patientenzelllinien des Gliosarkoms nötig, die allerdings aufgrund der deutlich geringeren Prävalenz der Erkrankung schwierig zu beziehen sind.

4.3.4.2 TTFields senken die überlebende Zellfraktion in humanen Gliosarkomzellen

Erstmals konnte in der vorliegenden Arbeit auf experimenteller Ebene gezeigt werden, dass TTFields eine antiproliferative Wirkung auf humane Gliosarkomzellen ausüben, was zunächst einmal ein positives Ergebnis im Hinblick auf die Etablierung neuer therapeutischer Ansätze für das Gliosarkom darstellt. Analog zu den oben diskutierten Ergebnissen zur antiproliferativen Wirkung von Eribulin auf humane Gliosarkomzellen sind jedoch auch hier weitere Untersuchungen an größeren Kollektiven notwendig, um eine allgemeingültige Aussage treffen zu können.

4.3.4.3 Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Gliosarkomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen

Erstmals konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Kombination von Eribulin und TTFields die antiproliferative Wirkung auf humane Gliosarkomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen steigern konnte, was ebenfalls ein positives Ergebnis im Hinblick auf die Etablierung neuer therapeutischer Ansätze für das Gliosarkom darstellt. Analog zu den oben diskutierten Ergebnissen zur antiproliferativen Wirkung der Einzelbehandlungen mit Eribulin und TTFields auf humane Gliosarkomzellen sind jedoch auch hier weitere Untersuchungen an größeren Kollektiven notwendig, um eine allgemeingültige Aussage treffen zu können.

4.3.4.4 Eribulin und TTFields zeigen einen synergistischen Kombinationseffekt in humanen Gliosarkomzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Kombinationsbehandlung von Eribulin und TTFields in humanen Gliosarkomzellen untersucht. Nachdem eine signifikant stärkere Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung gegenüber den Einzelbehandlungen nachgewiesen werden konnte, wurde in einem letzten Schritt ebenfalls erstmals der Kombinationseffekt beider Behandlungsmethoden durch eine Interaktionsanalyse quantifiziert und bewertet. Die Untersuchungen zeigten in der Zelllinie NCE-G-28 einen synergistischen Kombinationseffekt. Dieses Ergebnis weckt große Hoffnungen für eine mögliche Anwendung der Kombinationsbehandlung von Eribulin und TTFields bei Patienten mit Gliosarkom. Analog zu den oben diskutierten Ergebnissen zur antiproliferativen Wirkung von Eribulin und TTFields auf humane Gliosarkomzellen sind jedoch auch hier weitere Untersuchungen an größeren Kollektiven notwendig, um eine allgemeingültige Aussage treffen zu können.

4.3.4.5 Abschließende Bewertung der experimentellen Ergebnisse in Bezug auf eine mögliche klinische Anwendung von Eribulin und TTFields bei Patienten mit Gliosarkom

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Wirksamkeit beider untersuchten Behandlungsmodalitäten auf humane Gliosarkomzellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass

die Kombination beider Behandlungen einen zusätzlichen Nutzen gegenüber beiden Einzeltherapien erbringt. Vor dem Hintergrund der noch schlechteren klinischen Prognose für Patienten mit Gliosarkom als mit Glioblastom kann für die Zukunft daher die eindeutige Empfehlung ausgesprochen werden, auf der in der vorliegenden Arbeit erstmalig erbrachten experimentellen Evidenz der Wirksamkeit von Eribulin und TTFields gegen humane Gliosarkomzellen aufzubauen. Zunächst gilt es, das Spektrum der experimentellen Befunde durch Untersuchungen an mehreren Gliosarkom-Zelllinien zu erweitern. Darüber hinaus sollte, wie es auch bei den anderen, bereits diskutierten experimentellen Befunden der Fall ist, die erforderliche Evaluation im Tiermodell erfolgen. Auf diese Weise kann der größtmögliche Nutzen aus den vorliegenden Ergebnissen gezogen werden, um perspektivisch die therapeutische Versorgung von Patienten mit Gliosarkom zu verbessern.

4.3.5 Produkt-Moment-Korrelationen zwischen den erfassten Messgrößen

Die starken Korrelationen zwischen allen drei erfassten Messgrößen über alle Zelllinien hinweg zeigt eine gegenseitige Bestärkung aller gefundenen Aussagen untereinander. Dass eine Probe mit niedriger überlebender Zellfraktion wahrscheinlich auch eine niedrige klonogene Zellfraktion sowie eine hohe apoptotische Zellfraktion aufweisen würde, war im Vorfeld zu den Untersuchungen zu erwarten. Dass sich diese Erwartungen bestätigt haben, zeigt eine

hohe Funktionalität aller Methoden und eine hohe Validität des Gesamtexperimentes an.

Porat et al. hatten bereits 2017 eine Korrelation zwischen der überlebenden Zellfraktion und der klonogenen Zellfraktion nach TTFields-Behandlung in einer humanen Ovarialkarzinom-Zelllinie sowie einer Glioblastom-Zelllinie der Ratte nachgewiesen (Porat et al., 2017). Der Nachweis einer signifikanten negativen Korrelation zwischen der apoptotischen Zellfraktion und den anderen beiden genannten Messgrößen ist in dieser Arbeit allerdings erstmalig publiziert. Damit zeigen die nachgewiesenen Zusammenhänge nicht nur eine hohe methodische Validität der vorliegenden Arbeit an, sondern bieten auch einen wissenschaftlichen Mehrwert.

Während die Erfassung der apoptotischen Zellfraktion mittels FACS eine sehr verlässliche und hochleistungsfähige Methode darstellt, ist der Clonogenic Assay ein eher störanfälliges Verfahren, da es mit einem nur sehr geringen Teil der behandelten Zellen arbeitet. Allerdings bildet der Clonogenic Assay einen zellulären Prozess von bis zu 3 Wochen nach Therapieende ab und erlaubt daher auch eine Aussage über die weitere Entwicklung der Zellen, während das FACS lediglich eine Momentaufnahme unmittelbar nach Therapieende darstellt. Damit weisen beide Verfahren eine unterschiedliche Konstellation von der Tiefe der inhaltlichen Information auf der einen Seite und Störanfälligkeit auf der anderen Seite auf. Aus diesem Grund ergänzen sich beide Methoden auf eine sinnvolle und produktive Weise, was die gewinnbringende gemeinsame

Anwendung der beiden Methoden in der vorliegenden Arbeit hervorhebt.

4.4 Zukunftsausblick und Implikationen

Aus den vorgestellten Daten ergeben sich für die Zukunft einerseits wichtige Implikationen sowie andererseits neue Fragestellungen, deren Untersuchung auf der Grundlage dieser Arbeit angezeigt ist.

Zum einen muss untersucht werden, welcher der beiden hier betrachteten Biomarker für das Ansprechen von Glioblastomzellen auf eine Eribulin-Behandlung die größere Aussagekraft hat. Hierzu sind Untersuchungen an größeren Kollektiven, insbesondere auf der TERT-negativen Seite, notwendig. Unter Konstanthaltung jeweils eines Parameters muss die Wirksamkeit von Eribulin in repräsentativen Gruppen mit dem Ziel untersucht werden, die Unabhängigkeit beider Biomarker zu untersuchen und den Biomarker mit dem stärkeren Einfluss zu ermitteln. Darüber hinaus müssen Expressionsanalysen durchgeführt werden, die eine genauere Bewertung des Zusammenhangs zwischen den Biomarkern und dem Therapieansprechen ermöglichen als die alleinige Bestimmung von Mutations- beziehungsweise Methylierungsstatus. Zusätzlich gilt es, nach einer Erklärung zu suchen, warum ein negativer MGMT-Promotor-Methylierungsstatus, wie in dieser Arbeit beobachtet, mit einer erhöhten antiproliferativen Wirkung von Eribulin einher geht. In Kapitel 4.3.1.4 wurde bereits eine mögliche Erklärung

für diese Beobachtung diskutiert, dennoch ist die weitere Untersuchung dieser Fragestellung in Zukunft indiziert.

Darüber hinaus ist die Frage zu untersuchen, ob das Ansprechen der Gliosarkomzellen auf beide Therapiemodalitäten eine allgemeine Gültigkeit für diese Tumorentität hat. Diese Frage ist von hoher klinischer Relevanz, da das Gliosarkom generell als noch schwieriger zu behandeln gilt als das Glioblastom. In diesem Sinne ist eine weitere experimentelle und perspektivisch auch klinische Evaluation der hier untersuchten Behandlungen am Gliosarkom mit Nachdruck geboten, um in Zukunft die Therapie von Patienten mit Gliosarkom verbessern zu können.

Schließlich stellt sich die entscheidende Frage, inwieweit die vielversprechenden Ergebnisse dieser Studie in Bezug auf das Potenzial der Kombination von Eribulin und TTFields in der Glioblastomtherapie in die klinische Anwendung übertragbar sind. Das experimentelle Setting der vorliegenden Untersuchungen bildet mit der Blut-Hirn-Schranke einen für den Therapieerfolg und die Nebenwirkungen am gesunden Hirngewebe entscheidenden Faktor der klinischen Realität nicht ab. Daher muss die Evaluation der untersuchten Therapiemodalitäten in die nächsthöhere experimentelle Stufe des Tierversuchs geführt werden. Nicht zuletzt spielt hier auch die Frage nach den Nebenwirkungen eine wichtige Rolle und muss zukünftig sorgfältig untersucht werden. Langfristig muss das Ziel sein, auf den in dieser Arbeit vorgestellten experimentellen Ergebnissen sowie auf der umfangreichen klinischen

Vorarbeit zu Eribulin in der Therapie des Mammakarzinoms aufzubauen und die Kombination von Eribulin und TTFields am Menschen zu untersuchen. Hierfür lassen die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten vielversprechende Ergebnisse erwarten.

5 Zusammenfassungen

5.1 Zusammenfassung der Dissertation in deutscher Sprache

Einleitung. Das Glioblastom ist heute noch immer eine Erkrankung mit schlechter Prognose, für die nur unzureichend suffiziente Systemtherapien zur Verfügung stehen. Gleichzeitig gewinnt die moderne Therapieform TTFields zunehmend an Bedeutung. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bewertung des therapeutischen Potenzials von Eribulin als Systemtherapeutikum sowie als Partnersubstanz in der Kombinationsbehandlung mit TTFields. Daran anknüpfend sollte die Wirksamkeit beider Therapiemodalitäten erstmals auch im Gliosarkom untersucht werden.

Material und Methoden. Zunächst wurden mit Hilfe von MTT-Assay und Probit-Analyse Dosis-Wirkungs-Profile für Eribulin ermittelt und deren Beziehung zu den molekularen Markern TERT und MGMT analysiert. Auf dieser Grundlage erfolgte anschließend die Untersuchung der Therapiemodalitäten Eribulin und TTFields sowie deren Kombination, die mittels Zellzählung, Clonogenic Assay und FACS ausgewertet wurde. Schließlich wurden die Untersuchungen auch an humanen Gliosarkomzellen durchgeführt und die Ergebnisse mit dem Glioblastom verglichen.

Ergebnisse. Eribulin zeigte starke antiproliferative Effekte gegenüber humanen Glioblastomzellen sowie schwache Effekte gegenüber humanen Astrozyten. Diese Effekte waren größer, wenn ein positiver TERT-Promotor-Mutationsstatus und ein negativer

MGMT-Promotor-Methylierungsstatus vorlagen. Die Kombinationsbehandlung von Eribulin mit TTFields war sowohl einer Einzelbehandlung mit Eribulin als auch einer Einzelbehandlung mit TTFields in allen erfassten Messgrößen überlegen. Dieselben Befunde ließen sich auch im Gliosarkom erheben. Im Glioblastom konnten sowohl additive als auch unteradditive Kombinationseffekte der Therapiemodalitäten beobachtet werden, im Gliosarkom wurde ein synergistischer Kombinationseffekt festgestellt.

Schlussfolgerung. In der vorliegenden Arbeit wurde Eribulin experimentell sowohl als wirksame Einzelbehandlung als auch als potenter Kombinationspartner für TTFields in Glioblastom und Gliosarkom charakterisiert. Für die Zukunft gilt es, die experimentell wirksamen Therapiemodalitäten zunächst im Tiermodell und perspektivisch auch klinisch zu evaluieren, um den größtmöglichen Nutzen aus den neuen Erkenntnissen für Patienten mit Glioblastom und Gliosarkom zu schaffen.

5.2 Summary of the dissertation in English language

Introduction. Today, glioblastoma is still a disease with a poor prognosis for which only insufficient adequate systemic therapies are available. At the same time, the modern form of therapy of TTFields is becoming increasingly important. The aim of the present study was to evaluate the therapeutic potential of eribulin as a systemic therapeutic agent as well as a partner substance in combination therapy with TTFields. Following on from this, the effectiveness of both therapy modalities should also be examined in gliosarcoma for the first time.

Materials and methods. First, dose-effect profiles for eribulin were determined using MTT assay and probit analysis and the dependence on the molecular markers TERT and MGMT was analyzed. On this basis, the treatment modalities eribulin and TTFields as well as their combination were examined using cell counting, clonogenic assay and FACS. Finally, the studies were also carried out on human gliosarcoma cells and the results were compared with those of glioblastoma.

Results. Eribulin showed strong antiproliferative effects against human glioblastoma cells and weak effects against human astrocytes. These effects were stronger when the cells harboured a TERT promoter mutation and a negative MGMT methylation status. The combination therapy of eribulin with TTFields was superior to both monotherapy with eribulin and monotherapy with TTFields in all outcomes. The same findings were also found in gliosarcoma. In

glioblastoma, both additive and sub-additive combination effects of the therapy modalities could be observed, in gliosarcoma a synergistic combination effect was found.

Conclusions. In the present study, eribulin was experimentally characterized as both an effective monotherapy and a potent combination partner for TTFields in glioblastoma and gliosarcoma. For the future, the experimentally effective therapy modalities must first be evaluated in an animal model and, in the future, also clinically in order to create the greatest possible benefit from the new findings for patients with glioblastoma and gliosarcoma.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TERT-Mutationsfrequenz nach Tumorentitäten (Killela et al., 2013).....	7
Abbildung 2: Eribulin als Abkömmling des natürlich vorkommenden Halichondrin B (Modifiziert nach Cragg & Pezzuto, 2016).	18
Abbildung 3: Funktionen des TERT-Proteins (Maida & Masutomi, 2015).	19
Abbildung 4: Kaplan-Meier-Plots von Patienten mit Glioblastom der EF-14 Studie: Vergleich von TTFields plus TMZ mit TMZ-Einzelbehandlung (Modifiziert nach Mehta et al., 2017).....	26
Abbildung 5: Clonogenic Assay nach dreiwöchiger Inkubationsdauer.	53
Abbildung 6: Erfassung der Fluoreszenz der gefärbten Zellproben mittels FACS.....	56
Abbildung 7: Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Eribulin in Modellzelllinien und Patientenzelllinien.	63
Abbildung 8: Dosis-Wirkungs-Beziehung von humanen Astrozyten gegenüber Modellzelllinien des Glioblastoms.	64
Abbildung 9: IC ₅₀ der Zelllinien A-172, 447 und der humanen Astrozyten im Zeitverlauf.....	65
Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach TERT-Promotor-Mutationsstatus.....	67

Abbildung 11: Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach MGMT-Promotor-Methylierungsstatus.	68
Abbildung 12: Eribulin erreicht ein vollständiges Ansprechen in humanen Glioblastomzellen.	69
Abbildung 13: Eribulin senkt die klonogene Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen.	70
Abbildung 14: Eribulin steigert die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen.	71
Abbildung 15: TTFields senken die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen.	72
Abbildung 16: TTFields senken die klonogene Zellfraktion von humanen Glioblastomzellen.	73
Abbildung 17: TTFields steigern die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen.	74
Abbildung 18: Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen.	75
Abbildung 19: Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen mit Tendenz zur Abhängigkeit von der Verdopplungszeit.	77
Abbildung 20: Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die klonogene Zellfraktion humaner Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen in Abhängigkeit von der Zelllinie.	79

Abbildung 21: Die Kombination von Eribulin und TTFields steigert die apoptotische Zellfraktion in humanen Glioblastomzellen gegenüber den Einzelbehandlungen.	80
Abbildung 22: Ergebnisse der Interaktionsanalyse mit Berechnung der Kombinationsindices.	81
Abbildung 23: Eribulin hat antiproliferative Wirkung auf humane Gliosarkomzellen.	82
Abbildung 24: TTFields senken die überlebende Zellfraktion in humanen Gliosarkomzellen.	83
Abbildung 25: Die Kombination von Eribulin und TTFields senkt die überlebende Zellfraktion in humanen Gliosarkomzellen.	84
Abbildung 26: Ergebnisse der Interaktionsanalyse mit Berechnung des Kombinationsindex.	85
Abbildung 27: Produkt-Moment-Korrelationen der erfassten Messgrößen nach Zelllinien.	87

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	34
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	36
Tabelle 3: Chemikalien	39
Tabelle 4: Zellkultur	40
Tabelle 5: Inhibitoren und Farbstoffe	41
Tabelle 6: Übersicht über die untersuchten Patientenzelllinien	61
Tabelle 7: IC ₅₀ -Werte der Modellzelllinien in nM	63
Tabelle 8: IC ₅₀ -Werte der Patientenzelllinien in nM	63
Tabelle 9: Mittelwerte der Verdopplungszeit mit 95 %-Konfidenzintervallen	77
Tabelle 10: Vergleich der ermittelten IC ₅₀ -Werte von Takahashi et al. mit der vorliegenden Arbeit	102
Tabelle 11: Vergleich der von Takahashi et al. angewandten Methodik mit der vorliegenden Arbeit	102

8 Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
95 %-KI	95 %-Konfidenzintervall
ALT	Alternative lengthening of telomeres
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ATRX	Alpha-Thalassämie-Retardierungssyndrom-X
Bcl-2	B cell lymphoma 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Double-stranded-RNA
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
HRQoL	Gesundheitsbezogene Lebensqualität
IC₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
IC₉₅	95 %-inhibitorische Konzentration
IDH1	Isocitratdehydrogenase 1
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MPS1-IN-3	Monopolar Spindle 1 Kinase Inhibitor
MRT	Magnetresonanztomographie

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
Quadrant 1-4	Q1-4
RdRP	RNA-abhängige-RNA-Polymerase-Aktivität
RNA	Ribonukleinsäure
SAC	Spindle-assembly-checkpoint
siRNA	Small-interfering-RNA
STAT3	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3
TBN-Komplex	TERT-BRG1-Nukleostigmin-Komplex
TERC	Telomerase-Ribonukleinsäure-Komponente
TERT	Telomerase-Reverse-Transkriptase
TMZ	Temozolomid
TTFields	Tumor Treating Fields
WHO	World Health Organization
WST	5-(2,4-disulfophenyl)-2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazolium
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Literaturverzeichnis

Actor, B., Ludwig Cobbers, J. M. J., Büschges, R., Wolter, M., Knobbe, C. B., Reifenger, G., & Weber, R. G. (2002). Comprehensive analysis of genomic alterations in gliosarcoma and its two tissue components. *Genes Chromosomes and Cancer*. <https://doi.org/10.1002/gcc.10087>

Aksu, F., Arendt, G., Baumgartner, R. W., Benecke, R., Brevern, M. von, & Dörr, J. (2018). *Neurologie hoch2* (M. Sitzler, H. Steinmetz, S. Schurse, J. H. Schäfer, & L. Sams, Eds.; 1. Auflage). Elsevier.

Arita, H., Yamasaki, K., Matsushita, Y., Nakamura, T., Shimokawa, A., Takami, H., Tanaka, S., Mukasa, A., Shirahata, M., Shimizu, S., Suzuki, K., Saito, K., Kobayashi, K., Higuchi, F., Uzuka, T., Otani, R., Tamura, K., Sumita, K., Ohno, M., ... Ichimura, K. (2016). A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0351-2>

Back, D. J., Khoo, S. H., Gibbons, S. E., & Merry, C. (2001). The role of therapeutic drug monitoring in treatment of HIV infection. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 52(S1), 89–96. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2001.0520s1089.x>

Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (2018). LiverTox: Clinical and Research Information on Drug- Induced Liver Injury. In *NCBI NLM Nih.gov*.

Bronson, J., Dhar, M., Ewing, W., & Lonberg, N. (2011). Chapter 26 – To Market, To Market—2010. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*.

Cesare, A. J., & Reddel, R. R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: Models, mechanisms and implications. In *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg2763>

Chang, A. Y., & Ying, X. X. (2015). Brain metastases from breast cancer and response to treatment with eribulin: A case series. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*. <https://doi.org/10.4137/BCBCr.s21176>

Chang, E., Pohling, C., Beygui, N., Patel, C. B., Rosenberg, J., Ha, D. H., & Gambhir, S. S. (2017). Synergistic inhibition of glioma cell proliferation by Withaferin A and tumor treating fields. *Journal of Neuro-Oncology*, 134(2), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2534-5>

Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. In *Pharmacological Reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>

Cigler, T. & Jain. (2012). Eribulin mesylate in the treatment of metastatic breast cancer. *Biologics: Targets and Therapy*. <https://doi.org/10.2147/btt.s19811>

Cragg, G. M., & Pezzuto, J. M. (2016). Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Medical Principles and Practice: International Journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, 25 Suppl 2, 41–59. <https://doi.org/10.1159/000443404>

Ćukušić, A., Škrobot Vidaček, N., Sopta, M., & Rubelj, I. (2009). Telomerase regulation at the crossroads of cell fate. In *Cytogenetic and Genome Research*. <https://doi.org/10.1159/000167812>

Fidler, I. J., Yano, S., Zhang, R. D., Fujimaki, T., & Bucana, C. D. (2002). The seed and soil hypothesis: Vascularisation and brain metastases. In *Lancet Oncology*. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(01\)00622-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(01)00622-2)

Fujisawa, Y., Yoshino, K., Fujimura, T., Matsushita, S., Uchi, H., Yamamoto, Y., Hata, H., Otsuka, A., Miyagi, T., Ishii, M., & Funakoshi, T. (2018). The efficacy of eribulin for patients with taxane-resistant cutaneous angiosarcoma: Interim result of multi-center, prospective observational study. *Annals of Oncology*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy299.047>

Gidding, C. E. M., Kellie, S. J., Kamps, W. A., & De Graaf, S. S. N. (1999). Vincristine revisited. *Critical Reviews in*

Oncology/Hematology. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(98\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(98)00023-7)

Giladi, M., Lavy-Shahaf, G., S Schneiderman, R., Gotlieb, K., Zeevi, E., Porat, Y., Munster, M., Weinberg, U., & Kirson, E. (2018). COMP-15. META-ANALYSIS OF CANCER CELL LINES BASED ON THEIR RESPONSE TO TUMOR TREATING FIELDS (TTFIELDS). *Neuro-Oncology*, 20(suppl_6), vi66–vi67. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy148.270>

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

Giladi, M., Schneiderman, R. S., Voloshin, T., Porat, Y., Munster, M., Blat, R., Sherbo, S., Bomzon, Z., Urman, N., Itzhaki, A., Cahal, S., Shteingauz, A., Chaudhry, A., Kirson, E. D., Weinberg, U., & Palti, Y. (2015). Mitotic Spindle Disruption by Alternating Electric Fields Leads to Improper Chromosome Segregation and Mitotic Catastrophe in Cancer Cells. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep18046>

Gregoriadis, G. (2006). Liposome technology: Interactions of liposomes with the biological milieu. In *Liposome Technology: Interactions of Liposomes with the Biological Milieu*.

Groves, M., Schneiderman, R., Zeevi, E., Voloshin, T., Giladi, M., Kirson, E., & Weinberg, U. (2016). NIMG-39. CYTOSTATIC AGENTS COMBINED WITH TUMOR TREATING FIELDS (TTFIELDS) IN GLIOMA CELL LINES. *Neuro-Oncology*, 18(suppl_6), vi133–vi133. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now212.551>

Hacke, W. (Ed.). (2016). *Neurologie*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-46892-0>

Helfrich, B. A., Gao, D., & Bunn, P. A. (2018). Eribulin inhibits the growth of small cell lung cancer cell lines alone and with radiotherapy. *Lung Cancer*, 118, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.02.001>

Henker, C. (2019). 29. Intrakranielle Tumoren. In J. Piek (Ed.), *Neurochirurgie für Einsteiger* (pp. 197–214). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110611304-029>

Hirata, Y. (1986). Halichondrins—Antitumor polyether macrolides from a marine sponge. In *Pure and Applied Chemistry*.

Inoue, K., Saito, T., Okubo, K., Kimizuka, K., Yamada, H., Sakurai, T., Ishizuna, K., Hata, S., Kai, T., & Kurosumi, M. (2016). Phase II clinical study of eribulin monotherapy in Japanese patients with metastatic breast cancer who had well-defined taxane resistance. *Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3808-x>

Jo, Y., Kim, E. H., Sai, S., Kim, J. S., Cho, J.-M., Kim, H., Baek, J.-H., Kim, J.-Y., Hwang, S.-G., & Yoon, M. (2018). Functional Biological Activity of Sorafenib as a Tumor-Treating Field Sensitizer for Glioblastoma Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), E3684. <https://doi.org/10.3390/ijms19113684>

Jordan, M. A., Kamath, K., Manna, T., Okouneva, T., Miller, H. P., Davis, C., Littlefield, B. A., & Wilson, L. (2005). The primary antimitotic mechanism of action of the synthetic halichondrin E7389 is suppression of microtubule growth. *Molecular Cancer Therapeutics*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0345>

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

Killela, P. J., Reitman, Z. J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L. A., Friedman, A. H., Friedman, H., Gallia, G. L., Giovannella, B. C., Grollman, A. P., He, T. C., He, Y., Hruban, R. H., Jallo, G. I., Mandahl, N., Meeker, A. K., Mertens, F., Netto, G. J., ... Yan, H. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303607110>

Kim, E. H., Kim, Y. J., Song, H. S., Jeong, Y. K., Lee, J. Y., Sung, J., Yoo, S. H., & Yoon, M. (2016). Biological effect of an alternating electric field on cell proliferation and synergistic antimitotic effect in combination with ionizing radiation. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11407>

Kim, J.-Y., Jo, Y., Oh, H.-K., & Kim, E. H. (2020). Sorafenib increases tumor treating fields-induced cell death in glioblastoma by inhibiting STAT3. *American Journal of Cancer Research*, 10(10), 3475–3486.

Kirson, E. D., Gurvich, Z., Schneiderman, R., Dekel, E., Itzhaki, A., Wasserman, Y., Schatzberger, R., & Palti, Y. (2004). Disruption of Cancer Cell Replication by Alternating Electric Fields. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0083>

Kolb, E. A., Gorlick, R., Reynolds, C. P., Kang, M. H., Carol, H., Lock, R., Keir, S. T., Maris, J. M., Billups, C. A., Desjardins, C., Kurmasheva, R. T., Houghton, P. J., & Smith, M. A. (2013). Initial testing (stage 1) of eribulin, a novel tubulin binding agent, by the pediatric preclinical testing program. *Pediatric Blood and Cancer*. <https://doi.org/10.1002/pbc.24517>

Kozak, K. R., Mahadevan, A., & Moody, J. S. (2009). Adult gliosarcoma: Epidemiology, natural history, and factors associated with outcome. *Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1215/15228517-2008-076>

Kuznetsov, G., Towle, M. J., Cheng, H., Kawamura, T., TenDyke, K., Liu, D., Kishi, Y., Yu, M. J., & Littlefield, B. A. (2004). Induction of Morphological and Biochemical Apoptosis following Prolonged Mitotic Blockage by Halichondrin B Macrocyclic Ketone Analog E7389. *Cancer Research*, 64(16), 5760–5766. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1169>

Kyo, S., Takakura, M., Fujiwara, T., & Inoue, M. (2008). Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. In *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00878.x>

Lee, Y. J., Cho, J. M., Sai, S., Oh, J. Y., Park, J. A., Oh, S. J., Park, M., Kwon, J., Shin, U. S., Beak, J. H., Lim, S. H., Song, J. Y., Hwang, S. G., & Kim, E. H. (2019). 5-fluorouracil as a tumor-treating field-sensitizer in colon cancer therapy. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers11121999>

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. In *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>

Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G.,

Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>

Maida, Y., & Masutomi, K. (2015). Telomerase reverse transcriptase moonlights: Therapeutic targets beyond telomerase. In *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/cas.12806>

Marion, R. M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2009). Telomeres Acquire Embryonic Stem Cell Characteristics in Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.12.010>

Matsuoka, H., Tsurutani, J., Tanizaki, J., Iwasa, T., Komoike, Y., Koyama, A., & Nakagawa, K. (2013). Regression of brain metastases from breast cancer with eribulin: A case report. *BMC Research Notes*. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-541>

McDonald, M., Corde, S., Lerch, M., Rosenfeld, A., Jackson, M., & Tehei, M. (2018). First in vitro evidence of modulated electro-hyperthermia treatment performance in combination with megavoltage radiation by clonogenic assay. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34712-0>

Mehta, M., Wen, P., Nishikawa, R., Reardon, D., & Peters, K. (2017). Critical review of the addition of tumor treating fields (TTFields) to the existing standard of care for newly diagnosed glioblastoma patients.

Critical Reviews in Oncology/Hematology, 111, 60–65.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.01.005>

Nassir, N., Hyde, G. J., & Baskar, R. (2019). A telomerase with novel non-canonical roles: Tert controls cellular aggregation and tissue size in dictyostelium. *PLoS Genetics*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008188>

Nguyen, H. N., Lie, A., Li, T., Chowdhury, R., Liu, F., Ozer, B., Wei, B., Green, R. M., Ellingson, B. M., Wang, H., Elashoff, R., Liau, L. M., Yong, W. H., Nghiemphu, P. L., Cloughesy, T., & Lai, A. (2016). Human TERTpromoter mutation enables survival advantage from MGMT promoter methylation in IDH1 wild-type primary glioblastoma treated by standard chemoradiotherapy. *Neuro-Oncology*, now189.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/now189>

Novocure GmbH (Director). (2020). *TTFields*.
<https://www.optune.de/wirkungsweise-von-optune/>

Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2021). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro-Oncology*, 23(12 Suppl 2), iii1–iii105.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noab200>

Porat, Y., Giladi, M., Schneiderman, R. S., Blat, R., Shteingauz, A., Zeevi, E., Munster, M., Voloshin, T., Kaynan, N., Tal, O., Kirson, E. D., Weinberg, U., & Palti, Y. (2017). Determining the optimal inhibitory

frequency for cancerous cells using tumor treating fields (TTFields). *Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/55820>

Regazzi, M. B., Villani, P., Maserati, R., Seminari, E., Pan, A., LoCaputo, F., Gambarana, E., & Fiocchi, C. (2000). Clinical pharmacokinetics of nelfinavir combined with efavirenz and stavudine during rescue treatment of heavily pretreated HIV-infected patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(3), 343–347. <https://doi.org/10.1093/jac/45.3.343>

Reis, R. M., Könü-Lebleblicioglu, D., Lopes, J. M., Kleihues, P., & Ohgaki, H. (2000). Genetic profile of gliosarcomas. *American Journal of Pathology*. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64746-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64746-3)

Riede, U.-N., & Werner, M. (Eds.). (2017). *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-48725-9>

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*.

Schneiderman, R., Zeevi, E., Giladi, M., Kirson, E. D., Weinberg, U., & Palti, Y. (2017). EXTH-45. THE COMBINATION OF TTFIELDS AND ABT-414 DEMONSTRATE SUPERIOR EFFICACY AGAINST GLIOMA CELLS. *Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox168.337>

Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/35036093>

Shteingauz, A., Porat, Y., Voloshin, T., Schneiderman, R. S., Munster, M., Zeevi, E., Kaynan, N., Gotlib, K., Giladi, M., Kirson, E. D., Weinberg, U., Kinzel, A., & Palti, Y. (2018). AMPK-dependent autophagy upregulation serves as a survival mechanism in response to Tumor Treating Fields (TTFields). *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1085-9>

Smith, J. A., Wilson, L., Azarenko, O., Zhu, X., Lewis, B. M., Littlefield, B. A., & Jordan, M. A. (2010). Eribulin binds at microtubule ends to a single site on tubulin to suppress dynamic instability. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi901810u>

Spindeldreier, K., Thiesen, J., Lipp, H. P., & Krämer, I. (2014). Physico-chemical stability of eribulin mesylate containing concentrate and ready-to-administer solutions. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. <https://doi.org/10.1177/1078155213492449>

Stummer, W., Reulen, H.-J., Meinel, T., Pichlmeier, U., Schumacher, W., Tonn, J.-C., Rohde, V., Oppel, F., Turowski, B., Woiciechowsky, C., Franz, K., Pietsch, T., & ALA-Glioma Study Group. (2008). Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: Identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*, 62(3), 564–576; discussion 564-576. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000317304.31579.17>

Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D. M., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meco, F., Lieberman, F., Zhu, J. J., Stragliotto, G., Tran, D. D., Brem, S., Hottinger, A. F., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., ... Ram, Z. (2017). Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma a randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*.
<https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>

Takahashi, M., Miki, S., Fujimoto, K., Fukuoka, K., Matsushita, Y., Maida, Y., Yasukawa, M., Hayashi, M., Shinkyo, R., Kikuchi, K., Mukasa, A., Nishikawa, R., Tamura, K., Narita, Y., Hamada, A., Masutomi, K., & Ichimura, K. (2019). Eribulin penetrates brain tumor tissue and prolongs survival of mice harboring intracerebral glioblastoma xenografts. *Cancer Science*.
<https://doi.org/10.1111/cas.14067>

Tanzhu, G., Chen, L., Xiao, G., Shi, W., Peng, H., Chen, D., & Zhou, R. (2022). The schemes, mechanisms and molecular pathway changes of Tumor Treating Fields (TTFields) alone or in combination with radiotherapy and chemotherapy. *Cell Death Discovery*, 8(1), 416.
<https://doi.org/10.1038/s41420-022-01206-y>

Taphoorn, M. J. B., Dirven, L., Kanner, A. A., Lavy-Shahaf, G., Weinberg, U., Taillibert, S., Toms, S. A., Honnorat, J., Chen, T. C., Sroubek, J., David, C., Idbaih, A., Easaw, J. C., Kim, C. Y., Bruna, J.,

Hottinger, A. F., Kew, Y., Roth, P., Desai, R., ... Stupp, R. (2018). Influence of treatment with tumor-treating fields on health-related quality of life of patients with newly diagnosed glioblastoma a secondary analysis of a randomized clinical trial. *JAMA Oncology*. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.5082>

Tiedge, O. (2008). *Kombinationswirkungen nicht linearer Dosis-Wirkungsbeziehungen* [Doctoralthesis]. Universität Würzburg.

Touat, M., Idbaih, A., Sanson, M., & Ligon, K. L. (2017). Glioblastoma targeted therapy: Updated approaches from recent biological insights. In *Annals of oncology: Official journal of the European Society for Medical Oncology*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx106>

Towle, M. J., Salvato, K. A., Budrow, J., Wels, B. F., Kuznetsov, G., Aalfs, K. K., Welsh, S., Zheng, W., Seletsky, B. M., Palme, M. H., Habgood, G. J., Singer, L. A., Dipietro, L. V., Wang, Y., Chen, J. J., Quincy, D. A., Davis, A., Yoshimatsu, K., Kishi, Y., ... Littlefield, B. A. (2001). In vitro and in vivo anticancer activities of synthetic macrocyclic ketone analogues of halichondrin B. *Cancer Research*.

Towle, M. J., Salvato, K. A., Wels, B. F., Aalfs, K. K., Zheng, W., Seletsky, B. M., Zhu, X., Lewis, B. M., Kishi, Y., Yu, M. J., & Littlefield, B. A. (2011). Eribulin induces irreversible mitotic blockade: Implications of cell-based pharmacodynamics for in vivo efficacy

under intermittent dosing conditions. *Cancer Research*.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1874>

Twelves, C., Loesch, D., Blum, J. L., Vahdat, L. T., Petrakova, K., Chollet, P. J., Akerele, C. E., Seegobin, S., Wanders, J., & Cortes, J. (2010). A phase III study (EMBRACE) of eribulin mesylate versus treatment of physician's choice in patients with locally recurrent or metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *Journal of Clinical Oncology*.
https://doi.org/10.1200/jco.2010.28.18_suppl.cra1004

Valeriote, F., & Lin, H. S. (1975). Synergistic interaction of anticancer agents: A cellular perspective. *CANCER CHEMOTHER.REP*.

Vargas-Toscano, A., Nickel, A.-C., Li, G., Kamp, M. A., Muhammad, S., Leprivier, G., Fritsche, E., Barker, R. A., Sabel, M., Steiger, H.-J., Zhang, W., Hänggi, D., & Kahlert, U. D. (2020). Rapalink-1 Targets Glioblastoma Stem Cells and Acts Synergistically with Tumor Treating Fields to Reduce Resistance against Temozolomide. *Cancers*, 12(12), 3859. <https://doi.org/10.3390/cancers12123859>

Vetter, C. (2011). Eribulin – erster Vertreter einer neuen Substanzklasse. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 23, 30.

Voloshin, T., Munster, M., Blatt, R., Shteingauz, A., Roberts, P. C., Schmelz, E. M., Giladi, M., Schneiderman, R. S., Zeevi, E., Porat, Y., Bomzon, Z., Urman, N., Itzhaki, A., Cahal, S., Kirson, E. D., Weinberg, U., & Palti, Y. (2016). Alternating electric fields (TTFields)

in combination with paclitaxel are therapeutically effective against ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.30406>

Wang, M., Zhang, C., Wang, X., Yu, H., Zhang, H., Xu, J., Zhao, J., & Jiang, X. (2021). Tumor-treating fields (TTFields)-based cocktail therapy: A novel blueprint for glioblastoma treatment. *American Journal of Cancer Research*, 11(4), 1069–1086.

Wang, W. L., Aru, N., Liu, Z., Shen, X., Ding, Y. M., Wu, S. J., Qin, H. H., & Jin, W. Y. (2019). Prognosis of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with molecularly targeted drugs combined with radiotherapy vs temozolomide monotherapy: A meta-analysis. *Medicine*. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017759>

Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., Surani, M. A., Sakaki, Y., & Sasaki, H. (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06908>

Weiß, L. M., Hugle, M., & Fulda, S. (2017). Eribulin alone or in combination with the PLK1 inhibitor BI 6727 triggers intrinsic apoptosis in Ewing sarcoma cell lines. *Oncotarget*, 8(32), 52445–52456. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17190>

Wick et al. (2021). *Gliome, S2k-Leitlinie, 2021, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und*

Therapie in der Neurologie. Online: Www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 28.04.2022).

Yamaguchi, S., Maida, Y., Yasukawa, M., Kato, T., Yoshida, M., & Masutomi, K. (2014). Eribulin mesylate targets human telomerase reverse transcriptase in ovarian cancer cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112438>

Yoshida, T., Ozawa, Y., Kimura, T., Sato, Y., Kuznetsov, G., Xu, S., Uesugi, M., Agoulnik, S., Taylor, N., Funahashi, Y., & Matsui, J. (2014). Eribulin mesilate suppresses experimental metastasis of breast cancer cells by reversing phenotype from epithelial-mesenchymal transition (EMT) to mesenchymal-epithelial transition (MET) states. *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.80>

Yu, W., Zhang, L., Wei, Q., & Shao, A. (2020). O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. *Frontiers in Oncology*, 9, 1547. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01547>

Yuan, Y., Qi, C., Maling, G., Xiang, W., Yanhui, L., Ruofei, L., Yunhe, M., Jiewen, L., & Qing, M. (2016). TERT mutation in glioma: Frequency, prognosis and risk. *Journal of Clinical Neuroscience*, 26, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.05.066>

10 Publikationsverzeichnis

10.1 Publierte Abstracts

Beusker P, Gött H, Kolodziej M, Uhl E, Stein M. The combination therapy of Tumor Treating Fields with the TERT-inhibitor eribulin shows synergistic antiproliferative effects on human glioblastoma cells. *Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie. 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), 06.-09.06.2021. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2021. DocP152; doi: 10.3205/21dgnc437.*

Stein M, Beusker P, Gött H, Kolodziej M, Uhl E. EXTH-05. Tumor Treating Fields in combination with the TERT-Inhibitor Eribulin have synergistic antiproliferative effects on human glioblastoma cells. *Neuro-Oncology, Volume 23, Issue Supplement_6, November 2021, Page vi164, <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab196.644>*

10.2 Sonstige Vorträge und Poster

Vortrag:

Sektionstagung Neuroonkologie der deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie 2019 (Heidelberg, 11.10.–12.10.2019)

TERT-inhibitor Eribulin shows antiproliferative effects on human glioblastoma cells.

Autor und Referent: Beusker P

Vortrag:

Sektionstagung Neuroonkologie der deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie 2020 (Berlin, 16.10.–17.10.2020)

The TERT-inhibitor eribulin shows promising antiproliferative effects on human glioblastoma cells.

Autor: Beusker P

Referent: Stein M

ePoster:

72. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (Erfurt, 06.06.–09.06.2021)

The combination therapy of Tumor Treating Fields with the TERT-inhibitor eribulin shows synergistic antiproliferative effects on human glioblastoma cells.

Autor und Referent: Beusker P

Vortrag:

16th Meeting & Educational Day of the European Association of Neuro-Oncology (Rotterdam, 23.09.–26.09.2021)

The combination therapy of Tumor Treating Fields with the TERT-inhibitor eribulin shows synergistic antiproliferative effects on human glioblastoma cells.

Autor: Beusker P

Referent: Stein M

11 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner

11 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort und Datum

Unterschrift

12 Danksagung

In mehreren Jahren der Gespräche, Recherche, Konzeption, Laborarbeit, Auswertung, Präsentation, Schriftstellung und Evaluation trifft man als Doktorand zahlreiche Menschen, die viele kleine und einige große Richtungsänderungen auf dem Weg zur Promotion anstoßen und sie nachhaltig beeinflussen. Ich habe nicht zuletzt durch meine Zeit als Doktorand in der Neuroonkologie erfahren, dass ich beruflich im atemberaubenden Feld der Onkologie wirken möchte. Für diese und viele weitere Erkenntnisse bin ich jedem einzelnen der oben erwähnten Menschen zum Dank verpflichtet, auch wenn sich diese hier nicht namentlich erwähnt finden. Mit besonderem Dank möchte ich mich hier an die folgenden Menschen und Institutionen richten.

Prof. Dr. Marco Stein für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit.

Prof. Dr. Eberhard Uhl und der Klinik für Neurochirurgie für die Überlassung der Räumlichkeiten, Geräte und Materialien zur Durchführung der Laborarbeit.

Dr. Hanna Gött für die Unterstützung bei der Versuchsplanung und Einführung in die Experimente.

Frau Gilda Kierok und Frau Inga Dorn für die geduldige Einarbeitung und tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit.

Prof. Dr. Till Acker und dem Institut für Neuropathologie für die Durchführung der molekulargenetischen Untersuchungen der primären Tumorpräparate.

Herrn Moshe Giladi, PhD und Novocure Ltd. für die Supervision der TTFields-Experimente sowie die Überlassung des inovitro™-Systems.

PD Dr. Christian Koch und der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin für die Überlassung der Räumlichkeiten und Geräte zur Sterilisation.

Prof. Dr. Gregor Bein und dem Institut für klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie für die Überlassung der Räumlichkeiten und Geräte zur FACS.

Frau Gabriela Michel für die Einarbeitung und Unterstützung bei der FACS.