

Aus der
Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen

**IKCa K⁺-Kanäle als Modulatoren der tumoriziden und
Radioresistenz-vermittelnden Wirkung von TTFields-
Elektrotherapie in primären Glioblastom-Stammzellkulturen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanwissenschaften**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Abed, Tayeb

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber

2. Berichterstatter: Professorin Dr. C. Weigert

Tag der Disputation: 23.06.2026

Meiner Familie, für ihre Liebe und Geduld

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1. Glioblastoma multiforme	1
1.2 TTFields-Elektrotherapie	1
1.3 Postulierte Elemente der molekularen Perzeption von TTFields	2
1.4 Weitere therapeutische TTFields-Wirkungen	3
1.5 Postulierte biologische TTFields-Effekte und Signalling	3
1.6 Das inovitro™ TTFields-Applikationssystem kann nicht zwischen hyperosmotischen Stress- und TTFields-induzierten Effekten unterscheiden (Kapitel aus ⁹⁴ , verändert)	4
1.7 Alternativ diskutierte molekulare Mechanismen der TTFields-Effekte	6
1.8 Biologische Voltmeter (Kapitel aus ⁹⁴ , verändert)	7
1.9 TTFields-Behandlung konkomitant zur Radio-Temozolomid-Therapie	9
1.10 Projektziele	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Anlegen und Kultivierung von patientenstämmige stammzellangereicherten Glioblastom Sphäroid (pGSCs)-Kulturen und Züchten der CD276-gerichtete CAR NK-92 Zelllinie	11
2.2 Molekulare Charakterisierung der pGSCs mittels Reverse-Transkription Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)	12
2.3 Analyse des klonogenen Überlebens der pGSCs mittels „Limited Dilution Assay“	12
2.4 Design und Evaluierung eines isothermen und isoosmotischen Tumor-Treating-Fields (TTFields) Multiloch-Zellkulturplatten-Applikators	13
2.5 <i>KCNN4</i> -Knockdown mittels inverser siRNA-Transfektion	16
2.6 Behandlung der pGSCs mit Einmal- und fraktionierter ionisierender Strahlung	16
2.7 Kombinierte Behandlung der pGSC-Kulturen mit TTFields, ionisierender Strahlung und pharmakologischem/molekularem K ⁺ -Kanal Targeting	16
2.8 Immunhistologische Bestimmung der residuellen nukleären γH2Ax-Foci als Surrogat-Marker nicht-reparierter DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSBs)	17
2.9 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie	18
2.10 Patch-Clamp Ableitungen	18
2.11 TTFields Einzelzell-Applikation	20
2.12 Transkriptomanalyse	21
2.12.1 RNA-Aufbereitung und RNA-Bibliothek (durch IMG M Laboratories GmbH, München-Martinsried, Deutschland)	21
2.12.2 RNA-Sequenzierung (durch IMG M Laboratories)	22
2.12.3 RNAseq-Daten-Analyse (durch IMG M Laboratories)	22
2.12.4 Hauptkomponenten-Analyse, Volcanoplot und Netzwerke	22
2.13 pGSC-Lyse durch CD276-gerichteter Chimäre-Antigen-Rezeptor (CAR)-Natürliche Killer (NK)-92-Zellen	23

2.14 Statistik	24
3 Ergebnisse.....	25
3.1 Aufbau einer möglichst homogenen Kohorte von pGSC-Kulturen	25
3.2 Das „in-house“ entwickelte TTFields-Applikationssystem appliziert 200 kHz elektrische Wechselfelder unter isoosmotischen und isothermen Bedingungen.	25
3.3 TTFields-Kurzzeitbehandlung erniedrigt das klonogene Überleben und erhöht die Radiosensitivität der pGSC-Kulturen.	26
3.5 Kurzzeit-TTFields-Behandlung verbessert die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach 2 Gy-Einmalbestrahlung in TA11 nicht aber in TA4 pGSC-Kulturen.....	31
3.6 TTFields modifizieren nicht den Zellzyklus unbestrahlter und bestrahlter TA11 pGSC-Kulturen.	32
3.7 TTFields aktivieren einwärtsrektifizierende, TRAM-34-sensitive und K ⁺ -selektive IK _{Ca} -Kanäle in der Plasmamembran von TA4- und TA11-pGSCs.....	36
3.8 IK _{Ca} -Blockade durch TRAM-34 verbessert die tumorizide TTFields-Wirkung in TA11- und TA16- und verringert den Radioresistenz-vermittelnden TTFields-Effekt in TA4-pGSCs.	38
3.9 <i>KCNN4</i> RNA-Interferenz erniedrigt die funktionelle Expression von IK _{Ca} -Kanälen in der Plasmamembran von TA4 pGSCs.....	42
3.10 <i>KCNN4</i> -Knockdown erniedrigt tendenziell die basale Klonogenizität sowie nach Einmal-Bestrahlung die TTFields-vermittelte Klonogenizitätssteigerung in TA4-pGSCs.....	46
3.11 Die Hemmung von BK _{Ca} -Kanälen mit Paxilline modifiziert nicht die tumoriziden und Radioresistenz-vermittelnden TTFields-Effekte in TA4-, TA11- und TA16 pGSCs.....	48
3.12 Transkriptomanalyse und Kandidaten für TTFields-regulierten Signalwege.	50
3.13 TTFields hemmen nicht die Lyse von pGSC-Kulturen durch CAR-NK92-Zellen	56
4 Diskussion	57
4.1 Biologische TTFields-Antworten	57
4.2 Tumorizide TTFields-Wirkung	57
4.3 TTFields-Effekte auf Radioresistenz.....	57
4.4 TTFields-Effekte auf DNA-Reparatur und Zell-Zyklus.....	58
4.5 TTFields-assoziierte Ionenkanal-Aktivitäten	59
4.6 IK _{Ca} als TTFields-Resistenzfaktor und Vermittler einer TTFields-induzierten Radioresistenz	60
4.6.1 IK _{Ca} -Funktion im Ca ²⁺ -Signalosom. Ca ²⁺ -aktivierte K ⁺ -Kanäle beeinflussen dabei in reziproker Weise wiederum das Ca ²⁺ -Signalling.	60
4.6.2 Ca ²⁺ -Signalling im radiogenen Zellzyklusarrest.	60
4.6.3 Ca ²⁺ -Signalling und Reparatur radiogener DNA-Schäden.	61
4.6.4 Ca ²⁺ -Signaltransducer-Proteine.	61
4.6.5 IK _{Ca} -zielgerichtete Therapie.	62
4.7 Transkriptom	62
4.8 Immunsystem	63
4.9 Patienten-individuelle Unterschiede	63

4.9.1 Molekulare Glioblaston Subklassen.....	63
4.9.2 Treibermutationen	64
4.10 Schlussfolgerungen und Ausblick	64
4.11 Limitationen.....	65
4.11.1 Technisch-methodisch.....	65
4.11.2 Biologisch.....	66
4.11.3 Inhaltlich	66
5 Zusammenfassung.....	67
6 Literatur	69
7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	82
8 Veröffentlichungen.....	83
9 Danksagung	84

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

1-EBIO: 1-Ethyl-2-Benzimidazolinon
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR: Ataxia Telangiectasia and Rad3-related
CaMKII: Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase-II
CAR: Chimärer Antigen-Rezeptor
CD276: Cluster of Differentiation-276 (B7-H3, Mitglied der B7-Checkpoint-Molekül-Familie)
 C_t -Werte: Threshold Cycle-Werte
DAPI: 4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMSO: Dimethylsulfoxid
DNA-DSBs: DNA-Doppelstrangbrüche
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure
EGF(R): Epidermaler Wachstumsfaktor (-Rezeptor)
 E_K : elektrochemisches Gleichgewichtspotenzial für K^+
EP3: Prostaglandin E2-Rezeptor-3
FACS: Fluorescence-activated Cell Sorting
FDR: False Discovery Rate (Falscherkennungsrate)
 γH2Ax : phospho-(Ser139)-Histon 2Ax
 $G_{(\text{inward})}$: Leitfähigkeit (für die Einwärtsströme berechnet)
Gy: Gray (Grey)
LDA: Limited Dilution Assay
mTOR: Mammalian Target of Rapamycin
NHEJ: Nicht-homologes End-Joining von DNA-Doppelstrangbrüchen
NK-Zelle: natürliche Killer -Zelle
p: Irrtumswahrscheinlichkeit
PARP: Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS: Phosphate-buffered Solution
PE: Plating Efficiency
(p)GSC(s): (patientenstämmige) Glioblastom-Stammzelle(n)
PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase
PI: Propidiumiodid
RT-PCR: Reverse-Transkription Polymerase-Ketten-Reaktion
SF: Survival Fraction
siRNA: small-interfering RNA
TRAM-34: 1-[(2-Chlorophenyl)Diphenylmethyl]-1H-Pyrazol
TTFIELDS: Tumor-Treating Fields
USP6NL: Ubiquitin-specific Protease 6 n-Terminal-like Protein
 V_{membr} : Membranpotenzial
 V_{pp} : $V_{\text{peak-peak}}$
 V_{rev} : Umkehrpotenzial

1 Einleitung

1.1. Glioblastoma multiforme

Das Glioblastom ist der häufigste primäre (d. h. im Gehirn entstehende) Hirntumor bei Erwachsenen und wird als Isozitat-Dehydrogenase (IDH)-Wildtyp WHO Grad 4 Gliom klassifiziert ¹. Die Standardtherapie beinhaltet (wenn möglich) die chirurgische makroskopische Kompletresektion mit anschließender konkomitanter Temozolomid-Radiotherapie. Dabei werden in der Regel 60 Gy in 30 Fraktionen auf das Tumorbett, das umgebende Ödem (mit angenommenen, disseminierten Glioblastomzellen) sowie einen zusätzlichen Sicherheitssaum von wenigen mm appliziert. Das Blut-Hirn-Schranken-gängige Temozolomid zerfällt spontan in Diazomethan, welches DNA-Basen methyliert und über weitere Zellteilungen und die DNA-Mismatch-Reparatur Doppelstrangbrüche in die DNA einfügt ². Nach der Temozolomid-Radiotherapie schließt eine adjuvante Temozolomid-Erhaltungstherapie bis zum Auftreten von Glioblastomrezidiven an ³. Rezidivierende Glioblastome werden (wenn möglich) re-reseziert, re-bestrahlt und/oder mit weiteren Chemo- oder „targeted“ (zielgerichteten) Therapien (Physicians' Choice) bzw. „Best supportive Care“ weiterbehandelt ⁴.

Patienten mit (hyper-)methyliertem Promotor des Temozolomid-Resistenzgens O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) und deswegen geringerer MGMT-Aktivität profitieren besonders von der Temozolomid-Chemotherapie ⁵. Bei MGMT-Promoter unmethylierten Glioblastomen ist zudem eine auf 31 CpG-Inseln beruhende Methylierungssignatur prädiktiv für das Ansprechen auf Temozolomid ⁶. Temozolomid-sensitive Tumoren mit methyliertem MGMT-Promotor können andererseits eine Temozolomidresistenz erwerben, unter anderem über Verlust der Fähigkeit zur DNA-Mismatch-Reparatur ².

Trotz dieser trimodalen Therapie haben Glioblastom-Patienten weiterhin eine sehr schlechte Prognose mit einem medianen Gesamtüberleben von < 2 Jahren (ab Diagnose). Ursächlich hierfür scheint vermutlich die hohe Streuung der Glioblastomzellen im Gehirn und die hohe Therapieresistenz der Tumorzellen zu sein. Hier stehen insbesondere Glioblastom Stamm(-Zell-ähnliche)-Zellen (GSCs) unter Verdacht, kleine therapieresistente Subpopulationen im Tumor zu bilden und für die Rezidivierung des Hirntumors verantwortlich zu sein ⁷. Ältere Arbeiten meiner Arbeitsgruppe in Tübingen zeigten, dass Glioblastome mit mesenchymalen GSCs im Vergleich zu Tumoren mit proneuralen GSCs *ex vivo* ein stärker invasives Wachstum und eine höhere Radioresistenz aufweisen und mit einer schlechteren Prognose und einer stärker Gehirn-infiltrierenden Tumormorphologie der Glioblastompatienten einhergehen ^{8,9}. Weiterentwicklungen der Glioblastom-Therapie sollten daher auch daran gemessen werden, inwieweit sie die GSC-Subpopulation im Glioblastom eradizieren können.

1.2 TTFields-Elektrotherapie

Neue Therapieansätze wie die onkolytische Virustherapie, Immuntherapien (Immuncheckpoint-Inhibitoren, CAR-T-Zelltherapien, Tumorstämme, Übersichtsartikel in ¹⁰), oder adjuvante Applikation zusätzlicher Alkylantien wie des Nitrosoharnstoffs Lomustin (CCNU) ¹¹ sind derzeit noch in initialen Studien oder erbrachten nur sehr bescheidene Ergebnisse. Einzig eine von der Firma Novocure in Haifa, Israel, entwickelte Tumor Treating Fields (TTFields)-Elektrotherapie (adjuvant zur Temozolomid-Erhalt-Chemotherapie) führte bei neudiagnostizierten Glioblastompatienten in der randomisierten (aber nicht placebo-kontrollierten) multizentrischen EF-14 Studie zu einem klinisch relevanten Überlebensvorteil (progressionsfreies und Gesamtüberleben) der Glioblastompatienten

insbesondere bei MGMT-Promotor-methylierten Tumoren ^{12, 13}. Weitere (aber nicht alle ¹⁴) kleinere pro- oder retrospektive klinische Studien an neudiagnostizierten Glioblastompatienten (¹⁵⁻²³) deuten ebenfalls auf einen Benefit von TTFields-Therapie adjuvant zur Temozolomid-Erhaltchemotherapie hin.

Die TTFields-Therapie, die inzwischen in Deutschland bei neudiagnostiziertem und rezidiviertem Glioblastom zugelassen ist, appliziert elektrische 200 kHz Wechselfelder mit einer Feldstärke im einstelligen V/cm-Bereich. Die Einkopplung der Felder in das Gehirn erfolgt kapazitiv über auf die rasierte Kopfhaut aufgeklebte Keramikelektroden-Arrays. Gespeist wird der Elektrische-Feld-Generator dabei über ein Netzgerät oder über im Rucksack tragbare Akkus. Die Patienten werden dabei angehalten, die Felder täglich und möglichst lange am Tag anzulegen. Tatsächlich deuteten Posthoc-Analysen zweier retrospektiven Studien ^{24, 25} darauf hin, dass eine hohe Compliance (> 2 Monate TTFields-Behandlung in > 75% der Zeit) einen positiven prognostischen Faktor darstellt. Posthoc-Analysen der EF-14-Studie ¹³ zeigten direkt mithilfe MRT-Images, Position der aufgeklebten Elektroden-Arrays und den Generator-Feld-Applikations-Protokollen eine positive Korrelation der TTFields-Dosisverteilung im Bereich des Tumorbettes mit dem Patientenüberleben ²⁴ sowie dem Muster der Tumorprogression ¹⁸. Zudem wurde bei einer weiteren Posthoc-Analyse einer Subgruppe der EF-14 Patienten die lokal applizierte TTFields-Feldstärken unter Verwendung anatomischer Dosisverteilungsmodellen retrospektiv abgeschätzt. Hier zeigte sich, dass die Tumorprogression in dem TTFields-Behandlungsarm – bezogen auf die primäre Läsion – in entfernteren Hirnarealen als in den Tumoren des Kontrollarms auftrat ²⁶. Diese TTFields-assoziierte distantere Rezidivierung wurde auch in einer jüngeren Studie an einer anderen Patientenkohorte beobachtet ²². Es scheint also, dass - im Sinne einer besseren lokalen Tumorkontrolle - im „Hochdosis“-TTFields-Bereich des Gehirns eine Rezidivierung des Tumors verhindert wird, die Glioblastomprogression dann später in „Niedrigdosis“-TTFields Gehirnarealen auftritt (alternativ wäre auch eine TTFields-induzierte erhöhte Migration/Invasion der Glioblastomzellen denkbar).

Die TTFields Therapie wird abgesehen von Hautirritationen an den Elektrodenarray-Klebestellen gut vertragen ^{13, 27, 28} und zeichnet sich im Vergleich zu anderen innovativen adjuvanten Therapiebestrebungen durch ein vertretbares Kosten/Effektivität-Verhältnis aus ^{29, 30}. Zudem zeigte sich in einer großen (1106 Patienten) retrospektiven „real World Study“ eine positive Korrelation zwischen Lebensqualität und TTFields-Nutzungsdauer ³¹ bei Glioblastompatienten.

1.3 Postulierte Elemente der molekularen Perzeption von TTFields

Als zellulärer Effekt wird eine TTFields-evozierte Inhibition der Mitose und Zytokinese postuliert ³²⁻³⁵. Dabei scheinen TTFields das Assemblieren von Proteinen wie Tubulin-Dimeren ³⁴ und Septinen ³⁵, welche sich durch einen hohen intramolekularen Dipolcharakter auszeichnen, zu Makromolekülen zu hemmen, und so den Aufbau des Spindelapparates zu stören. Als Folge kommt es während der Mitose durch TTFields zu einem gestörten Metaphasen-Exit und anschließend zu einer ungleichmäßigen Segregation der Chromatiden auf die Glioblastom-Tochterzellen.

Als weiterer Effekt wird angenommen, dass sich die TTFields-Feldlinien während der Zytokinese in der Teilungsfurche bündeln. Diese lokale Feldverstärkung soll über einen sogenannten Dielektrophorese-Effekt Zellorganellen in der Teilungsfurche immobilisieren, und so deren gleichmäßige Verteilung auf die Tochterzellen beeinträchtigen. Entsprechend dieser Hypothesen entfaltet die TTFields-Therapie den größten Effekt, wenn die Feldlinien parallel zu der Teilungsrichtung der Glioblastomzellen liegen ³⁶.

Zusätzlich zum Glioblastom ergaben sich bereits früh aus *in vitro*-Daten^{34, 35, 37-42}, präklinischen *in vivo*-Modellen^{33, 37, 40, 41, 43-45} und klinischen Pilotstudien^{37, 46-48} Hinweise auf eine tumorizide Wirkung bei weiteren Tumorentitäten wie verschiedenen Karzinomen. Die dabei beobachtete Tumorspezifität der TTFields resultiert möglicherweise neben der erhöhten Mitoseaktivität der Tumorzellen aus der veränderten Geometrie (Größe) der Tumorzellen im Vergleich zum Normalgewebe. Tatsächlich wurden im direkten Vergleich TTFields-„Best“-Frequenzen für verschiedene Tumorentitäten festgestellt, die auf die unterschiedlichen Zellgeometrien der einzelnen Entitäten zurückgeführt wurden. Im Falle des Glioblastoms liegt diese TTFields-„Best“-Frequenz bei 200 kHz^{32, 37, 49}.

1.4 Weitere therapeutische TTFields-Wirkungen

Neben der direkten tumoriziden TTFields-Wirkung deuten *in vitro*-Experimente und Tierversuche auf eine TTFields-vermittelte Sensibilisierung gegenüber Chemotherapie^{38, 50-57}, zielgerichteter Therapie⁵⁸⁻⁶⁰, sowie Photonen-^{42, 61} und Protonen-Strahlentherapie⁶² hin. Ferner wurden für TTFields eine Hemmung von Fernmetastasierung⁴³, ein Aufweichen der Blut-Hirnschranke^{63, 64} und eine Stärkung der Anti-Glioblastom-Immunantwort berichtet.

Letzteres geht aus klinischen Befunden hervor, die auf ein Abschwächen der TTFields-Wirkung durch das immunsupprimierende Dexamethason hindeuten. Letzteres wird bei Glioblastompatienten zur Behandlung von Hirnödemen verwendet⁶⁵. Präklinische und *ex vivo*-Modelle bestätigten tatsächlich, dass T-Zellen ihre Aktivität (nicht aber die Proliferation) unter TTFields beibehalten^{66, 67}.

Darüberhinaus stimulieren TTFields beschriebenermaßen immunogenen Zelltod⁶⁸, die Produktion von immunstimulierenden proinflammatorischen Zytokinen im Tumor¹⁹ sowie peri- bzw. intratumorale Immunzellinfiltration⁴³. „Profiling“ der Glioblastom-Genexpression deutet zudem auf eine TTFields-induzierte verbesserte inflammatorische Immun-Mikroumgebung hin⁶⁹.

1.5 Postulierte biologische TTFields-Effekte und Signalling

Beobachtete TTFields-assoziierte Veränderungen im Transkriptom deuten auf herunterregulierte(n) Zellzyklus, Proliferation, mitochondriale Funktion, Protein- und RNA-Metabolismus, DNA-Replikation und DNA-Reparatur (Homologe Rekombination, Nukleotid-Exzisions-Reparatur, Basen-Exzisions-Reparatur, Mismatch-Reparatur) und auf verstärkte zelluläre Stressantwort (Seneszenz, Autophagy, Apoptosis, Endoplasmatischer Retikulum-Stress)⁷⁰⁻⁷² hin. Auf zellbiologischer Ebene wurde eine hiermit übereinstimmende TTFields-induzierte Störung der DNA-Reparatur⁶¹, ein erhöhter DNA-Replikationsstress⁷³, sowie die Induktion von Glioblastomzell-Seneszenz⁷⁴ und Autophagie^{53, 54, 75} beschrieben. Darüber hinausgehend wurden eine Inhibition der als Warburg-Effekt⁷⁶ bekannten Hochregulation von Glykolyse und Milchsäuregärung⁷⁷, eine Störung der Zellmotilität^{51, 78, 79}, eine Erhöhung der Membranpermeabilität^{80, 81}, eine Hemmung der „Connectivity“ des Glioblastom-Neuronen-Netzwerkes⁸² und die Hochregulation der „Self-Renewal“-Kapazität von GSCs beobachtet.

Dabei wurden Interaktionen der TTFields mit multiplen Signalwegen postuliert wie z.B. mit den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR)-⁸¹, Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (AKT)-⁸³, Aurora Kinase A-⁸⁴--B⁸⁵, Prostaglandin E2-Rezeptor-3 (EP3)- und Transkriptionsfaktor Zinc Finger 488-⁸⁶, Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Stat3)-, Myeloid Cell Leukemia 1 (Mcl-1)- und Survivin-⁶⁰, Guanine Nucleotide Exchange Factor-H1 (GEF-H1)-, Ras Homolog Family

Member A (RhoA)-, und Rho-associated Coiled-Coil Kinase (ROCK)-⁷⁸, Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-⁵⁹ sowie Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)- und Ataxia Telangiectasia and Rad3-related (ATR)-⁸⁷ Signalwegen. Im Falle der letzten beiden Signalwegen verursachte TTFields im vollkommenen Gegensatz zu der erwähnten TTFields-assoziierten Hemmung der DNA-Reparatur (z.B. ^{61, 72}) eine robuste Aktivierung der PARP- und ATR- vermittelten DNA-Reparatur⁸⁷.

Diese TTFields-modulierten Signalwege vermitteln nicht nur vermutlich die tumorizide TTFields-Wirkung, sondern können auch im Rahmen einer TTFields-Stressantwort zur TTFields-Resistenz führen. So kann die zielgerichtete Inhibition von FGFR⁸⁸, mTOR⁵⁹, EP3⁸⁶, PARP oder ATR⁸⁷ Glioblastom(stamm)zellen gegenüber TTFields sensibilisieren. Eine TTFields-Sensibilisierung durch CUSP9v3, einem Cocktail aus neun „repurposed“ Medikamenten⁸⁹ oder dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib⁶⁰ wurde ebenfalls beschrieben. Klinische retrospektive Daten deuten darauf hin, dass Treibermutationen in Neurofibromatose Typ-1 (NF1), p110 α -Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PIK3CA) und Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) den Tumor gegenüber TTFields sensibilisieren und so Kandidaten für eine zukünftigen Stratifizierung der Glioblastompatienten hinsichtlich einer TTFields-Therapie⁹⁰ sein könnten.

Somit scheinen TTFields in einer sehr komplexen Weise verschiedenste Signalwege in den Glioblastomzellen zu modulieren. Schwer nachzuvollziehen ist dabei, dass all diese mannigfaltigen biologische TTFields-Effekte einzig durch Störung des Spindelapparaaufbaus während der Mitose und durch den Dielektrophorese-Effekt während der Zytokinese ausgelöst werden sollen. Auch schwer vorstellbar, dass eine Störung von für eine Zelle so fundamentaler Prozesse wie das Assemblieren von Mikrotubuli nur Tumorzellen aber keine Normalgewebe schädigt. Interessanterweise berechneten theoretische Modelle, dass die Energiedeposition der elektrischen Wechsel-Felder in der Zelle deutlich niedriger ist als die Brown'sche Bewegungsenergie der Moleküle und daher sehr wahrscheinlich nicht ausreicht, um das Assemblieren von Tubulin-Dimeren oder Septinen zu stören⁹¹⁻⁹³. Auch der Dielektrophorese-Effekt mit einer berechneten TTFields-induzierten Abdriften von Partikeln in Richtung Teilungsfurche in einem Geschwindigkeitsbereich von 0.003 $\mu\text{m/s}$ scheint zu gering zu sein, um nennenswerte biologische Effekte während der Zytokinese auszuüben⁹¹. Damit werden zumindest in dieser Publikation⁹¹ die grundlegenden Annahmen zur biologischen Wirkung der TTFields in Frage gestellt.

Erschwerend für unser Wissen über die TTFields-Effekte kommt hinzu, dass die Mehrzahl der hier vorgestellten *in vitro*-Daten mit dem inovitro™-System der Firma Novocure (<https://www.tumortreatingfieldstherapy.com/research>), welches die Firma Novocure weltweit kooperierenden Arbeitsgruppen unentgeltlich zur Verfügung stellt, oder dem gleichermaßen funktionierenden kommerziellen TEFT-CL-301A Applikationssystem der Firma Antai Kangcheng Biotechnology Co., Ltd. gewonnen wurden. Diese Systeme weisen aber erhebliche Mängel bezüglich der Interpretierbarkeit der Daten auf (siehe nächsten Abschnitt).

1.6 Das inovitro™ TTFields-Applikationssystem kann nicht zwischen hyperosmotischen Stress- und TTFields-induzierten Effekten unterscheiden (Kapitel aus⁹⁴, verändert).

Für das kapazitive Einstrahlen der TTFields benutzt das inovitro™-System kapazitiv-hochpermissive Keramikelektroden, die in Keramik-Petrischalen integriert sind. Die Zellen werden auf Deckgläschen gezogen und dann in die Keramikschale gelegt, wo parallel zum Zell-Monolayer die elektrischen Felder abwechselnd aus zwei zueinander senkrechten Richtungen eingekoppelt werden. Damit wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, die Feldlinien parallel zu der Teilungsrichtung einzustrahlen (siehe 1.3).

Die Anwendung von TTFields durch das inovitro™-System erhitzt dabei Zellen und Zellkulturmedium. Die Firma Novocure führt dies auf einen sogenannten „Joule-Effekt“^{95, 96} zurück, bei dem die Energiedeposition der elektrischen Wechselfelder direkt das Medium und die Zellen aufheizen. Alternative TTFields-Applikationssysteme sehen dagegen diesen Joule-Effekt nicht^{45, 91, 97, 98}. Eine denkbare Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass beim inovitro™-System anstelle einer absorbierten Feld-Energie die Verwendung hochpermittiver Keramikelektroden mit der daraus resultierenden hohen Kondensator-Kapazität und der benötigten hohen Ladeströme, eine mutmaßliche Elektronik im Keramikeinsatzboden, die Temperaturmessungen in und außerhalb der Schale und die Feldeinstrahlrichtung steuert, und die vielen elektrischen Kontakte zwischen Keramik-Schaleneinsatz und Schalenhalterung über dabei unvermeidlichen Ohm'sche Widerstände zu einer Erwärmung des Mediums auch bei niedrigen elektrischen Feldstärken führen.

Um eine Überhitzung der Zellen zu vermeiden, werden beim inovitro™-System die TTFields-Feldstärken indirekt über die ambiente Temperatur des Zellkultur-Brutschanks reguliert. Absenken der ambienten Brutschanktemperatur unter 37 °C erhöht die TTFields-Feldstärke bis an zwei Temperatursensoren im Innen- und Außenrand der Keramikschale die Temperatur von Schale und Medium 37 °C erreichen. Diese indirekte Steuerung bedingt, dass der Wasserdampf-Sättigungsdruck in der deutlich unter 37 °C warmen Atmosphäre des Brutschanks niedriger ist als die auf 37 °C eingeregelter Luft-Atmosphäre über dem Medium in der (im besten Fall mit Parafilm versiegelten, im ungünstigsten Fall lose mit einem Plastikdeckel abgedeckten) Keramikschale. Dadurch verdunstet kontinuierlich Wasser aus dem Zellkulturmedium. Der Verlust des Wasservolumens aus dem Medium wird durch wiederholte Zugabe von frischem Medium kompensiert, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die Volumenergänzung des Wasserverlustes durch Medium-Zugabe führt jedoch zu einer starken Erhöhung der Medium-Osmolarität⁹⁹

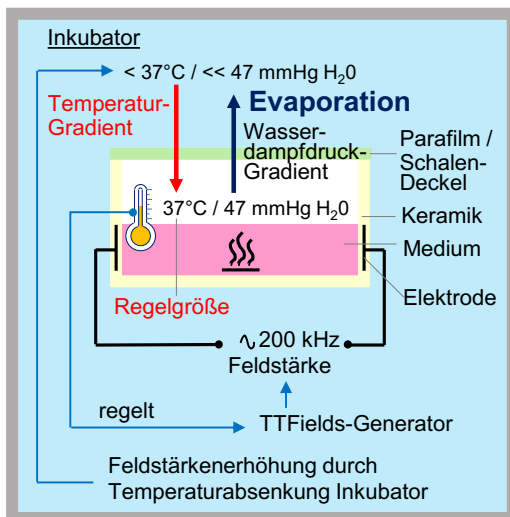


Abb. 1. Das Novocure inovitro™-System kann nicht zwischen osmotischen und TTFields-Effekten unterscheiden. Die TTFields-Feldstärke muss indirekt durch Absenken der Inkubatortemperatur erhöht werden, da das inovitro™ System die Kulturschale mit zunehmender Feldstärke zunehmend erhitzt. Nach Einstellen der Brutschranktemperatur erhöht das System die Feldstärke solange bis die Mediumtemperatur konstant auf 37 °C eingeregelt wird. Aufgrund der unterschiedlichen Temperatur resultierenden unterschiedlichen Wasserdampf-Sättigungsdrücken in Brutschrank und Luftkompartiment der Zellkulturschale verdunstet kontinuierlich Wasser aus dem Zellkulturmedium. Durch wiederholte Zugabe von Zellkulturmedium wird dieser Volumenverlust ausgeglichen. Dadurch erhöht sich die Osmolarität im Medium erheblich (aus⁹⁴, verändert).

Folglich kann das inovitro™-System nicht zwischen TTFields- und hyperosmotischem Stress-vermittelten^{100, 101} biologischen Effekten unterscheiden, da die Kontroll-Proben (0 V_{pp}/cm Feldstärke) in 37 °C warmen Inkubatoren mit isoosmotischem Zellkulturmedium durchgeführt werden. Die mit dem inovitro™-System erhobenen Daten sind deswegen nur sehr begrenzt interpretierbar (siehe auch¹⁰²). Leider wurde und wird die Mehrzahl der TTFields *in vitro*-Daten mit dem inovitro™-System

erhoben. In den Publikationen werden die systeminhärenten Schwächen des *in vitro*™ Systems jedoch nicht thematisiert.

1.7 Alternativ diskutierte molekulare Mechanismen der TTFIELDS-Effekte

Dies bedeutet, dass viele in den Kapiteln 1.3, 1.4 und 1.5 vorgestellten TTFIELDS-Befunde möglicherweise überinterpretiert wurden und, daraus resultierend, die biologischen TTFIELDS-Wirkungen doch unverständlicher sind, als es die Fülle der Publikationen suggerieren möchten. Alternativ zu der Mitose-/Zytokinese-Hemmung wurden seit langem ein direktes „Gaten“ von Ionenkanälen durch externe elektrische Wechselfelder als molekularer Mechanismus diskutiert. Insbesondere sehr schnelle spannungsaktivierte Ionenkanäle, deren Spannungssensoren über elektrostatische Wechselwirkungen den Spannungsabfall über die Membran abgreifen und spannungsinduzierte Konformationsänderungen des Kanals mit Kinetiken im sub-100 μ s-Bereich auslösen (Übersichtsartikel in ⁹⁴), wären mögliche molekulare Zielstrukturen für 200 kHz Wechselfelder (Abb. 2). Tatsächlich können in Säugetierzellen elektrische Wechselfelder intrazelluläre Ca^{2+} -Signale hervorrufen ¹⁰³⁻¹⁰⁹, an denen unter anderem T- ¹¹⁰ und L-Typ Ca_v -Kanäle beteiligt sind (Übersichtsartikel in ¹¹¹). Übereinstimmend mit diesen Befunden, konnte in einer älteren Arbeit meiner Tübinger Arbeitsgruppe eine TTFIELDS-induzierte Aktivierung von $\text{Ca}_v1.2$ (CACNA1C) L-Typ Ca^{2+} -Kanälen in zwei humanen Glioblastomzelllinien direkt nachgewiesen werden ⁹⁷. Ein möglicher Mechanismus der biologischen Elektrosensorik lässt sich von der Elektroortung bei Fischen und Amphibien ableiten, bei der spannungsaktivierte Ca^{2+} - (Ca_v -) Kanäle eine zentrale Rolle spielen (siehe nächstes Kapitel).

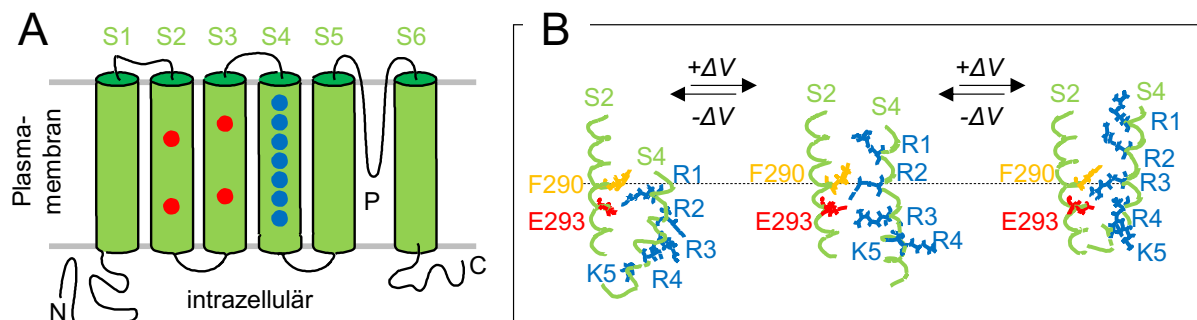


Abb. 2. Molekularer Voltmeter. A. Membrantopologie der alpha-Untereinheit eines Shaker-spannungsgesteuerten (K_v) K^+ -Kanals. Dargestellt sind porenbildende Domänen (S5, S6, P-Schleife), die spannungsverschiebbaren basischen Aminosäurereste der S4-Helix und die sauren Aminosäurereste der S2- und S3-Helices, die im Spannungssensor als stabilisierende Gegenionen dienen. B. Hypothetische intramolekulare Relativbewegung des Spannungssensors während des „Gatings“. Das aromatische Phenylalanin (F290) und die beiden negativen Reste E293 und D316 (nicht dargestellt) der S2-Helix bilden ein „Gating Charge Transfer Center (GCTC)“. Entsprechend dieser Hypothese bindet das GCTC kurzzeitig und nacheinander die positiv geladenen Reste (blau) des S4-Spannungssensors, wenn diese – ausgelöst durch Depolarisieren der Membranspannung – den Kanalporenbereich während des Gatings durchqueren. Das Schema zeigt den geschlossenen Zustand des inaktiven Kanals bei hoher negativer Membranspannung (links) und sukzessive Aufwärtsbewegung des Spannungssensors (Mitte und rechts) während Depolarisation des Membranpotenzials. Transmembranäre Alpha-Helices in (A, B) sind grün gezeichnet, positiv geladene basische, negativ geladene saure und aromatische (Phenylalanin F290) Aminosäurereste in blau, rot bzw. orange (aus ⁹⁴ verändert, dort neu gezeichnet und modifiziert aus ¹¹²).

1.8 Biologische Voltmeter (Kapitel aus ⁹⁴, verändert)

Passive oder aktive Elektroortung wird von verschiedenen Knorpel- und Knochenfisch-Arten praktiziert. Spezialisierte Organe wie die Lorenzinische Ampullen bei Knorpelfischen perzeptieren bei der passiven Elektroortung schwache elektrische Felder. Letztere resultieren aus der Aktivität von Neuronen, Muskeln oder Kiemen-Ionenpumpen anderer Tiere in der näheren Umgebung (Abb. 3). Im Gegensatz hierzu werden bei der aktiven Elektroortung, wie sie z.B. der Elefantenfisch (Mormyridae) betreibt, schwache elektrische Wechselfelder aktiv durch ein Elektroorgan im Fischschwanz erzeugt. Spezielle Knollenorgane in der Haut des Fisches erkennen Verzerrungen dieser Wechselfelder durch z.B. näherkommende Beutetiere (Abb. 3).

Bei den Lorenzinischen Ampullen kleiden elektrosensorische Rezeptor- und zusätzliche Stützzellen einen Hohlraum unter der Haut aus. Ein Ausführungsgang leitet elektrische Feldstärkenänderungen von der Hautoberfläche zur apikalen Membran der elektrosensorischen Rezeptorzellen, die in den Hohlraum hineinragt. Dabei verhindern elektrisch hochohmige luminale Zelloberflächen und Zell-Zell-Verbindungen der Ausführungsgang- und Hohlraum-Wandung eine Feldabschwächung. Lorenzinischen Ampullen können beschriebenermaßen Feldstärken im Mikrovolt-Bereich erkennen, also Feldstärken, die deutlich geringer sind als die der therapeutischen TTFields. Dabei werden Frequenzen zwischen 0,1 und 50 Hz, also langsame Modulationen der elektrischen Feldstärke, von Lorenzinische Ampullen detektiert. Fisch-Orthologe von spannungsaktivierten L-type $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} - und $\text{K}_v1.x$ K^+ -Kanälen sowie Ca^{2+} -aktivierte BK K^+ -Kanälen fungieren dabei vermutlich als elektro-biologische Transducer. $\text{Ca}_v1.3$ -Orthologe von Rochen-Rezeptorzellen zeigen im Vergleich zu dem Säugetier- $\text{Ca}_v1.3$ eine niedrigere Aktivierungs-Schwelle und eine steilere Aktivitäts/Spannungsbeziehung. Dadurch erfolgt die Aktivierung schon bei negativeren Membranspannungen und der Kanal erreicht unmittelbar nach Überschreiten der Aktivierungsschwelle seine maximale Aktivität. Zusätzlich bewirkt eine wiederum auf den Säugetier $\text{Ca}_v1.3$ bezogene langsamere Inaktivierung einen hohen $\text{Ca}_v1.3$ -vermittelter Ca^{2+} -Einstrom über die apikale Membran in die Rezeptorzelle. Hierdurch verursacht wird eine Verstärkung der Depolarisation des apikalen Membranpotenzials gepaart mit Ca^{2+} Signalen im apikalen Zellpol (Übersichtsartikel in ^{94, 113}). Abbildung 4 zeigt einen hypothetischen weiteren Verlauf der elektrischen elektro-biologischen Signaltransduktion in der Rezeptorzelle.

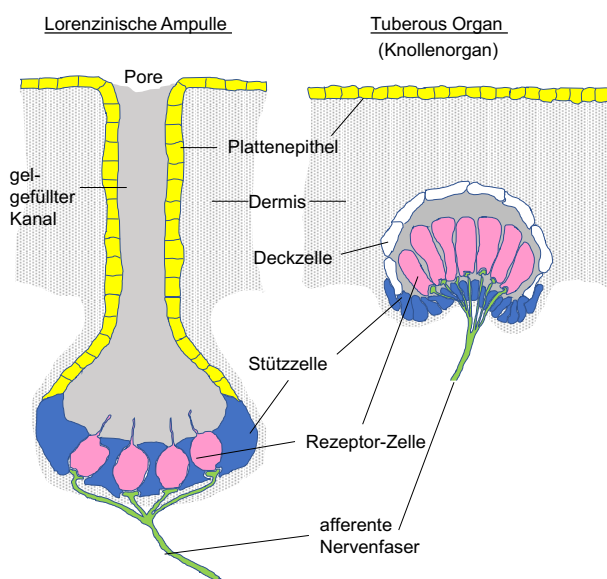


Abb. 3. Perzeption elektrischer Felder bei Fischen die konduktiv (Lorenzinische Ampulle) oder kapazitiv (Knollenorgan) zu den elektrosensorischen Rezeptorzellen (rosa) gelangen (aus ⁹⁴ verändert, dort neu gezeichnet und modifiziert aus ^{114, 115}).

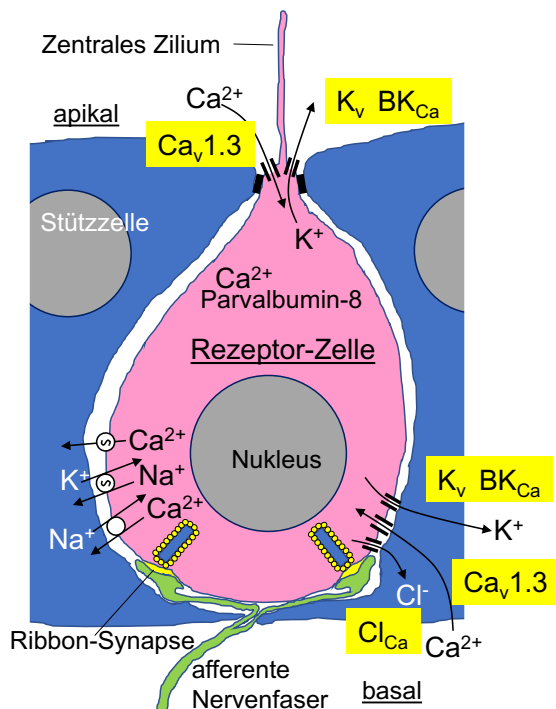


Abb. 4. Rezeptorzelle (rosa) im Epithel der Lorenzinischen Rochenampulle (hypothetisches Modell). Der flüssigkeitsgefüllte Ampullen-Hohlraum (weiß) wird über Tight Junctions zwischen Rezeptorzellen (rosa) und umgebenden Stützzellen (blau) elektrisch hochohmig vom basolateralen Zell-Pol und Interstitium isoliert. Spannungsgesteuerte L-Typ $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} -Kanäle in der apikalen Membran der Rezeptorzelle werden durch schwache elektrische Feld-Änderungen aktiviert. Resultierender Ca^{2+} -Einstrom und Depolarisation des apikalen Membranpotenzials führt nachfolgend zur Aktivierung von apikalen Ca^{2+} -aktivierten BK_{Ca} - bzw. spannungsgesteuerten K_v K^+ -Kanälen. Diese repolarisieren das Membranpotenzial und deaktivieren die apikalen $\text{Ca}_v1.3$ und K_v Kanäle. Das Ca^{2+} -bindende Protein Parvalbumin-8 puffert apikal eingedrungenes Ca^{2+} ab. Folglich deaktivieren apikale Ca^{2+} -aktivierten

BK_{Ca} K^+ -Kanäle. Die Deaktivierung von K_v - und BK_{Ca} K^+ -Kanälen führt wieder zu einer leichten Depolarisation des apikalen Membranpotenzial in die Nähe des Aktivierungs-Schwellenpotenzials der apikalen $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle, so dass diese sofort wieder durch weitere schwache elektrische Feldänderungen re-aktiviert werden können. Fortpflanzen der transienten apikalen Depolarisation zum basalen Zellpol aktiviert vermutlich basolaterale $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} -Kanäle. Wahrscheinlich verstärkt der resultierende Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle durch Aktivierung Ca^{2+} -regulierter Cl^- -Kanäle Membrandepolarisation, weitere $\text{Ca}_v1.3$ -Aktivität und damit verbunden weiteren Ca^{2+} -Einstrom. Letzterer triggert die Transmitterfreisetzung aus den Ribbonsynapsen. Vermutlich programmiert die reziproke Aktivität von basolateralen Ca^{2+} -, K^+ - und Cl^- -Kanälen ähnlich der für die apikale Membran geschilderten Vorgänge die Oszillation des Membranpotenzials und der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und die synchrone Transmitterfreisetzung. Letztendlich schleusen Ca-ATPase und Na/Ca-Antiporter Ca^{2+} wieder über die basolaterale Membran aus der Sensorzelle (aus ⁹⁴ verändert).

Knollenorgane sind im Gegensatz zu den Lorenzinischen Ampullen elektrisch von der Umgebung isoliert. Nur externe elektrische Wechsel-Felder können daher kapazitiv zu den Rezeptorzellen gelangen: Der molekulare Mechanismus der elektro-biologischen Signaltransduktion der Rezeptorzellen, die auf elektrische Wechselfelder im Frequenzbereich bis zu 25 kHz reagieren, ist noch weitgehend unverstanden (Übersichtsartikel in ^{94, 113, 116}), wobei der Nachweis von spannungsaktivierten K_v1 -ähnlichen K^+ -Kanälen in den Rezeptorzellen der Knollenorgane ¹¹⁷ eine zu den Lorenzinischen Ampullen vergleichbare elektro-biologische Transduktion vermuten lassen könnte.

Die Welt der Fische zeigt, dass spannungsaktivierte Ionenkanäle als elektro-biologische Transducer-Moleküle von externen elektrischen Wechselfeldern mit niedriger Feldstärke fungieren und somit durchaus auch bei der TTFields-Therapie zentrale Rollen spielen könnten. Elektrosensitivität müsste dann aus einer aberanten Co-Expression bestimmter spannungs- und Ca^{2+} -aktivierter Ionenkanal-Typen und „elektrosensitiven“ Kanal-Isoformen der Tumorzellen resultieren. Tatsächlich exprimieren Glioblastomzellen neben mehreren spannungsaktivierten Ca_v Ca^{2+} -Kanaltypen ⁹⁷ gBK, eine tumorassoziierte Isoform des Ca^{2+} -aktivierten BK K^+ Kanals mit veränderten biophysikalischen Eigenschaften ¹¹⁸.

Ungeachtet der fehlenden gesicherten Kenntnisse über molekulare Prozesse der tumoriziden Effekte von TTFields, erwächst aus den klinischen Daten (siehe 1.2) doch eine genügend große Evidenz für den therapeutischen Nutzen der TTFields-Elektrotherapie. Im Zuge der Therapieoptimierung wird derzeit beim Glioblastom versucht, zusätzlich zur adjuvanten TTFields-Applikation während der Temozolomid-Erhaltungstherapie, die Elektrotherapie auch schon konkomitant zur Radio-Temozolomid-Therapie anzuwenden.

1.9 TTFields-Behandlung konkomitant zur Radio-Temozolomid-Therapie

Die Rationale hierfür kommt aus den diskutierbaren (siehe 1.6) *in vitro*-Daten zu TTFields-induzierter Hemmung der DNA-Reparatur und Radiosensibilisierung von Tumorzellen (z.B. ⁶¹). Theoretische Studien zur Dosisplanung ¹¹⁹ und klinische Pilotstudien zur Sicherheit und Machbarkeit ¹²⁰⁻¹²³ (clinicaltrials.gov Identifier: NCT03477110 und NCT03477110) deuten darauf hin, dass eine konkomitante TTFields-Radio-Temozolomid-Therapie durchführbar und sicher ist und (ausser den schon bekannten Hautirritationen an den Klebestellen der Elektrodenarrays auf der rasierten Kopfhaut) keine zusätzlichen Nebenwirkungen hervorruft. Zurzeit läuft die von der Firma Novocure finanzierte, seit 12/2020 rekrutierende, randomisierte, multizentrische TRIDENT EF-32-Studie (clinicaltrials.gov Identifier: NCT04471844), die geplant Anfang 2026 abgeschlossen sein sollte und bisher (Stand 10/2025) 981 Patienten einschließen konnte. Die TRIDENT EF-32-Studie vergleicht TTFields konkomitant zur Radio-Temozolomid-Therapie und adjuvanter TTFields-Temozolomid-Erhaltungstherapie mit alleiniger Radio-Temozolomid-Therapie plus adjuvanter TTFields-Temozolomid-Erhaltungstherapie. Eine kleinere retrospektive chinesische Studie am Huashan Hospital in Shanghai mit gleicher Fragestellung ergab bei einer kleineren Patienten-Kohorte (41 und 31 Patienten) keinen Vorteil einer TTFields Behandlung konkomitant zur Radio-Temozolomid-Therapie ¹²⁴. Unabhängig von einem positiven oder negativen Ergebnis der großen TRIDENT EF-32 Interventionsstudie wäre es klinisch relevant, auf robuste präklinische Daten über mögliche Synergismen von Strahlentherapie und TTFields-Behandlung zurückgreifen zu können und mögliche zugrundeliegende molekulare Mechanismen zu verstehen. Dieses Verständnis könnte zukünftig zur Therapie-Stratifizierung geeigneter Glioblastompatienten-Untergruppen beitragen oder Strategien zur Überwindung von möglichen TTFields-Resistenzmechanismen aufzeigen. Die vorliegende Arbeit verfolgt daher die folgenden Ziele:

1.10 Projektziele

- 1.10.1 Erstellen einer Kohorte patientenstämmiger GSC-anreichernden Sphäroid-Kulturen (pGSCs) aus Glioblastom-Resektaten und Charakterisierung der Kulturen bezüglich ihrer proneural/mesenchymalen Stammzell-Phänotypen und Radiosensibilitäten
- 1.10.2 Etablieren und Evaluieren eines isotherm arbeitenden Systems zur Applikation von klinisch relevanten (2-6 V_{pp}/cm) TTFields-Feldstärken an pGSC-Kulturen.
- 1.10.3 Analyse der Auswirkung einer TTFields-Behandlung auf das klonogene Überleben und die Radioresistenz von pGSC-Zellen.
- 1.10.4 Analyse der Auswirkung einer TTFields-Behandlung auf DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle von unbestrahlten und bestrahlten pGSC-Zellen
- 1.10.5 Identifikation von TTFields-induzierten Änderungen der Ionenkanalaktivitäten in der Plasmamembran von pGSC-Zellen

- 1.10.6 Definition der funktionellen Signifikanz von in 1.10.5 identifizierten TTFields-induzierten Ionenkanal-Aktivitäten für die TTFields-Effekte auf klonogenes Überleben und Radioresistenz von pGSC-Zellen.
- 1.10.7 Transkriptomanalyse weiterer molekularer TTFields-Targets in unbestrahlten und bestrahlten pGSCs
- 1.10.8 Abschätzen möglicher TTFields-Effekte auf die Immunzellfunktion am Beispiel der *in vitro*-Lyse von pGSC-Zellen durch CAR (Chimärer Antigen-Rezeptor)-NK (natürliche Killer)-Zellen

2 Material und Methoden

2.1 Anlegen und Kultivierung von patientenstämmige stammzellangereicherten Glioblastom Sphäroid (pGSCs)-Kulturen und Züchten der CD276-gerichtete CAR NK-92 Zelllinie

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente an Patienten-Material wurden von der Ethikkommission der Universität Tübingen in den Ethikvoten 510/2021BO2 vom 27.07.2021 genehmigt. Zur Aufzucht von stammzellanreichernden Glioblastomkulturen wurden die 0.1 bis 0.5 cm³ großen Glioblastomresektate in mit 5% CO₂-equilibriertem Neurocult-Komplettmedium (siehe unten) gefüllten 50 ml Falcon-Röhrchen aus dem OP-Saal abgeholt. Die Tumorproben wurden 3x mit Ca²⁺- und Mg²⁺-freiem PBS (Phosphate-buffered solution) gewaschen und mit einem Skalpell zerkleinert und jeweils nach Absedimentieren der jetzt etwa 1-5 mm³ großen Tumorstücke und Verwerfen des Übestands für 15 min mit Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; 0.05%, Gibco, Thermo Fischer Scientific) bei 37°C verdaut und der enzymatische Aufschluss durch Zugabe des gleichen Volumens von Soyabohnen-Trypsin-Inhibitor (10 µg/ml in PBS, Carl Roth, GmbH, Karlsruhe) abgestoppt. Nach Zentrifugieren (200x g für 5 min bei Raumtemperatur) wurde das Pellet zunächst in 1 ml Neurocult Komplett (NSC)-Medium (Zusammensetzung 500 ml NSC Medium: NS-A Basal Medium 450 ml, Neural Stem Cell Proliferation Supplement 50 ml, Epidermal Growth Factor (EGF) 10 mg, Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) 5mg, Heparin (0,2%) 500 µl, alles Stemcell, Vancouver, Kanada) resuspendiert, mit Medium auf 15 ml aufgefüllt, durch einen 40 µm Zellsieb (Falcon, Thermo Fischer Scientific) abgeseiht und das Filtrat zentrifugiert (200x g für 5 min bei Raumtemperatur). Das Zellpellet wurde dann wiederum in 12 ml NSC-Medium mit 120 µl/12 ml Penicillin und Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) resuspendiert, auf zwei 25 cm² Zellkulturflaschen verteilt und bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre als Zellkulturpassage 0 kultiviert.

Für diese Arbeit wurden n = 26 individuelle Glioblastom-Resektate in Kultur genommen von denen n = 19 Kulturen zu mehr oder weniger am Zellkulturflaschenboden adhärierende Sphäroide auswuchsen. Zum Splitten wurden die Sphäroide nach Waschen mit PBS durch Accutase (A7089, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) -Verdau (5 min bei 37°C) und mechanisch sofern notwendig vom Boden abgelöst und die darin erhaltenen Zellen vereinzelt, die Zellen abzentrifugiert, in Medium aufgenommen und in einer Neubauer (Webcraft GmbH, Gottmadingen, Deutschland) Kammer gezählt. Von den Zellkulturen Passagen 2 mit 4 wurden jeweils 10⁶ Zellen/1 ml in NSC-Medium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich) durch langsames Absenken der Temperatur (Mr. Frosty, Gefrierbehälter, Thermo Fisher Scientific) bis -80°C und anschließend bei -196°C in N₂-Atmosphäre kryoasserviert.

Die CD276-gerichtete CAR NK-92 Zelllinie wurde in der Kinderklinik der Universität Tübingen generiert¹²⁵ und dankenswerterweise von Frau Dr. Sabine Schleicher unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die CD276 CAR NK-92 Zellen wurden mit 20 % Fetal Bovine Serum“ (FBS) und 100 IU/ml Interleukin-2 (IL-2, #202-IL-050/CF, R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland) supplementiertem MEM-A Medium (#32561-029, Thermo Fisher Scientific) gezüchtet. Zum Splitten und für die Lyse-Experimente wurden die NK-92-Zellen für 5-10 min enzymatisch mit Accutase vereinzelt und anschließend die Zellzahlen mit der Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.2 Molekulare Charakterisierung der pGSCs mittels Reverse-Transkription Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Diese Arbeit charakterisierte mittels RT-PCR die ehemals in unserer Arbeitsgruppe etablierte proneural-mesenchymal mRNA Signatur⁸ von $n = 10$ pGSC-Kulturen. Hierzu wurde für jede individuelle Kultur in jeweils 3 Passagen 10^6 aus den Sphäroiden herausgelöst und 1x mit PBS gewaschen und pelletierte pGSC-Zellen in flüssigem N_2 schockgefroren und bei $-80^\circ C$ bis zur RNA-Präparation aufbewahrt. Die RNA des Zellpellets wurde dann mit dem NucleoSpin RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) gemäß des Hersteller Protokolls isoliert, die RNA in 20 μl RNase-freiem Wasser (highQu GmbH, Kraichtal, Deutschland) aufgenommen und die RNA-Menge und die Reinheit der RNA-Präparation im Nanodrop Spektralphotometer (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) kontrolliert und deren Mengen bestimmt. RNA mit Absorption (A)-Verhältnissen von $A_{260}/A_{280} \text{ nm} = 1.8 - 2.0$ und $A_{260}/A_{230} \text{ nm} = 1.8 - 2.2$ wurde als ausreichend rein erachtet und weiterverarbeitet.

Zur Bestimmung der proneural-mesenchymal mRNA Signatur wurden die mRNA-Abundanzen von *KCNN4*, *KCNMA1*, *ALDH1A3*, *CXCR4*, *Sox2*, *Notch1*, *Oct4*, *MSI1*, *Nestin*, *FABP7* und der Housekeeper Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), β -Aktin (ACTB) sowie Pyruvat Dehydrogenase- β (PDHB) unter Verwendung der QuantiTect Primer Assays (QIAGEN, Venlo, Netherlands) QT00003780, QT00024157, QT00077588, QT00223188, QT00237601, QT01005109, QT00210840, QT00025389, QT00235781, QT00007322, QT01192646, QT00095431 bzw. QT00031227 und dem 1Step RT qPCR Green ROX L Kit (highQu, Kraichtal, Germany) in einem LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) gemäß der Hersteller-Protokolle bestimmt. Die „Threshold cycle“ (C_t)-Werte der einzelnen Transkripte wurden auf den geometrischen Mittelwert der C_t -Werte aller drei Housekeeper normalisiert und so die relative mRNA Abundanz ($mRNA_{rel}$) mit folgender Formel berechnet: $mRNA_{rel} = ((C_{t \text{ GAPDH}} \times C_{t \text{ ACTB}} \times C_{t \text{ PDHB}})^{1/3} - C_{t \text{ nRNA}})^2$. Für jedes Transkript einer pGSC-Kultur wurden die $\log_{10}$ -Werte (L) der Housekeeper-normalisierten mRNA-Abundanz (A, $L = \log_{10} A$) weiterhin auf die entsprechenden minimalen (L_{min}) und maximalen (L_{max}) Werte (N) aller pGSC-Kulturen normalisiert unter Verwendung der folgenden Gleichung: $N = (L - L_{min}) / (L_{max} - L_{min}) + 1$. Die molekulare Signatur wurde dann durch den geometrischen Mittelwert von N_{KCNN4} , N_{KCNMA1} , $N_{ALDH1A3}$, N_{CXCR4} und N_{Oct4} geteilt durch den geometrischen Mittelwert von N_{Nestin} , N_{Sox2} , N_{MSI1} , N_{FABP7} und N_{Notch1} abgeleitet⁸.

2.3 Analyse des klonogenen Überlebens der pGSCs mittels „Limited Dilution Assay“

Da die pGSC-Zellen nicht adhären am Plastikboden wachsen, kann zur Bestimmung des klonogenen Überlebens nicht der übliche Koloniebildungstest herangezogen werden. Stattdessen wurden in einem sogenannten „Limited Dilution Assay“ die Zellen aus dem Sphäroidverbund durch Accutase-Verdau vereinzelt, gewaschen, gezählt (siehe oben) und auf eine Zellzahl von 2048 Zellen/100 μl NSC-Medium eingestellt. Mit einer Multipette M4 (Eppendorf SE, Hamburg Deutschland) wurden in jedes Loch einer 96-Loch-Zellkulturplatte 100 μl NSC-Komplettmedium vorgelegt und dann in die erste 8er-Säule der 96er-Platte 100 μl Medium mit 2048 pGSC-Zellen pipettiert. Mit der automatisierten Vermisch-, 100 μl -Entnahme und 100 μl -Zugabe-Funktion der Multipette wurden die Zellen der ersten 8er-Säule in 12 Schritten sequentiell 1:2 verdünnt so dass in jeder Verdünnungsreihe 1024 bis 0,5 Zellen pro Loch vorlagen, und die letzte 100 μl -Entnahme der zwölften 8er Säule verworfen. Die nun 100 μl Zellsuspension pro Loch wurden anschließend mit 100 μl NSC-Komplettmedium (eventuell mit doppelkonzentrierten Inhibitoren bzw. doppelter entsprechender DMSO Vehikel-Menge, siehe unten) auf 200 μl aufgefüllt und mit TFields und/oder ionisierender Strahlung und gegebenenfalls Kanalinhibitoren behandelt (siehe unten). Nach Behandlungsende wurden die Zellen für 28 Tage weiterkultiviert und am Versuchsende unter Stereomikroskop-Kontrolle pro Verdünnungsreihe, die für das klonogene Überleben der pGSC-Kultur benötigte minimale Zellzahl bestimmt.

Der Kehrwert dieser minimalen Zellzahl ergab die sogenannte „Plating Efficiency“ (PE, Anwachsrate). Durch Dividieren der so erhaltenen PEs innerhalb eines Experiments durch die gemittelte PE der Kontrollsituation (0 mV/cm TTFields, 0 Gy, gegebenenfalls DMSO-Vehikelkontrolle, siehe unten) wurden normalisierte PEs errechnet. Durch Dividieren der PEs nach Einzel- oder fraktionierter Bestrahlung (siehe unten) durch die gemittelte 0 Gy-Kontrolle des jeweiligen Versuchsarms ($\pm$ TTFields, $\pm$ Inhibitor, siehe unten) errechnete sich die „Survival Fraction“ (SF, Überlebensfraktion). Die SF blendet somit die direkten Effekte von TTFields und/oder Inhibitor auf das klonogene Überleben aus, sondern zeigt stattdessen deren indirekten Effekte auf das klonogene Überleben über die Einflußnahme auf die DNA-Schadensantwort der Zelle.

2.4 Design und Evaluierung eines isothermen und isoosmotischen Tumor-Treating-Fields (TTFields) Multiloch-Zellkulturplatten-Applikators

Mit zwei Kupfer-Plattenelektroden, die unter- und oberhalb einer Multiloch-Zellkultur-Platte angebracht waren, wurden die pGBS-Sphäroide im Zellkulturmedium mit 200 kHz Sinus-Elektro-Wechselfelder behandelt (Abb. 6). Bei dieser Zellkultur TTF-Applikation wurden die elektrischen Felder somit senkrecht zu der Zellkulturplatte eingestrahlt (da die nicht adhärierenden pGSC-Einzellzellen und die bei fraktionierten Behandlungsschemata daraus sich entwickelnden Zellen im Sphäroidverbund in allen Raumrichtungen vorliegen, wurden damit im Gegensatz zu den planaren Zellkulturen im NovoCure InoVitro-System die Felder nicht parallel zur Teilungsebene appliziert).

In der Multiloch-Zellkulturplatte hat das Zellkulturmedium eine viel höhere Konduktivität verglichen mit den Polystyrolwänden der Löcher und dem Luftraum dazwischen. Die elektrischen Feldlinien eines senkrecht zur der Multilochplatte eingestrahlt elektrischen Feldes treten deswegen weitgehend im Mediumfüllbereich der Löcher im Medium durch die Zellkulturplatte. Ganz grob vereinfacht lässt sich daher unser TTFields Zellkultur-Applikationssystem als Plattenkondensator mit vier in Serie geschalteten Dielektrika-Schichten (Polystyrol-Zellkulturplatten-Boden, Zellkulturmedium, Luft, Polystyrol-Zellkulturplatten-Deckel) betrachten. In jedem dieser Dielektrika fällt die an den Kupfer-Plattenelektroden angelegte Spannung unterschiedlich stark ab, womit sich die TTFields Feldstärke zwischen den einzelnen Dielektrika extrem unterscheidet. In einem solchen sogenannten Spannungsteiler errechnet sich der Teil-Spannungsabfall (U_{teil}) im jeweiligen Dielektrikum am Gesamtspannungsabfall (U_{gesamt}) über den Anteil der Impedanz (Z_{teil}) des Dielektrikums an der Gesamtimpedanz (Z_{gesamt}) des Systems (Gleichung (1))

(1)

$$U_{\text{teil}} = \frac{Z_{\text{teil}}}{Z_{\text{gesamt}}} * U_{\text{gesamt}}$$

aus der Bachelorarbeit Medizintechnik
Universität Tübingen „TTFields
Elektrotherapie: Prüfung eines
Applikationssystems für Zellkulturen“ von
Eva Beumer

Die Impedanz einer Kapazität (Z_C) wiederum hängt unter anderem von der Schichtdicke und der relativen Permittivität des Dielektrikums ab (Gleichung (2)).

$$Z_C = \frac{1}{2\pi f C}, \text{ wobei für } C = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{A}{d} \text{ gilt.} \quad (2)$$

aus der Bachelorarbeit von Eva Beumer

(„Well“: Einzel-Loch der Zellkultur-Platte)

Mit C = Kapazität
 f = Frequenz
 ϵ_0 = $8,854 \times 10^{-12} \frac{F}{m}$ (elektrische Feldkonstante)
 ϵ_r = relative Permittivität
 A = Fläche eines Wells
 d = Schichtdicke

Aus der Gesamt-Impedanz (Z_{gesamt} in Gleichung (3) und (4)) lassen sich die Impedanzen der einzelnen Dielektrika (Z_p , Z_m und Z_t in Gleichung (4)) und somit der Spannungsabfall und daraus abgeleitet die elektrische Feldstärke im Medium (Gleichung (5) und (6)) wie folgt berechnen:

$$Z_{\text{gesamt}} = Z_p (\text{Polystyrol}) + Z_m (\text{Medium}) + Z_t (\text{Luft})$$

(3) Dielektrika Boden und Deckel der Zellkultur-Platte wurde vereinfachend als eine Schicht zusammengefasst. aus der Bachelorarbeit von Eva Beumer

$$Z_{\text{gesamt}} = \frac{1}{2\pi f \epsilon_0 \epsilon_{r,p} \frac{A}{d_p}} + \frac{1}{2\pi f \epsilon_0 \epsilon_{r,m} \frac{A}{d_m}} + \frac{1}{2\pi f \epsilon_0 \epsilon_{r,t} \frac{A}{d_t}}$$

$$= \frac{1}{2\pi f \epsilon_0 A} * \left(\frac{d_p}{\epsilon_{r,p}} + \frac{d_m}{\epsilon_{r,m}} + \frac{d_t}{\epsilon_{r,t}} \right)$$

(4) aus der Bachelorarbeit von Eva Beumer

Mit $\epsilon_{r,p}$ = relative Permittivität Polystyrol
 $\epsilon_{r,m}$ = relative Permittivität Medium
 $\epsilon_{r,t}$ = relative Permittivität Luft

$$U_{\text{teil}} = \frac{\frac{1}{2\pi f \epsilon_0 A} * \frac{d_m}{\epsilon_{r,m}}}{\frac{1}{2\pi f \epsilon_0 A} * \left(\frac{d_p}{\epsilon_{r,p}} + \frac{d_m}{\epsilon_{r,m}} + \frac{d_t}{\epsilon_{r,t}} \right)} * U_{\text{gesamt}} = \frac{d_m * U_{\text{gesamt}}}{\epsilon_{r,m} * \left(\frac{d_p}{\epsilon_{r,p}} + \frac{d_m}{\epsilon_{r,m}} + \frac{d_t}{\epsilon_{r,t}} \right)}$$

(5) aus der Bachelorarbeit von Eva Beumer

$$E_{\text{Medium}} = \frac{U_{\text{teil}}}{d_m} = \frac{U_{\text{gesamt}}}{\epsilon_{r,m} * \left(\frac{d_p}{\epsilon_{r,p}} + \frac{d_m}{\epsilon_{r,m}} + \frac{d_t}{\epsilon_{r,t}} \right)}$$

(6) aus der Bachelorarbeit von Eva Beumer

Da die frequenzabhängige Permittivität einer Salzlösung mit physiologischer Ionenstärke hundert- bis tausendfach höher ist ¹²⁶ als die von Luft ($\epsilon_{r,t} = 1$) und Polystyrol ($\epsilon_{r,p} = 2,5$)

(<https://de.wikipedia.org/wiki/Permittivität>) kann nach Gleichung (6) eine klinisch relevante TTFields Feldstärke im Bereich von 2-6 V_{pp}/cm im Medium bei der gegebenen Geometrie der Multiloch-Zellkulturplatte nur durch eine hohe Ausgangsspannung des Generators von bis zu 350 V_{pp} und einer durch hohem Medienfüllstand möglichst kleiner Luftschicht erreicht werden. Hierzu wurde von Herrn Uwe Schüler, Elektroniklabor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität Tübingen ein, verglichen zu einem früheren Projekt meiner Arbeitsgruppe in Tübingen ⁹⁷, leistungstärkerer TTFields-Generator entwickelt. Vor und zwischen den Experimenten wurde die Feldstärke im Medium in zwei Test-48- bzw. 96-Loch-Zellkulturplatten (mit identischem Mediumfüllstand wie bei den eigentlichen Experimenten) durch zwei an den Spitzen abisolierte Kupferdrähte mit einem digitalen Speicher-Oszillographen (Textronix TPS 2024, Beaverton, Oregon) differentiell abgegriffen und auf 5 V_{pp}/cm kalibriert. Gleichzeitig wurde die Medium-Temperatur mit einem Thermistor (Thermowiderstand, B57861S0103F040, TDK Electronics, München, Deutschland, Abb. 5) und einem Ohm-Meter (digitales VC185 TRMS Multimeter, Conrad Electronic, Hirschau, Deutschland) kontrolliert (Versuchsanordnung Abb. 6C-E).

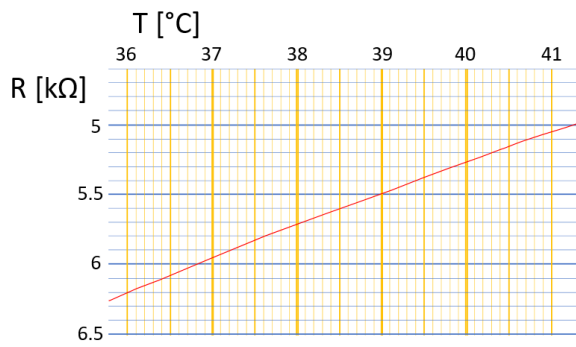


Abb. 5. Widerstand/Spannungs-Kennlinie des verwendeten Thermistors B57861S0103F040 von der Firma TDK Electronics

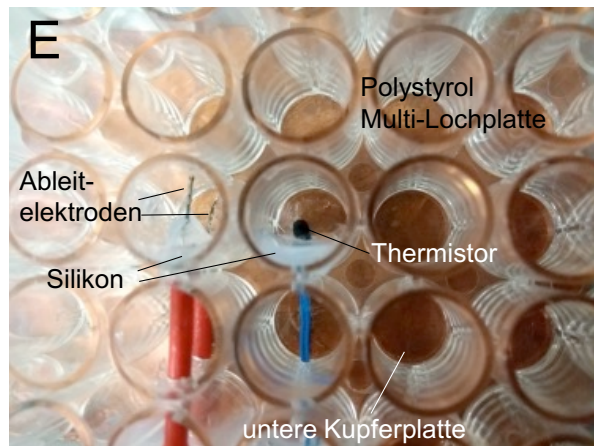
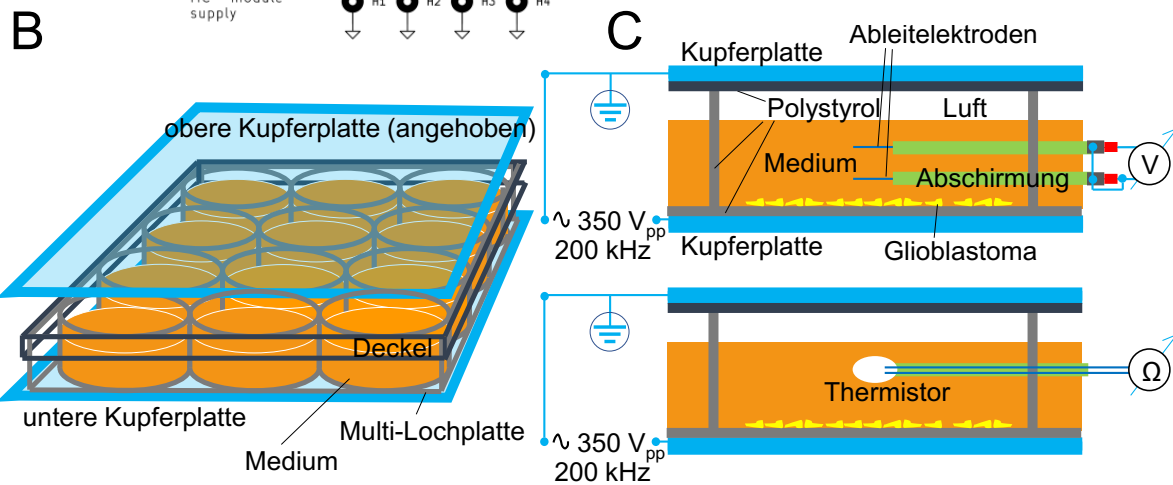
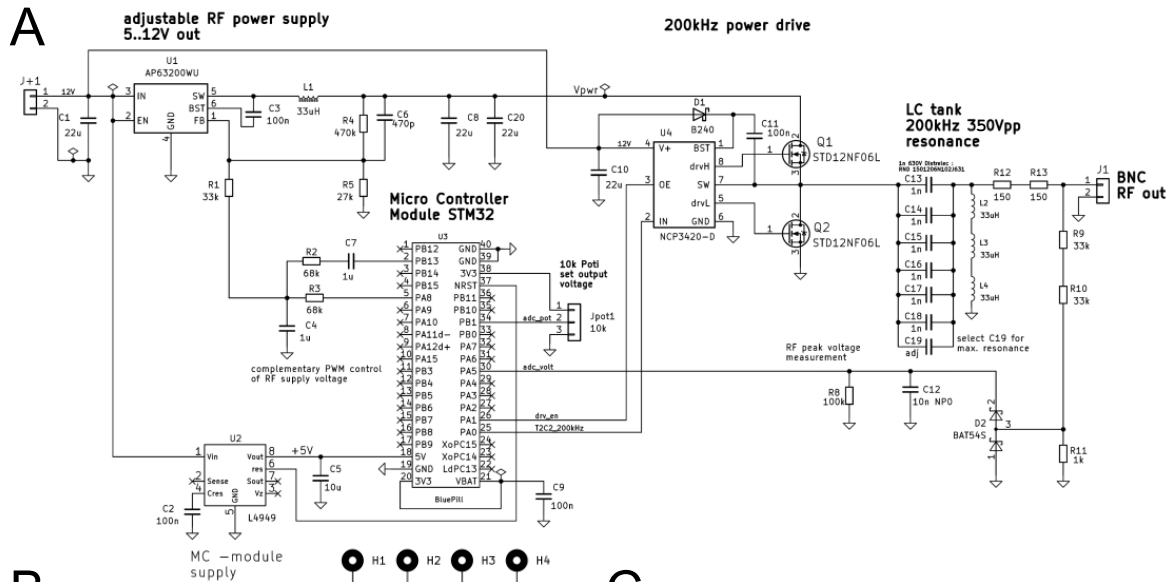


Abb. 6. TTFIELDS Multiloch-Zellkulturplatten-Applikation. **A.** Schaltplan des TTFIELDS 200 kHz/350 V_{pp}-Generators. **B, C.** Zeichnung des Applikationssystems (A) und der Testplatte zur Messung der TTFIELDS-Feldstärke (C, oben) und Medium-Temperatur (C, unten). **D, E.** Fotografien von TTFIELDS-Generator, digitalem Speicher-Oszilloskop (D) und 48-Loch-Testplatte ohne Medium Deckel und obere Plattenelektrode (E)

2.5 KCNN4-Knockdown mittels inverser siRNA-Transfektion

Für den small-interfering-RNA (siRNA)-Oligonukleotid vermittelten Knockdown von *KCNN4* (IK_{Ca}) wurden die *KCNN4*-spezifische ON-TARGETplus SMARTpool siRNA (L-004461-00-0005) und die „non-targeting“ (nt) ON-TARGETplus Control Pool RNA (D-001810-10-05, beide, Dharmacon Reagent, Horizon) als 20 µM (4x 5 µM Pool) Stammlösung in RNase freiem Wasser aufgelöst, aliquotiert bei -80°C eingefroren. In 6-Loch-Zellkulturplatten wurde in jedes Loch phenolrotfreies Opti-MEM Medium (250 µl, Gibco) mit jeweils 5 µl Lipofectamin (Lipofectamine RNAiMAX invitrogen) vorgelegt und 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Danach wurde in jedes Loch 250 µl phenolrotfreies Opti-MEM Medium mit jeweils 3 µl *KCNN4* siRNA- bzw. ntRNA-Stammlösung nachgelegt und weitere 30 min inkubiert. Letztlich wurden in jedes Loch 2,5x 10⁵ vereinzelte pGSC-Zellen in 2.5 ml NSC-Medium hinzugefügt (20 nM finale gepoolte siRNA Konzentration) und die Zellen für 48 h in 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Das Ausmaß des *KCNN4*-Knockdowns wurde funktionell mittels Patch-clamp-Technik (siehe unten) bewertet.

2.6 Behandlung der pGSCs mit Einmal- und fraktionierter ionisierender Strahlung

Die unbehandelten oder 48 h *KCNN4* siRNA- bzw. ntRNA-behandelten pGSC-Zellen wurde durch Accutase aus den Sphäroidverbund vereinzelte und in den 96-Lochplatten am Linearbeschleuniger der Radioonkologie in Tübingen (LINAC SL25 Philips, Eindhoven, Niederlande) einfach (0, 2 oder 4 Gy) oder fraktioniert (5x 0 bzw. 5x 2 Gy) bei Raumtemperatur im NSC-Medium mit 6 MV Photonen bestrahlt (4 Gy/min Dosisleistung). Mit 1 cm dicken RW-3 Platten (PTW, Freiburg, Deutschland) oberhalb und 10 cm dicken RW-3 Blöcken unterhalb der 96-Lochplatten wurde während der Bestrahlung der Dosisaufbau vor den Zellen bzw. die Reflexion der Strahlung aus dem RW-3 Block zurück in die Zellen gewährleistet. Die korrekte Dosisstärke und homogene Dosisverteilung über die 96-Lochplatten-Fläche wurde auf Zellebene von Herrn Dipl.-Ing. Savas Tsitsekidis, Medizinische Physik, Klinik für Radioonkologie, UKT Tübingen, durch Filmdosimetrie (Gafchromic 3 films; Ashland Inc., Covington, KY) überprüft.

2.7 Kombinierte Behandlung der pGSC-Kulturen mit TTFIELDS, ionisierender Strahlung und pharmakologischem/molekularem K⁺-Kanal Targeting

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die pGSC-Kulturen in bis zu 8 verschiedenen Versuchsarmen behandelt (± TTFIELDS, ± ionisierende Einfach- bzw. fraktionierte Strahlung, ± pharmakologische Hemmung bzw. molekularbiologische Herunterregulation von IK_{Ca}). Hierzu wurden die Accutase-vereinzelten unbehandelten bzw. *KCNN4* siRNA/ntRNA-behandelten pGSC-Zellen in 96-Lochplatten gegebenenfalls mit dem IK_{Ca}-Blocker TRAM-34 (1-[(2-Chlorophenyl) Diphenylmethyl]-1H-Pyrazol, Sigma, Aldrich, 0 bzw. 5 µM) in DMSO (0.05% v/v, Sigma-Aldrich, jeweils finale Konzentrationen) ausgesät (200 µl Medium/Loch). Zur Hemmung von BK_{Ca} wurde Paxilline (0 bzw. 5 µM, Sigma-Aldrich) in in DMSO (0.05% v/v) dem Medium zugesetzt. Für die LDAs im sogenannten pre-plating-Modus (i.e., vor der Bestrahlung) wurden die pGSC-Zellen auf 1024 bis 0.5

Zellen pro Loch wie in (2.3) beschrieben sequenziell verdünnt. Für die Bestimmung der residuellen γ H2Ax-Foci (siehe 2.8) wurden 2×10^4 pGSC-Zellen/Loch, für die Zellzyklus-Analyse (siehe 2.9) 2×10^5 pGSC-Zellen/Loch und für die Transkriptom-Analyse (siehe 2.12) 1×10^4 (5x 0 Gy) bzw. 2×10^5 pGSC-Zellen/Loch (5x 2 Gy) ausgesät. Gegebenenfalls nicht mit Zellen befüllte Löcher der 96-Lochplatten wurden mit 200 μ l PBS aufgefüllt.

Nach der Aussaat wurden die Zellen für 30 min im Brutschrank (37°C/5% CO₂) mit TTFields (200 kHz, 0 oder 5 V_{pp}/cm) neo-adjuvant behandelt, danach bei Raumtemperatur mit 0, 2 bzw. 4 Gy bestrahlt, und dann weitere 1 h (γ H2Ax-Foci), 24 h (LDA, γ H2Ax-Foci, Zellzyklus) bzw. 48 h (Zellzyklus) ohne Medienwechsel mit TTFields (200 kHz, 0 oder 5 V_{pp}/cm) adjuvant behandelt. Zur fraktionierten Bestrahlung (5x 0 Gy bzw. 5 x 2 Gy in manchen LDA-Experimenten und für die Transkriptom-Analyse wurde die 0/2 Gy-Bestrahlung mit anschließender 24 h TTFields (0/5 V_{pp}/cm)-Behandlung an vier weiteren aufeinanderfolgenden Tagen fortgesetzt. Abbildung 7 verdeutlicht schematisch die Abläufe bei den LDA-Experimenten mit Einfach- und fraktionierter Bestrahlung.

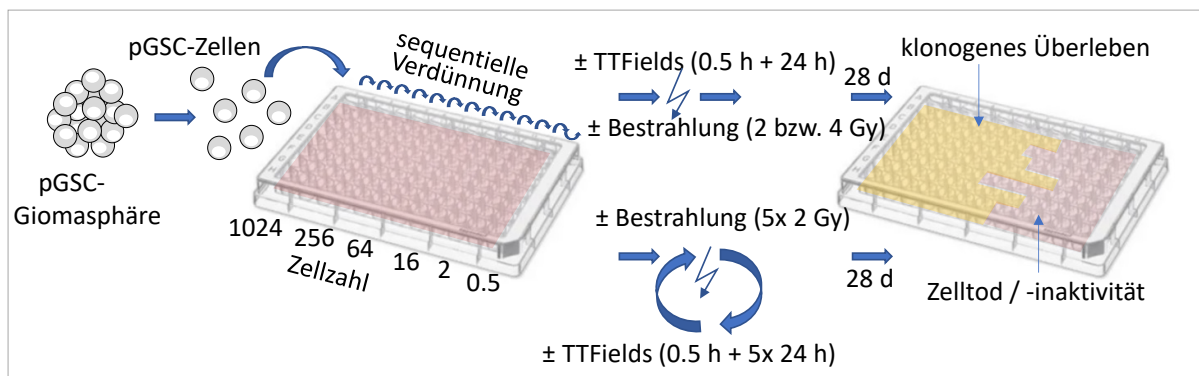


Abb. 7. Schemazeichnung der sequenziellen Verdünnung der aus den pGSC-Sphäroiden herausgelösten Glioblastomzellen in 96-Loch Zellkulturplatten, der anschließenden Behandlung mit TTFields und (fraktionierter) Bestrahlung sowie der abschließenden Analyse der behandlungsabhängigen Klonogenizität aus der minimalen Zellzahl, die für das Überleben der Zellen benötigt wird.

2.8 Immunhistologische Bestimmung der residuellen nukleären γ H2Ax-Foci als Surrogat-Marker nicht-reparierter DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSBs)

Die pGSC-Zellen bzw. kleinen Sphäroide wurden 1 h bzw. 24 h nach Bestrahlung durch Accutase-Verdauung (5 min/37°C) und mechanisch vom 96-Lochplatten-Boden abgelöst bzw. vereinzelt, gepoolt (Zellen aus jeweils 4 Löchern), abzentrifugiert (200 x g für 5 min bei Raumtemperatur), mit PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert, in 200 μ l NSC-Medium aufgenommen, und bei Raumtemperatur auf Objektträger in der Zytocentrifuge (Shandon Cytospin 3, Thermo Fisher, Scientific) abzentrifugiert (200x g für 5 min). Anschließend wurde das Medium nach Entfernen von Filter und Cytofunnel-Trichter (Epredia Thermo Fisher, Scientific) vom Objektträger abgeschüttelt, der Objektträger mit Zellstoff getrocknet und die Zellen durch Eintauchen des Objektträgers in eiskaltes 70° Ethanol für 10 min fixiert. Nach 3-maligem Waschen durch Eintauchen der Objektträger in eiskaltes PBS wurden die Randflächen der Objektträger mit Zellstoff getrocknet und die Zellen tragende Glas-Oberfläche mit einem Fettstift-Ring begrenzt.

Die Zellmembranen wurden dann in eiskaltem PBS mit 0.1% Triton-X100 für 15 min solubilisiert, danach die Objektträger 3x in eiskaltem PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen durch 15 minütige Inkubation mit 3% (w/v) BSA in PBS bei Raumtemperatur geblockt und anschließend nacheinander der murine anti human phospho-Ser₁₃₉-H2AX-Antikörper (Cat. 613402, BioLegend, Amsterdam, Niederlande, 0.5 µg/ml) und nach dreimaligem Waschen mit PBS der Alexa-Fluor 488 goat anti mouse IgG (A11001, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) jeweils 1:1000 verdünnt in 1% BSA/PBS für jeweils 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen ein letztes Mal 3x in PBS gewaschen, die Objektträger mit Vectashield Plus Antifade Mounting Medium with DAPI (Biozol) eingedeckelt.

Der DNA-spezifische Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) zur Zellkernmarkierung und der Alexa-Fluor 488 Antikörper wurde im Zeiss Fluoreszenzmikroskop mit den Excitation/Beamsplitter/Emission-Wellenlängen von G365/FT395/LP420 nm bzw. 450-490/FT510/LP520 nm nacheinander als blaues bzw. grünes Fluoreszenzlicht detektiert und fotografiert. Bei der Analyse der nukleären γH2Ax-Foci wurde bei mindest 3 Zellkulturpassagen und 10-15 Bildern pro Passage zunächst in der DAPI-Aufnahme intakte Zellkerne markiert, und dann in dem superimponierten Alexa-Fluor 488 Fluoreszenzbild, die Anzahl der grünen Foci in den markierten Zellkernen dokumentiert.

2.9 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse des Zellzyklus wurden die pGSC-Zellen mittels Accutase-Verdau und mechanisch vom 96-Lochplatten-Boden abgelöst, aus den kleinen sich bildenden Sphäroiden herausgelöst und direkt in FACS (Fluorescence-activated Cell Sorting)-Röhrchen überführt und gepoolt (3-4 Löcher). Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (200x g für 5 min bei Raumtemperatur), das Zellpellet zum Waschen in PBS resuspendiert und die Zellen erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in einer vereinfachten Propidiumiodid-haltigen Nicoletti-Lösung (0.1% (w/v) Na-Zitrat (Sigma-Aldrich), 0,1% Triton X-100, 10 µg/ml Propidiumiodid (Sigma-Aldrich) in H₂O)¹²⁷ resuspendiert (bei dem hypertonen Sprengen der Zellen sollen hierbei ausreichend zelleigene RNasen mobilisiert werden, so dass bei diesem Protokoll keine externen RNasen hinzugeführt werden müssen¹²⁷). Die Zellen wurden dann in der Nicoletti-Lösung für 30 min im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die DNA-spezifische Propidiumiodid-Fluoreszenz-Intensität der Zellen im Durchflusszytometer (FACScalibur mit CellQuest Aufnahme-Software, BD, Franklin Lakes, NJ) bei 488/10 nm Excitation und 585/42 nm Emission vermessen und schließlich die Zellzyklusverteilung FCS Express-3 Software (De Novo Software, Pasadena, CA, USA) analysiert.

2.10 Patch-Clamp Ableitungen

On-cell (cell-attached)-Ströme über einen in die Ableitelektroden-Pipettenspitze („Patch-Pipette“) eingesaugten Plasmamembran-Fleck („Patch“) wurden in der Spannungsklemme mit Hilfe eines druckluftgelagerten und Faraday-Käfig abgeschirmten, invertierten Axiovert-100 Mikroskop (schwenkbarer Kondensor-Turm, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und einem 32x Long-Distance Objektiv (Zeiss) im Phasenkontrast aufgezeichnet. Schwingungsgedämpfter druckluftgelagerter Tisch und Faraday-Käfig waren ursprünglich von der Feinmechanik-Werkstätte des Physiologischen Institut-I der Universität Tübingen gebaut worden. Die pGSC-Sphäroide wurden in einer am Mikroskop-Kreuztisch montierten Halterungsplatte in einer 3 cm ø Petrischale bei konstant 37°C mit einer Flussrate von 0.5-1 ml/min superfundiert. Hierzu wurde ein von der Feinwerkstatt der Klinik für Radioonkologie gebauter Petrischalen-Ringeinsatz mit Wasserbad-Durchlauf und

Superfusionsanschlüssen verwendet, der das Flüssigkeitsvolumen in der Petrischale auf $< 100 \mu\text{l}$ erniedrigte und somit schnelle Austauschraten der Badlösung über den Zellen gewährleistete. Zudem bewirkte der niedrige Flüssigkeitsstand der Badlösung eine geringe Eintauchtiefe der Ableitelektroden-Pipettenspitze und somit eine geringe elektrische Kapazität der eingetauchten Glasoberfläche die mit der C_{fast} -Kompensationsfunktion des Patch-Clamp-Verstärkers leicht ausgeglichen werden konnte. An der Halterungsplatte waren auch Absaugrohr und Salzbrücke (mit Badlösung gefülltes Glasröhrchen) zur Ag/AgCl-Referenzelektrode sowie der Einzellzell-TTFields-Applikator (siehe unten) montiert (Abb. 8).

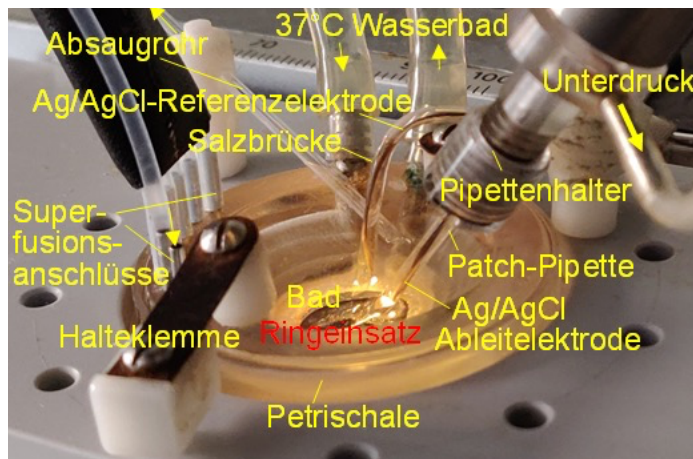


Abb. 8. In der Petrischale inserierter Ringeinsatz zur 37°C Temperierung und Superfusion der Badlösung während des Ableitens von On-cell Strömen über die Plasmamembran von pGSC-Zellen (diese Abbildung stammt aus der Doktorarbeit von Milan Misovic „Radiogene Plasmamembran-Transporte in Tumorzellen“, Medizinische Fakultät der Universität Tübingen).

Mit einem DMZ-Puller (Zeitz, Augsburg, Deutschland) wurden die Patch-Pipetten im Dreifachzug-Verfahren aus Glaskapillaren mit Filament (Borosilikat-Glas, GC150 TF-10, Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) Mikroprozessor-gesteuert gezogen und anschließend die Abbruchkante der Pipetten-Spitze mit der Polierfunktion des Gerätes hitzepoliert. Der Widerstand der Pipettenspitze mit den Ionenstärken der verwendeten Pipettenlösungen wurde dabei auf $\pm 5 \text{ M}\Omega$ eingestellt. Die Patch-Pipetten wurden mit Pipettenlösung gefüllt, über die Ag/AgCl-Ableitelektrode des Vorverstärkers (siehe unten) geschoben und mit der Gummi-Ring-abdichtenden Klemmschraubvorrichtung des Pipettenhalters luftdicht fixiert (Abb. 8), so dass auf das Pipettenlumen Unterdruck über einen weiteren Zugang zum Lumen des Pipettenhalters aufgebaut werden konnte. Über diesen wurde das Membran-Patch in die Öffnung des Patch-Pipettenspitze eingesaugt und der Abdichtungs (Seal)-Widerstand zwischen Bad- und Pipettenlösung im $10 \text{ G}\Omega$ -Bereich erreicht, der benötigt wird, um Ströme im pA-Bereich messen zu können. Die Patch-Pipetten-Spitze wurde mikroskopisch kontrolliert über einen am Mikroskop-Stativ angeschraubten STM-Mikromanipulator (Lange, GmbH and Co., KG, Deutschland), an dem Vorverstärker mit Patch-Pipetten-Halter angebracht waren, kombiniert mechanisch und „remote-access“ elektrisch an die Zelloberfläche angenähert.

Nach Einsaugen der Plasmamembran in die Patch-Pipetten-Spitze und Erreichen eines Seal-Widerstandes zwischen Pipetten- und Badlösung im Bereich von 10 und $100 \text{ G}\Omega$ wurden die makroskopischen Ströme und Einzelkanalaktivitäten über das elektrisch isolierte, eingesaugte Plasmamembran-Patch in der Spannungs-klemme im On-cell (Cell-attached)-Modus mit einem EPC-9-Verstärker (Heka, Lambrecht, Deutschland) und einer ITC-16-AD/DA-Wandler-Karte (Instrutech, Port Washington, NY, USA) unter Verwendung der Pulse Software (Heka) mit einer 10 kHz Sampling-Rate aufgezeichnet und 3 kHz -Tiefpass-gefiltert. Mit der Pulsgenerator-Funktion des Systems wurde ausgehend von 0 mV Haltepotenzial die Spannung in 700 ms Rechtecksprüngen in 5 mV Schritten auf

Werte zwischen maximal -100 mV und +100 mV geklemmt. Mit physiologischer Extrazellulärraum angeglichenen Badlösung liegt im On-cell-Modus (bei dem die Zelle intakt bleibt) bei 0 mV Haltepotenzial das physiologische Membranpotenzial an der Spannungs-geklebten Membran an zu welchem sich während der Spannungssprünge die Klemmspannung addiert.

Zur Auswertung wurde mit der Oszillographen- und Analysen-Funktion der Pulse-Software die Stärke des makroskopischen Stroms über das Patch (i.e., der Gesamtstrom unter Vernachlässigung von Einzelkanalereignisse) während des 100-700 ms Zeitfenster eines 700 ms Spannungstroms gemittelt und gegen die Klemmspannung aufgetragen. Bei der Einzelkanalanalyse wurden identifizierte „Unitary Current Transitions“ als Maß der Ionenkanal-Amplitude bei verschiedenen Klemmspannungen bestimmt und gegen die Klemmspannung aufgetragen. Durch Lineare Regression linearer Bereiche der Strom/Spannungskurve bzw. Kanal-amplitude/Spannungskurve wurden Membran- bzw. Einzelkanal-Leitfähigkeiten berechnet. Weiterer Endpunkt war das Strom-Umkehrpotenzial (V_{rev}), das als Schnittpunkt der Strom/Spannungs-Kurve mit der Spannungs-Achse definiert ist. Die angegebenen Spannungen beziehen sich auf die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran. Ausgehend von der 0 pA-Nullstromlinie (meist als rote Linie dargestellt) bewirken Einwärtsströme in den original Oszillographendarstellungen Ausschläge der Stromspur nach unten, Auswärtsströme Ausschläge nach oben. Einwärtsströme werden durch den Einstrom von Kationen aus der Pipettenlösung in die Zelle (bzw. durch Ausstrom von Anionen aus der Zelle in die Pipettenlösung) hervorgerufen und werden im Strom/Spannungs-Diagramm als negative Ströme eingezeichnet. Entsprechend verursachen Ausstrom von Kationen aus und Einstrom von Anionen in die Zelle Auswärtsströme, die im Strom/Spannungs-Diagramm positive Werte annehmen. In den original Oszillographendarstellung werden die Ströme der einzelnen Spannungssprünge übereinandergelagert gezeigt.

Als Badlösung und teilweise als Pipettenlösung wurde eine dem physiologischen Extrazellulärmilieu angenäherte NaCl-reiche Lösung (in mM: 125 NaCl, 32 N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethanesulfonsäure (HEPES), 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, mit NaOH auf pH 7.4 titriert) verwendet. In weiteren Experimenten wurde die NaCl-Badlösung mit KCl-Pipettenlösung (130 KCl, 32 HEPES, 1 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, mit KOH auf pH 7.4 titriert) kombiniert. Das Liquid Junction Potenzial zwischen NaCl- und KCl-Lösung (wenige mV) das vor Erreichen des GΩ-Seals genullt wurde und nach dem „sealen“ als negativer Wert an der Membran anlag, wurde nicht weiter bei der Auswertung berücksichtigt. Zur Aktivierung des IK_{Ca} K^+ Kanals wurde der Kanalöffner 1-Ethyl-2-Benzimidazolinon (1-EBIO, 500 μM in 0.25% DMSO) und zu dessen Hemmung zusätzlich TRAM-34 (200 nM in 0.02% DMSO) superfundiert.

2.11 TTFIELDS Einzelzell-Applikation

TTFIELDS wurden während der Patch-clamp-Ableitungen mithilfe eines *in vitro*-Mikroapplikators, der von der Feinmechanik-Werkstatt der Klinik für Radioonkologie entworfen und hergestellt wurde, auf einzelne pGSC-Sphäroide appliziert. Der Applikator besteht aus zwei Ag/AgCl-Elektroden, die mithilfe einer Halterung auf dem Boden einer Petrischale parallel in einem Abstand von 7 mm platziert wurden (Abb. 9). Die beiden Elektrodendrähte wurden über Kupferlitzen und Goldstecker mit einem Impulsgenerator (Funktionsgenerator Modell DS340, Stanford Research System, 1290-D Reamwood Avenue, Sunnyvale, CA 94089) verbunden, wobei eine Kapazität (4,7 μF) zwischen einer Litze und dem Generatorausgang geschaltet war. Dies sollte zum einen Kriechströme aufgrund möglicher Offsetpotenziale zwischen den beiden Generatorausgängen verhindern und zum anderen ein kapazitives Einkoppeln der elektrischen Felder gewährleisten. Die TTFIELDS-Feldstärke wurde mit zwei an den freiliegenden Enden abisolierten Drähten, die über ein Gewebeklebeband parallel mit einem

Abstand von 5 mm montiert waren, und einem handelsüblichen Oszillographen direkt in der superfundierten Badlösung auf Sphäroidebene gemessen und auf 5 V_{pp}/cm eingestellt (Abb. 9).

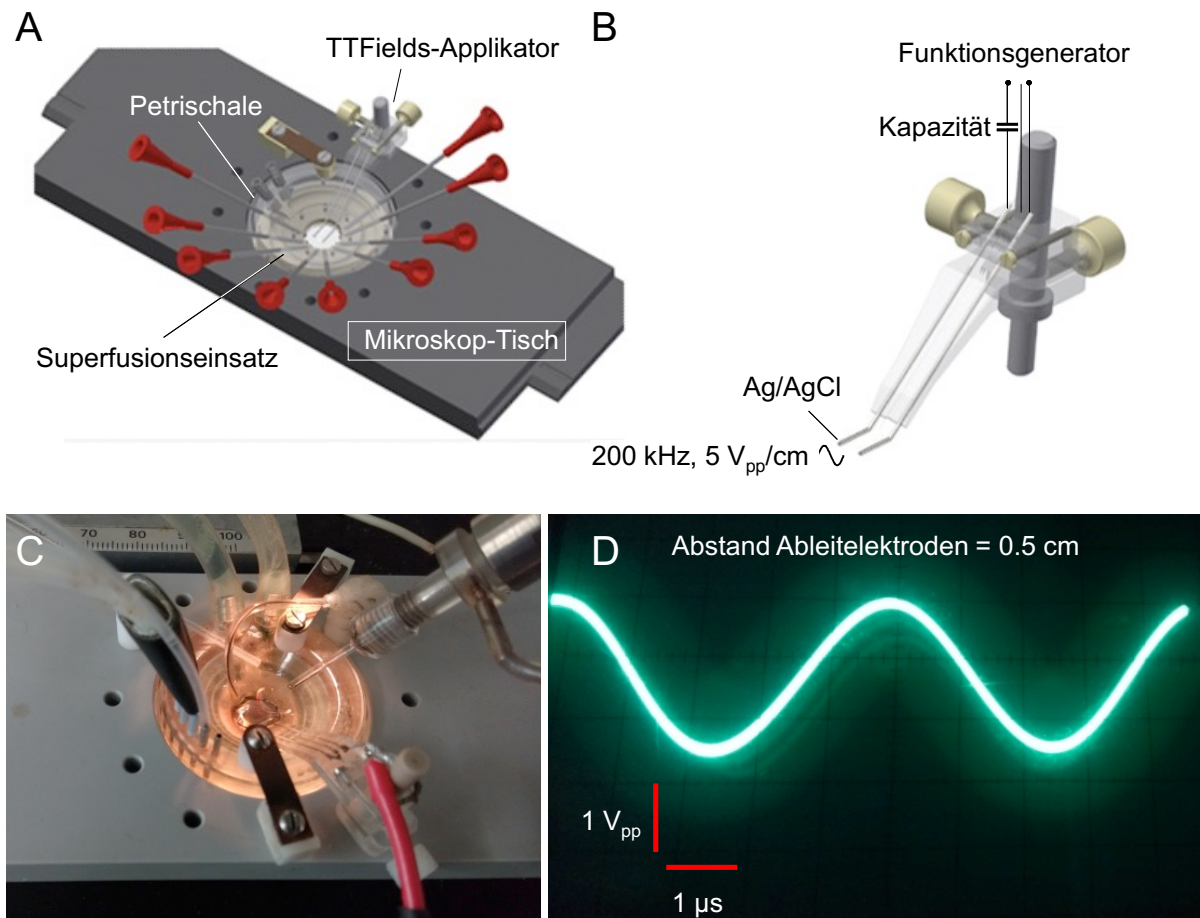


Abb. 9. TTFields Einzelzell-Applikator. **A. B.** Zeichnung der am mikroskopisch eingeklipsten Halterungsplatte (grau) mit Petrischale, Superfusions-Ringeinsatz und TTFields-Applikator (A) sowie des herausvergrößerten TTFields-Applikators alleine mit den beiden Ag/AgCl-Elektroden (B). **C.** Photographie der tatsächlichen in (A) gezeigten Versuchsanordnung. **D.** Oszillograph-Anzeige der auf 5 V_{pp}/cm Feldstärke eingestellten TTFields (Ableitelektroden mit 0.5 cm Abstand; Abbildungsteile A und B aus ⁹⁷, verändert).

2.12 Transkriptomanalyse

2.12.1 RNA-Aufbereitung und RNA-Bibliothek (durch IMG M Laboratories GmbH, München-Martinsried, Deutschland)

Zwei pGSC-Kulturen (TA11 und TA16) wurden für diese Experimente ausgewählt und in jeweils drei Passagen für 5 Tage fraktioniert bestrahlt (5x 0 Gy oder 5x 2 Gy) und gleichzeitig mit TTFields (200 kHz, 0 oder 5 V_{pp}/cm für 5x 24 h) behandelt: Die Zellen wurden nach der letzten Bestrahlung nachfolgenden 24 h-TTField-Intervall geerntet, pelletiert (200x g für 5 min bei Raumtemperatur), mit PBS gewaschen, erneut pelletiert, und die Zellpellets in flüssigen Stickstoff schockgefroren, im -80°C-Gefrierschrank aufbewahrt und dann auf Trockeneis zur Probenaufbereitung und Transkriptomanalyse zur Firma IMG M Laboratories GmbH, München-Martinsried, Deutschland) versendet.

Dort wurde die RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) entsprechend der Hersteller-Anleitung isoliert, in 30 µl H₂O eluiert und deren Konzentration und Qualität im NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) über die 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm Absorptionsratios analysiert. PBS/H₂O-Kontrollen wurden zum Ausschluss von Kontaminationen mitgeführt. Anschließend wurden mittels Kapillarelektrophorese (2100 Bioanalyzer) unter Verwendung des RNA 6000 Pico Kit (beides Agilent Technologies) die RNA nach ihrer Fragmentgrößen separiert und aus den dadurch erhaltenen Elektropherogramme und virtuelle Gel-Images sogenannte „RNA quality number or RNA integrity number (RQN/RIN)“ mit RNA-Qualitätsindizes-Werten von 1-10 erstellt. RIN-Werte ≥ 7.0 wurden als ausreichend für das Erstellen der RNA-Bibliothek angesehen.

Die Präparation der RNA-Bibliothek wurde mit dem NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module und dem NEBNext® Ultra™ II Directional RNA kit (New England Biolabs) gemäß der Herstelleranleitung durchgeführt. Hierzu wurden zunächst mittels Oligo-dT-Beads poly(A) RNA magnetisch selektioniert, die mRNA fragmentiert und mit random Priming revers in Erst-Strang cDNA transkribiert. Nach der Zweit-Strang cDNA Synthese wurden die 3'-Enden adenyliert, Sequenzierungs-Adapter (bestehend aus Sequenzierungs-Primer-, flow cell-Bindungsstellen und multiplexed Sequenzierungsindizes) ligiert, in 10-11 PCR Zyklen amplifiziert und aufgereinigt. Universale human Referenz-RNA (UHR) wurde gleichzeitig als interne Positiv-Kontrolle mitprozessiert und nach erfolgreicher Validierung verworfen. Nach cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation wurde gemäß der Herstelleranleitungen die Adapter-ligierte DNA mit dem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) qualitätskontrolliert, mittels des hoch-sensitiven Fluoreszenz-Farbstoff-basierenden Qubit® ds DNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert, mit anderen Proben gleicher cDNA-Menge gepoolt und mit NaOH denaturiert.

2.12.2 RNA-Sequenzierung (durch IMG M Laboratories)

Die ssDNAs wurden dann auf die Illumina NovaSeq® flow cell-Kassette geladen, die Templates mit der exclusion amplification (ExAmp) Chemie amplifiziert und schließlich die so erhaltenen Cluster im NovaSeq® 6000-Instrument mit der „Sequencing by Synthesis (SBS)“-Methode über den sequenziellen Einbau Fluoreszenz-markierter Terminator-dNTPs unter Verwendung der NovaSeq Control Software (NCS) v1.8.1. sequenziert. Die Fluoreszenz-Images wurden mit Real Time Analysis 3.4.4 Software (RTA) prozessiert (FastQ only processing pipeline) und die so erhaltenen Bilddaten mit dem bcl2fastq 2.20.0.422 Software-Paket analysiert sowie die Sequenzierungs-Qualität im Illumina Sequence Analysis Viewer (SAV) 2.4.7. kontrolliert.

2.12.3 RNAseq-Daten-Analyse (durch IMG M Laboratories)

Nach mehreren Qualitätskontrollen und Herausfiltern von z.B. Mischfragment-RNA-Clustern wurden die Rohdaten in die CLC Genomics Workbench 23.0.4 (Qiagen) für das „read mapping“ und das Erstellen der Transkriptlisten importiert und mithilfe des „Create Sequencing QC report“ und „RNA-Seq analysis“ tool das „demultiplexing“ vorgenommen und die Sequenzen gegen das Homo sapiens Referenzgenoms (NCBI) „gemappt“. Die Leseraten der so kartierten Sequenzen werden als RPKM (Reads per Kilobase of Exon Model per Million mapped Reads) = $\text{total Exon Read Count} / (\text{mapped Reads [Millions]} * \text{Exon Length [kb]})$ als normalisiertes Maß für die Transkript-Abundanz umgerechnet.

2.12.4 Hauptkomponenten-Analyse, Volcanoplot und Netzwerke

Zunächst wurden in den beiden untersuchten pGSCs in einer Hauptkomponenten-Analyse (ebenfalls durch IMG M Laboratories) die Richtung der größten Datenvariabilität gegen die der zweitgrößten in Abhängigkeit der Kulturpassage und der Versuchsbedingung graphisch aufgetragen. Die Expressionlevel wurden auf Transkriptebene differentiell zwischen den Versuchsgruppen mithilfe des

“Differential Expression for RNA-Seq” Tools der CLC Genomics Workbench 23.0.4 analysiert. Log₂-fache Unterschiede in der mittleren Transkript-Abundanz zwischen zwei Versuchsgruppen von ≥ 2 bzw. ≤ -2 wurden dann als biologisch relevant erachtet, wenn sich eine False Discovery Rate-korrigierte Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0.05$ ergab.

Vom Autor dieser Arbeit wurden dann die von IMGIM Laboratories bereitgestellten FDR-korrigierten Irrtumswahrscheinlichkeiten und die TTFIELDS-assoziierten RNA-Abundanz-Veränderungen der beiden pGSC-Kulturen in Volcano-Plots visualisiert und wahrscheinliche fraktionierte Bestrahlungs- bzw. TTFIELDS-modulierte Interaktionsnetzwerke mit dem freien NetworkAnalyst-Online-Tool (<https://www.networkanalyst.ca/NetworkAnalyst/>) prognostiziert. Heat Shock-regulierte Transkripte wurden aus der Target-Liste des Qiagen, RT² Profiler PCR Array Human Heat Shock Proteins & Chaperones entnommen.

2.13 pGSC-Lyse durch CD276-gerichteter Chimärer Antigen-Rezeptor (CAR)-Natürliche Killer (NK)-92-Zellen

Mittels Calcein-Freisetzung aus Calcein-beladenen, CD276 auf der Zelloberfläche exprimierenden pGSC-Zielzellen¹²⁸ wurde die Lyseaktivität der CD276-gerichteten CAR NK-92-Zellen in Abhängigkeit einer TTFIELDS-Behandlung (0 bzw. 5 V_{pp}/cm) analysiert (Abb. 10 und 11). Dabei wurden die CD276-gerichtete CAR NK-92-Zellen entweder vor der Ko-Inkubation mit den Zielzellen mit TTFIELDS für 24 h in 96-Lochplatten (200 µl/Loch) vorbehandelt oder/und die TTFIELDS während der 2-stündigen Ko-Inkubation (ebenfalls in 96-Lochplatten mit 200 µl/Loch) mit den Calcein-beladenen pGSC-Zellen appliziert.

Zur Calcein-Beladung der pGSC-Zellen wurden 1×10^5 vereinzelte Zellen/ml mit 9 µM Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM; Thermo Fisher, #C3100MP) AM (C3100MP, Thermo Fisher Scientific) in 2% FBS supplementierten MEM-A-Medium 50 min lang im Brutschrank inkubiert, dann das nicht aufgenommene Calcein-AM durch dreimaliges Abzentrifugieren (250x g für 5 min bei Raumtemperatur) und Resuspendieren in Medium ausgewaschen. Für die Lyse wurden anschließend 5×10^3 pGSC-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen zu den CAR NK-92-Zellen (1:10, 1:2,5, 1:0,5) in 200 µl 2% FBS supplementierten MEM-A-Medium für 2 h im Brutschrank ko-inkubiert. Nach Zentrifugieren der Platten (250x g für 5 min bei Raumtemperatur) wurden der Überstand (100 µl) in neue 96-Lochplatten überführt und die freigesetzte Calcein-Fluoreszenzintensität in einem Spark-Multimode-Mikroplattenlesegerät (495 nm Excitation/515 nm Emission, Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Die CD276-Spezifität der pGSC-Lyse durch CD276-CAR-NK-92-Zellen wurde bereits in vorausgegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe gezeigt¹²⁸.

Die spontane Freisetzung von Calcein wurde in Calcein-beladenen pGSC-Kontrollzellen ohne CD276-CAR-NK-92 Ko-Inkubation, die vollständige Lyse der pGSC-Zellen durch Zusetzen von Triton-X100 (2%) zu weiteren pGSC-Kontrollproben ermittelt. Die Calcein-Freisetzung in den Effektor/Zielzellen-Ko-Inkubationen wurden auf die vollständige Triton-X100-Lyse (jeweils abzüglich der Spontan-Lyseraten) bezogen. Zur Daten-Auswertung wurden die so erhaltenen CD276-CAR NK-92-spezifischen relativen Lyserate weiterhin auf das Effektor/Zielzellen-Verhältnis normalisiert. Da sich die derart normalisierten Lyseraten in einem Experiment nicht zwischen den verschiedenen Effektor/Zielzellen-Verhältnissen unterschieden, konnten diese Daten für die statistische Auswertung gepoolt werden.

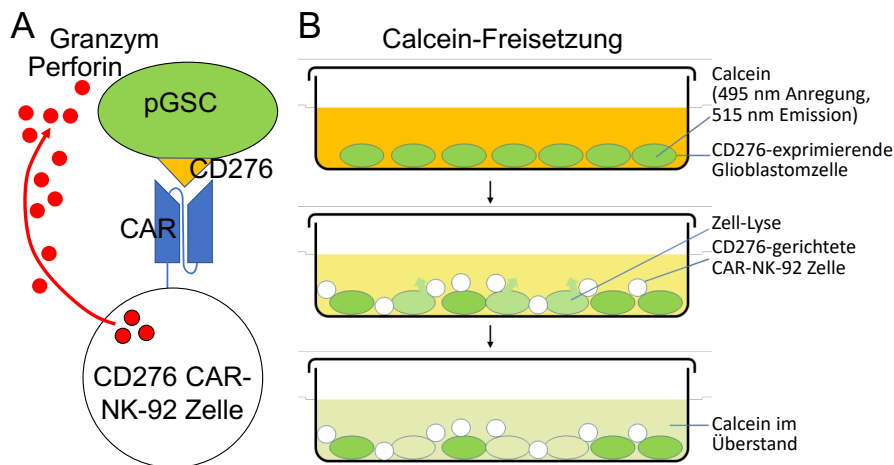


Abb. 10. Calcein-freisetzung-Experiment.

A. Lyse von CD276-exprimierenden pGSC-Zellen durch CD276-gerichtete CAR-NK-92 Zellen. **B.** Calcein-freisetzung aus Calcein-beladenen pGSC-Zellen durch CD276-CAR-NK-Zell vermittelte Lyse.

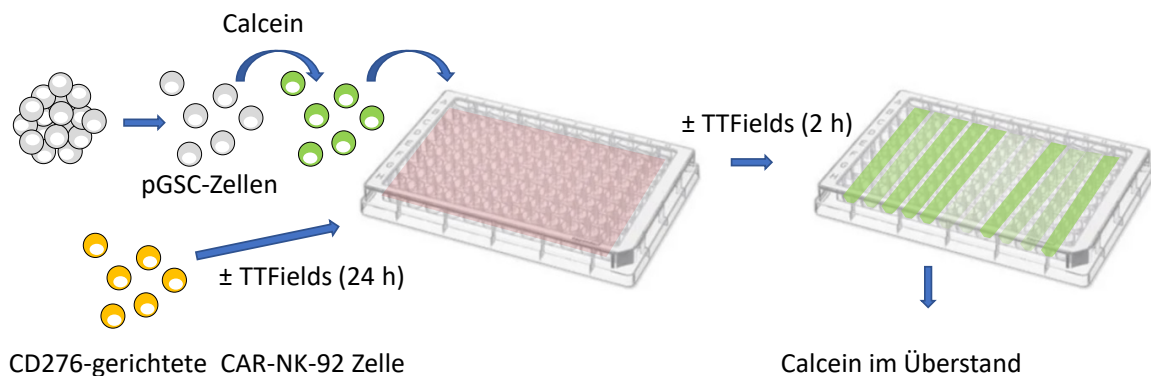


Abb. 11. Einfluss von TTFields-Behandlung auf die Lyse von pGSC-Zellen durch CD276-CAR-NK-92-Zellen. Die NK-92-Zellen wurden 24 h mit TTFields vorbehandelt und/oder während der 2-stündigen Ko-Inkubation mit den Calcein-beladenen pGSC-Zellen mit TTFields behandelt (jeweils 0 bzw. 5 V_{pp}/cm).

2.14 Statistik

Unterschiede zwischen Versuchsgruppen wurden bei Daten-Normalverteilung mit zweiseitigem gepaartem Student t-Test, mit ungepaartem zweiseitigem t-Test oder, bei unterschiedlich großen Standardabweichungen, mit Welch-korrigiertem zweiseitigem t-Test analysiert. Multiple Paarvergleiche wurden dabei Bonferroni-korrigiert (indem der p -Wert mit der Anzahl der Paarvergleiche multipliziert wurde). Nicht-normalverteilte Daten wurden mittels nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test (Dunn Posthoc-Test) analysiert. Irrtumswahrscheinlichkeiten (error probability p) von $p \leq 0.05$ wurden als statistisch signifikant bewertet und statistische signifikante Unterschiede in den Abb. mit einem oder mehreren * gekennzeichnet. Alle statistischen Tests (mit Ausnahme der Transkriptom-Analyse) wurden mit GraphPad Prism Version 10.4.0 durchgeführt. Bei den Transkriptomanalysen wurden $\log_2$ -fache Unterschiede in den Transkript-Abundanzen von ≥ 2 und ≤ -2 als relevant betrachtet und die statistische Signifikanz dieser Unterschiede mit einer False Discovery Rate von FDR $p \leq 0.05$ definiert. Die FDR-Werte wurden von IMG Laboratory mittels des CLC Genomics Workbench tools "Differential Expression for RNA-Seq" berechnet. Die Anzahl der technischen und unabhängigen (z.B. verschiedene Zellkultur-Passagen) bzw. biologischen Replikate wird in den Legenden mit n bzw. N angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Aufbau einer möglichst homogenen Kohorte von pGSC-Kulturen

Da sich individuelle pGSC-Kulturen beschriebenermaßen stark in ihrer Radiosensitivität, ihrem Migrationsverhalten und in ihren Stammzellmarker-Expressionen unterscheiden⁸, wurden die angelegten pGSC Kulturen zunächst funktionell und molekularbiologisch charakterisiert. Von den $n = 26$ in Kultur anwachsenden Glioblastomresektaten konnten $n = 10$ Kulturen bezüglich ihrer molekularen mesenchymal/proneuralen mRNA-Signatur⁸ und Radiosensitivität mittels RT-PCR und LDA analysiert werden. Bei einer dieser Kulturen wurde vom Patienten rückwirkend das Einverständnis zurückgezogen, so dass diese Kultur und ihre Daten vernichtet werden mussten. Drei der in diesem Projekt gezogene Kulturen (TA4, TA11, TA16) wurden zusammen mit frühen Passagen zweier weiterer, gut charakterisierter pGSC-Kulturen (LK11, LK 28) aus einem vorherigen Projekt unserer Arbeitsgruppe⁸ für die Experimente dieser Doktorarbeit ausgewählt. Dabei spielte eine Rolle, dass alle diese fünf pGSC-Kulturen mit hohen Anwachsrate und Verdopplungszeiten von etwa einem Tag stabil und schnell proliferierten. Weitere wichtige Auswahlkriterien waren, dass diese Kulturen alle einen mehr oder weniger frei-schwimmenden sphäroidalen Wachstumsphänotyp zeigten, eine ähnliche mesenchymale/proneurale mRNA-Signatur vom gemischt mesenchymal-proneuralen Typ aufwiesen und ähnlich radiosensitiv waren (Tab. 1). So konnten die Kulturen als biologische Replikate verwendet werden.

Tab. 1. Morphologie, molekulare mesenchymal/proneuralen mRNA-Signatur und Strahlensensitivität $SF_{4\text{ Gy}}$ der in dieser Arbeit verwendeten pGSC-Kulturen (Mittelwerte, $n = 3-12$ für die Signatur und $N = 3$ für die $SF_{4\text{ Gy}}$). Die Signatur- und $SF_{4\text{ Gy}}$ -Werte variieren in der Tübinger pGSC-Kohorte zwischen 0.76 (proneural) und 1.01 (mesenchymal) bzw. 0.025 (radiosensitiv) und 0.37 (radioresistent).

pGSC	LK11	LK28	TA4	TA11	TA16
morphologischer Phänotyp	sphäroid	sphäroid	sphäroid	sphäroid	sphäroid
molekulare mRNA-Signatur	0.86	0.93	0.85	0.92	0.83
Strahlensensitivität $SF_{4\text{ Gy}}$	0.041	0.034	0.083	0.087	0.066

3.2 Das „in-house“ entwickelte TTFields-Applikationssystem appliziert 200 kHz elektrische Wechselfelder unter isoosmotischen und isothermen Bedingungen.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war, ein *in vitro*-TTFields-Applikationssystem zu entwickeln, bei dem im Gegensatz zu dem *in vitro*-System der Firma Novocure (siehe Einleitung) die TTFields-behandelten Zellen nicht gleichzeitig hyperosmolarem Stress ausgesetzt werden. Entscheidend war dabei zu überprüfen, inwieweit die elektrischen Wechselfelder bei klinisch relevanten Feldstärken von 1-3 V/cm (= 2-6 V_{pp}/cm,¹²⁹) die Zellen und das Medium über den von der Firma Novocure postulierten „Joule-Effekt“ aufheizen. Tatsächlich konnten bei dem hier verwendeten TTFields-Applikationssystem in der Test-Zellkulturplatte eine Erwärmung des Mediums im 37°C-Brutschrank selbst bei maximal möglichen TTFields-Feldstärken nicht beobachtet werden (Abb. 11). Damit konnten die Experimente ohne Absenkung der Brutschranktemperatur und der damit verbundenen Erniedrigung des Wasserdampfdrucks im wassergesättigten Brutschrankraum und deswegen ohne resultierende Verdunstung des 37°C warmen Zellkulturmediums durchgeführt werden.

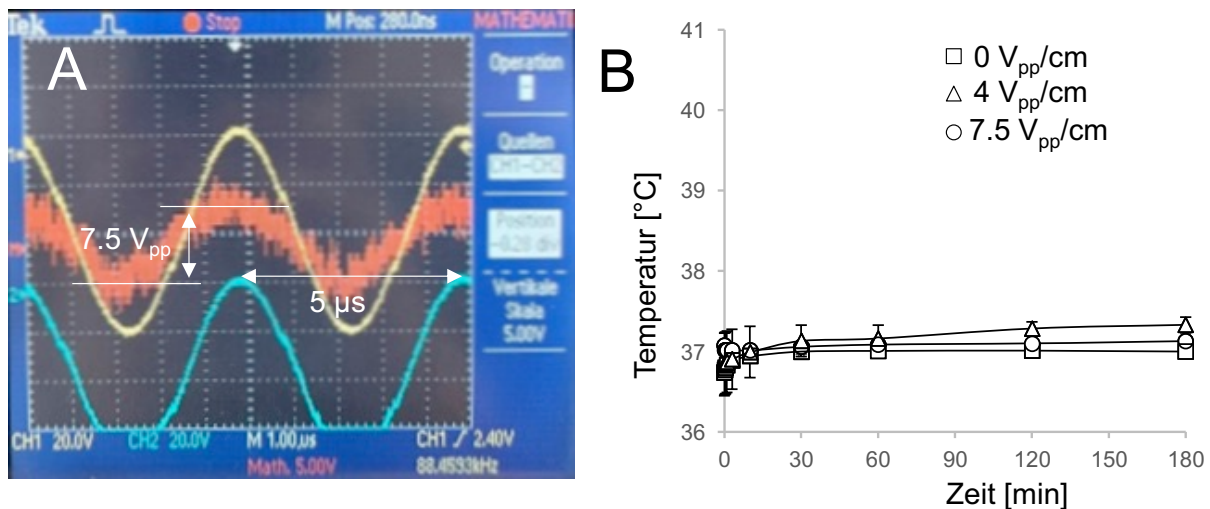


Abb. 11. Der neu entwickelte TTFields-Generator appliziert in Multiloch-Zellkulturplatten elektrische 200 kHz Wechselfelder mit klinisch relevanten Feldstärken ohne dabei das Zellkulturmedium aufzuheizen. **A.** Abfotografierte Oszillographen-Anzeige einer Spannungs-Messung während TTFields-Applikation im 37°C/5% CO₂-Brutschrank. Abgeleitet wurden die Spannungen beider Messelektroden gegen die gemeinsame Masse in blauer und gelber Farbe und die errechnete Differenzspannung in rot (Elektrodenabstand im Medium = 1 cm, Oszillographen-Einstellung 5 V bzw. 1 μs pro Kästchen in y- und x-Achsenrichtung). **B.** Temperaturschwankungen im Zellkultur-Medium (48-Lochplatte im 37°C/5% CO₂-Brutschrank) während Applikation von TTFields (0, 4, bzw. 7,5 V/cm) aufgenommen mit einem Thermister während 3-stündiger Beobachtungszeit. Gezeigt werden Mittelwerte ± SE (N = 4, der initiale Temperaturabfall wurde durch das Öffnen des Brutschranks während des Aufbaus des Applikationssystems verursacht).

3.3 TTFields-Kurzzeitbehandlung erniedrigt das klonogene Überleben und erhöht die Radiosensitivität der pGSC-Kulturen.

Zunächst überprüfte diese Arbeit die bei Glioblastom-Zelllinien beschriebenen tumoriziden und radiosensibilisierenden TTFields-Effekte (siehe Einleitung). Hierzu wurden die 5 pGSC-Kulturen in „pre-plating“ LDA-Experimenten mit 0 bzw. 4 Gy einmalbestrahlt, 24 h TTFields (0 bzw. 5 Vpp/cm) ausgesetzt, dann für weitere 28 Tage kultiviert, um anschließend die Anwachsrate (PE), die normalisierten Anwachsrate und die Überlebensfraktionen (SF_{4 Gy}) zu bestimmen (Abb. 12A-E). Hierbei bestätigte sich die tumoriziden (klonogenitätsvermindernden) Effekte der TTFields (Abb. 12F, links). Im Speziellen veränderten TTFields dabei die Klonogenizität (PE_{TTFields} / PE_{Kontrolle}) von LK11-, LK28-, TA4-, TA11-, und TA16-pGSCs um den Faktor 0.4, 0.7, 0.6, 0.6 bzw. 0.85.

Unerwarteterweise bewirkten die TTFields eine Radioresistenz der pGSC-Kulturen (Abb. 12F, rechts). Hierbei war eine große Variabilität zwischen den 5 pGSC-Kulturen zu beobachten. Der mittlere Effekt auf die Überlebensfraktion (SF_{4 Gy TTFields} / SF_{4 Gy Kontrolle}) lag im Bereich von Werten zwischen 2.1 und 0.95 (Abb. 12G). Die Effekte auf die Klonogenizität (PE_{TTFields} / PE_{Kontrolle}) und auf Überlebensfraktionen (SF_{4 Gy TTFields} / SF_{4 Gy Kontrolle}) korrelierten dabei invers zwischen den individuellen pGSC-Kulturen (Abb. 12G). In der Zusammenfassung ließen sich also die beschriebenen tumoriziden TTFields-Effekte auf Glioblastomzellen bestätigen, nicht aber die radiosensibilisierenden. Zudem zeigte die (über die mesenchymal/proneuralen mRNA-Signatur) ausgewählte vermeintlich homogene pGSC-Kohorte

doch deutliche Unterschiede in ihrem TTFields-Antwortverhalten, bei denen die TA16-Kultur die niedrigsten TTFields-Effekte aufwies (Abb. 12 G).

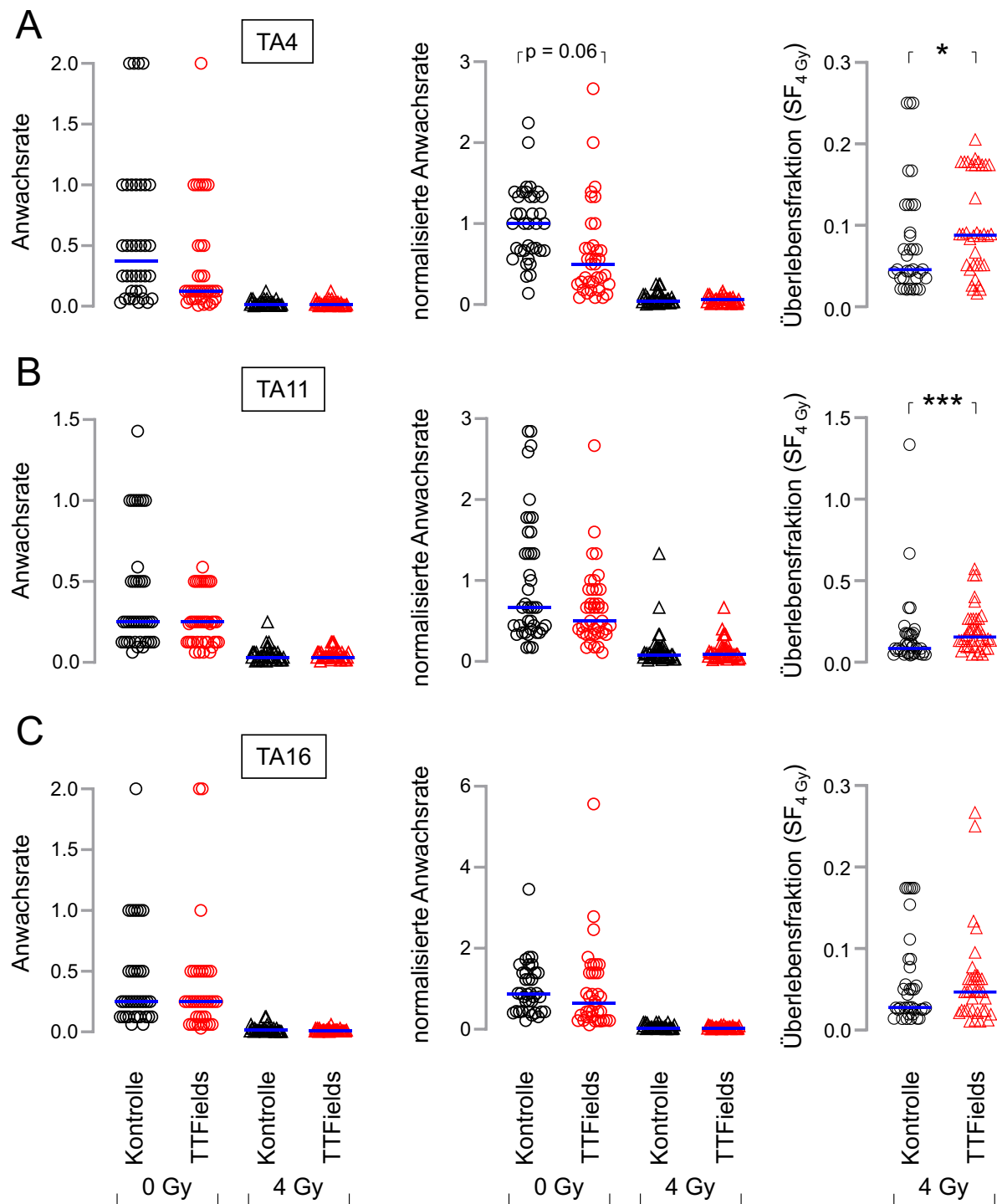


Abb. 12. (Teil 1, Legende, siehe unten)

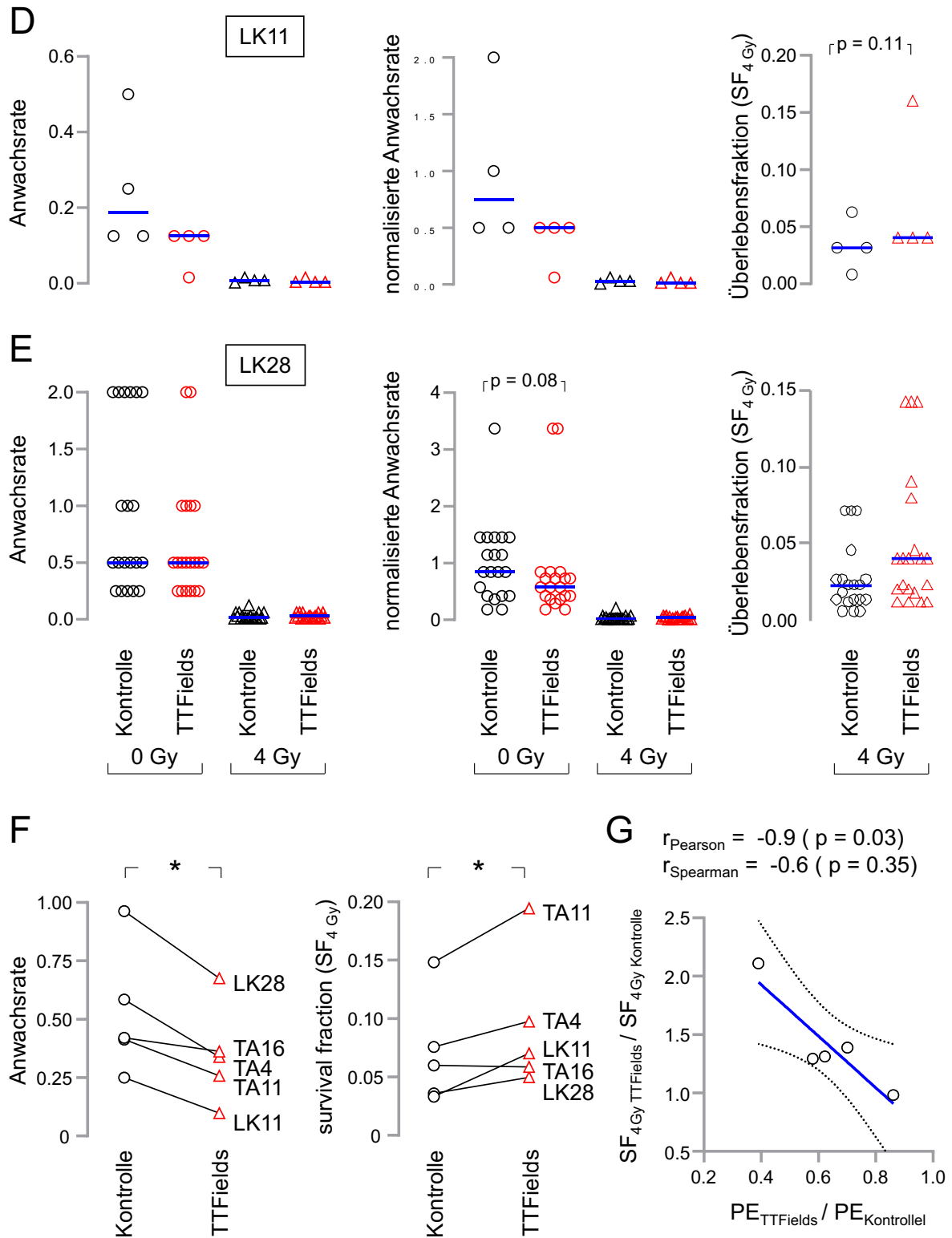


Abb. 12. (Fortsetzung) Kurzzeit (24 h)-TTFields-Behandlung erniedrigt das klonogene Überleben und erhöht die Resistenz gegenüber einer Fraktion von 4 Gy ionisierender Strahlung in patientenstämmigen stammzellenanreichernden Glioblastomkulturen (pGSCs). **A-E.** Anwachsrate (links), normalisierte Anwachsrate (mitte) und 4 Gy-Überlebensfraktionen ($SF_{4\text{ Gy}}$, rechts) von 5 individuelle pGSC-Kulturen (TA4, TA11, TA16, LK11 und LK28 in A, B, C, D bzw. E) unter

Kontrollbedingungen (0 V_{pp}/cm, 0 Gy, schwarze Kreise), nach TTFields-Behandlung (5 V_{pp}/cm, 0 Gy, rote Kreise), nach Bestrahlung (0 V_{pp}/cm, 4 Gy, schwarze Dreiecke), sowie nach kombinierte Bestrahlung und TTFields-Behandlung (5 V_{pp}/cm, 4 Gy, rote Dreiecke). Die pGSC Kulturen wurden für den LDA (Limited dilution assay)-Test in 96-Lochplatten seriell verdünnt (1024 bis 0,5 Zellen pro Loch), für 30 min neoadjuvant TTFields (0 bzw. 5 V_{pp}/cm) ausgesetzt, (schein-) bestrahlt und weitere 24 h adjuvant mit TTFields behandelt. Nach weiteren 28 Tagen Kultur wurde dann die minimale Zellzahl bestimmt, die das Überleben der Kulturen gewährleisten. Dargestellt sind n = 4-40 individuelle Datenpunkte und Mediane (blaue Linien) von N = 1-5 Zellkulturpassagen (* und *** indizieren Irrtumswahrscheinlichkeits- (p-) Werte von $p \leq 0.05$ und $p \leq 0.001$, die wie die weiteren angegebene p-Werte mit Mann-Whitney-Test in (A), (B) und (D) sowie nicht-parametrischer Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Mehrfachvergleich Posthoc-Test in (E) abgeschätzt wurden). **F.** Mittlere Anwachsrate (links) und SF_{4 Gy}-Werte (rechts) der N = 5 pGSC-Kulturen nach 24 h-TTFields-Behandlung mit 0 V/cm (Kontrolle, schwarze Kreise) bzw. 5 V_{pp}/cm (rote Dreiecke, Daten aus (A-E), *: $p \leq 0.05$, gepaarter zweiseitiger t-Test). **G.** Beziehung zwischen den TTFields-Effekten auf mittlere Anwachsrate ($PE_{TTFields} / PE_{control}$) und SF_{4 Gy}-Werten ($SF_{4 Gy TTFields} / SF_{4 Gy control}$) der 5 pGSC-Kulturen (angegeben werden lineare Regression (blaue Linie) und 95% Konfidenzintervall (schwarze Linien) sowie Korrelationskoeffizienten (r) und p-Werte der Pearson- und Spearman Korrelation).

3.4 TTFields-Langzeitbehandlung erniedrigt ebenfalls das klonogene Überleben und erhöht die Radioresistenz von fraktioniert bestrahlten pGSC-Kulturen.

Die derzeit aktive, von der Firma Novocure gesponserte, multizentrische Studie (ClinicalTrials.gov ID NCT04471844) untersucht bei neu diagnostizierten Glioblastompatienten den Effekt von TTFields konkomitant zu der Standard Temozolomid-Strahlentherapie. Glioblastompatienten werden standardmäßig mit 60 Gy in 30 Fraktionen über 6 Wochen bestrahlt. Um einen besseren klinischen Bezug herzustellen, wurden in der vorliegenden Arbeit die pGSC Kulturen über 5 Tage mit der täglichen Standard-Einzelfraktion in der Klinik von 0 bzw. 2 Gy bestrahlt und gleichzeitig mit TTFields (0 bzw. 5 V_{pp}/cm) behandelt. Hierzu wurden die Kulturen TA4, TA11 und TA16 in jeweils 3 unterschiedlichen Passagen verwendet und die unterschiedlichen Passagen aller Kulturen als biologische Replikate gepoolt. Ähnlich der Einzelbestrahlung und TTFields-Kurzzeitbehandlung (Abb. 12), bewirkte TTFields-Behandlung über 5 Tage während der fraktionierten Bestrahlung der pGSC-Kulturen eine Erniedrigung der Klonogenizität und eine Erhöhung der Radioresistenz. Dabei war der tumorizide Effekt bei der Einzelbetrachtung der individuellen Kulturen (Abb. 13A-C, links) nicht statistisch nachweisbar (eine Normalisierung der Daten auf die Kontrollmittelwerte war hier nicht statistisch vorteilhaft), die Radioresistenz-vermittelnde Wirkung dagegen schon (inklusive der bei Kurzzeitbehandlung schlecht ansprechenden TA16-Kultur, Abb. 13A-C, rechts). Numerisch verminderten TTFields im Mittel die PE um Faktor 0,7, 0,7 und 0,8 und erhöhten die SF_{5x2 Gy} um Faktor 2,9, 3,6 und 1,8 in TA4, TA11 bzw. TA16 pGSCs. Wurden dagegen die insgesamt 9 Passagen (Mittelwerte) der 3 pGSC-Kulturen gepoolt betrachtet, so zeigte sich eine signifikante TTFields-vermittelte Erniedrigung der Klonogenität (Abb. 13D, links) und eine signifikante Radioresistenz-Steigerung (Abb. 13D, rechts). Eine induzierte Radioresistenz könnte eine TTFields-vermittelte Verbesserung der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur zugrundeliegen. Um dies zu testen, wurden als nächster Schritt die residuellen nukleären γH2AX-Foci als Surrogat ¹³⁰ nicht-reparierter DNA-DSBs 1h und 24 h nach Einzel-Bestrahlung mit 2 Gy in jeweils 3 Passagen von TA4 und TA11 pGSC-Kulturen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestimmt.

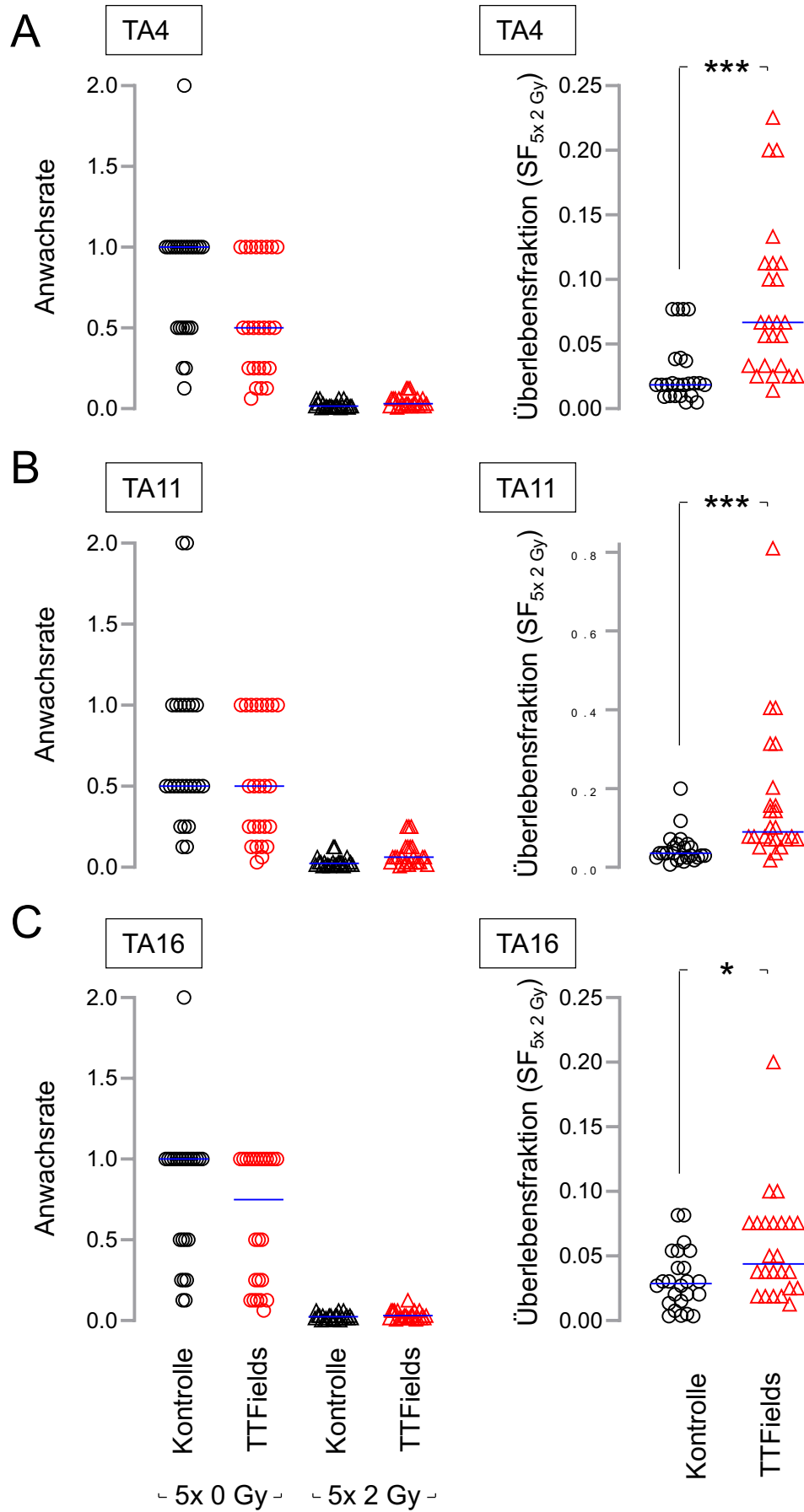


Abb. 13. (Teil 1)

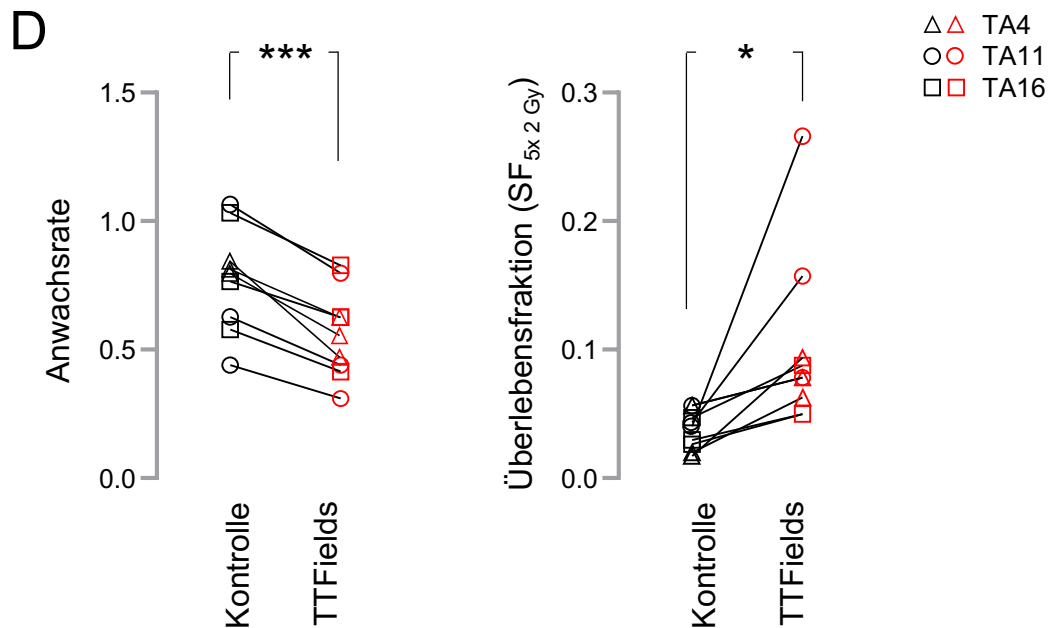


Abb. 13. (Fortsetzung) Langzeit (5x 24 h)-TTFIELDS-Behandlung erniedrigt die Klonogenizität und erhöht die Radioresistenz von konkomitant fraktioniert (5x 2 Gy) bestrahlten pGSC-Kulturen. **A-C.** Anwachsrate (links, und Überlebensfraktionen (SF_{5x2 Gy}, rechts) von 3 individuellen pGSC-Kulturen (TA4, TA11 und TA16 in A, B bzw. C) unter Kontrollbedingungen (0 V_{pp}/cm, 5x 0 Gy, schwarze Kreise), nach 0,5 h + 5x 24 h-TTFIELDS (5 V_{pp}/cm, 5x 0 Gy, rote Kreise), nach fraktionierter Bestrahlung (5x 0 V_{pp}/cm, 5x 2 Gy, schwarze Dreiecke), sowie nach kombinierter TTFIELDS- Behandlung und fraktionierte Bestrahlung (5 V_{pp}/cm, 5x 2 Gy, rote Dreiecke). Die pGSC-Kulturen wurden an 5 aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 0 oder 2 Gy bestrahlt und vor der ersten Strahlenfraktion für 30 min neoadjuvant und nach den Strahlenfraktionen jeweils für 24 h adjuvant mit TTFIELDS (0 oder 5 V_{pp}/cm) behandelt, und nach weiteren 28 Tagen das klonogene Überleben mittels LDA bestimmt. Gezeigt werden n = 24 individuelle Datenpunkte und Mediane (blaue Linien) von N = 3 Zellkultur-Passagen (* und *** indizieren Irrtumswahrscheinlichkeits- (p-) Werte von $p \leq 0.05$ und $p \leq 0.001$, die mit dem Mann-Whitney-Test abgeschätzt wurden). **D.** Mittlere Anwachsrate (links) und SF_{5x2 Gy}-Werte (rechts) von jeweils N = 3 individuellen pGSC-Kulturen mit jeweils 3 Zellkultur-Passagen nach 5x 24 h-TTFIELDS-Behandlung mit 0 V/cm (Kontrolle, schwarze Kreise) bzw. 5 V_{pp}/cm (rote Dreiecke, Daten aus (A-C), * und ***: $p \leq 0.05$ und $p \leq 0.001$, zweiseitiger gepaarter t-Test).

3.5 Kurzzeit-TTFIELDS-Behandlung verbessert die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach 2 Gy-Einmalbestrahlung in TA11 nicht aber in TA4 pGSC-Kulturen.

Strahleninduzierte DNA-DSBs werden mit unterschiedlichen Kinetiken repariert¹³¹. Stark vereinfacht lässt sich eine schnelle Reparatur (innerhalb der ersten Stunde nach Bestrahlung) von gut zugänglichen DSBs im Euchromatin von einer mehreren Stunden anhaltenden, langsamen Reparatur von Heterochromatin-DSBs unterscheiden¹³². Nicht-reparierte residuelle (d.h. nach Ende der DNA-Reparaturphase) DNA-DSBs führen bei Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus zu Chromosomen-Aberrationen und letztendlich in die Mitotische Katastrophe (sofern die geschädigten Zellen nicht schon vorher Zelltodprogramme durchlaufen).

In diesem Projekt konnten 1 h nach Bestrahlung mit 0 bzw 2 Gy im Median in TA4 0 ± 0 bzw $2,5 \pm 1,3$ und in TA11 0 ± 0 bzw. $4,7 \pm 0,3$ nukleäre Foci (Mittelwerte von jeweils 3 Passagen) unter Kontrollbedingungen (ohne TTFields-Behandlung) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Geht man von einer rein physikalischen Induktion von im Größenbereich von 20 DNA-DSBs/pro Zelle und Gy aus ¹³³ könnten diese Daten auf eine bessere basale DNA-DSBs-Reparatur in TA4 verglichen mit TA11-Zellen hindeuten. TTFields-Behandlung (5 V_{pp}/cm) beschleunigte in diesem Projekt die Auflösung der nukleären γH2AX-Foci 24 h nach Bestrahlung in TA11 nicht aber in TA4-Zellen (Abb. 14 und 15), woraus sich eine TTFields-vermittelte Steigerung der DNA-DSB-Reparatur in den TA11-Zellen ableiten lässt.

Neben der DNA-DSB-Reparatur spielt die Zellzykluskontrolle bestrahlter Zellen eine wichtige Rolle für deren Überleben. Radiogener Zellzyklusarrest in verschiedenen Stadien des Zellzyklus stellt die Zeit für die DNA-Reparatur zur Verfügung. Letztendlich wird so das Freisetzen aus dem G₂/M-Arrest in die Mitose mit nicht-reparierten DNA-DSBs mit den oben geschilderten Folgen vermieden. Da radiogene K⁺-Kanal-Aktivierung beschriebenermaßen den G₂/M-Arrest in bestrahlten Glioblastomzellen aufrechterhält (Übersichtsartikel hierzu ¹³⁴) und K⁺-Kanäle in Fischen als molekulare Transducer elektrischer Felder bekannt sind (siehe Einleitung), wurde in dieser Studie auch die Effekte von TTFields auf den Zellzyklus bestrahlter pGSCs untersucht.

3.6 TTFields modifizieren nicht den Zellzyklus unbestrahlter und bestrahlter TA11 pGSC-Kulturen.

Mittels Durchflusszytometrie und Propidiumjodid DNA-Färbung permeabilisierter TA11-pGSCs (Abb. 16A-C) wurde die Zellzyklusverteilung 24 h und 48 h nach Einmalbestrahlung mit 0 bzw. 4 Gy in Abhängigkeit adjuvanter TTFields-Behandlung (0 bzw. 5 V_{pp}/cm für 24 h bzw 48 h) analysiert (Abb. 16D). Dabei zeigten sich weder nach 24 h noch nach 48 h TTFields-Behandlung sowohl bei den unbestrahlten noch bei den bestrahlten Zellen Verschiebungen in der Zellzyklusverteilung, die mit den elektrischen Wechselfeldern assoziiert waren. Bestrahlung induzierte bei den TA11-Zellen einen G₂/M-Arrest (Erniedrigung des G₁- und Erhöhung des G₂-Peaks), der nach 48 h noch nicht aufgehoben war (Abb. 16D). Analoge Experimente an TA4-pGSCs konnten nicht ausgewertet werden, da die TA4-Kultur anscheinend mehrere Zellpopulationen mit unterschiedlichen Chromosomen-Anzahlen beinhaltete und so die Häufigkeitsverteilung des zellulären DNA-Gehalts keine auswertbaren G₁- und G₂-Peaks hervorbrachte (Daten nicht gezeigt). Somit konnte nur in TA11 Zellen eine TTFields-vermittelte Modifikation des radiogenen Zellzyklus-Arrests als (weitere) mögliche Ursache der beobachteten TTFields-induzierten Radioresistenz ausgeschlossen werden.

Auch wenn in dieser Arbeit nicht systematisch untersucht, so konnte im Lichtmikroskop eine TTFields-induzierte Schrumpfung der pGSC-Sphäroide beobachtet werden (Abb. 17A, B). Glioblastom-Zellen verwenden beschriebenermaßen Cl⁻-Ionen als Osmolyt, deren Konzentration die Zellen weit über das elektrochemische Gleichgewicht im Zytosol akkumulieren. Die gleichzeitige Aktivität von Cl⁻ und K⁺-Kanälen in der Plasmamembran führt zum Ausströmen von Cl⁻ und K⁺ entlang deren elektrochemischen Gradienten über die Plasmamembran gefolgt von einem isoosmotischen Efflux von H₂O über Aquaporine und somit zur (lokalen) Zellschrumpfung ¹³⁵. Somit könnte die beobachtete Schrumpfung der pGSC-Sphäroide auf eine TTFields-induzierte Aktivierung von Ionenkanälen hindeuten. Da über diese episodischen Beobachtungen hinausgehend eine Rationale für Ionenkanäle als molekulare Transducer von elektrischen Feldern besteht (siehe Einleitung) untersuchte diese Arbeit im nächsten Schritt mit der Patch-Clamp-Technik direkt die Aktivität von Ionenkanälen in der pGSC-Plasmamembran in Abhängigkeit von TTFields-Einzelzell-Applikation.

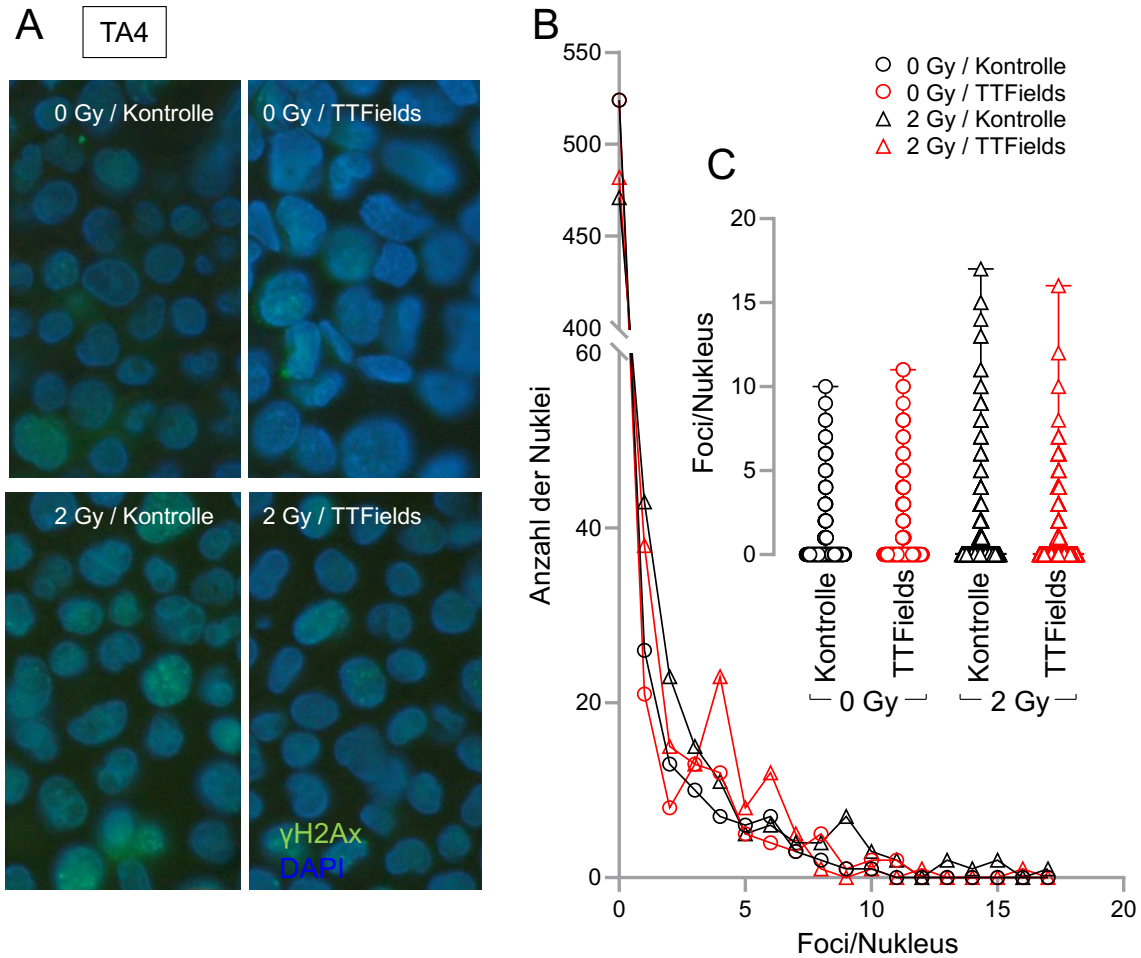


Abb. 14. Neoadjuvante und adjuvante Kurzzeit-TTFields-Behandlung verändert nicht die Anzahl der residualen nukleären γ H2AX-Foci als Surrogat nicht-reparierter DNA-Doppelstrangbrüche in einmalbestrahlten LK4 pGSCs. **A.** Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von fluoreszenzmarkierter γ H2AX-Immunreaktivität (grün) und DNA-spezifischen DAPI-Fluoreszenz (blau) 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy (obere Reihe) bzw. 2 Gy untere (Reihe) und 30 min plus 24 h (neo-)adjuvanter TTFields-Behandlung mit 0 V_{pp}/cm (Kontrolle, linke Spalte) bzw. 5 V_{pp}/cm (rechte Spalte). **B, C.** Häufigkeitsverteilung der Nuklei in Abhängigkeit von der Anzahl residualer γ H2AX-Foci (B) sowie Anzahl der nukleären γ H2AX-Foci (C) 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy (Kreise) bzw. 2 Gy (Dreiecke) und neoadjuvanter und adjuvanter TTFields-Behandlung mit 0 V_{pp}/cm (Kontrolle, schwarze Symbole) bzw. 5 V_{pp}/cm (TTFields, rote Symbole). Dargestellt sind Einzelwerte im Histogramm (B) und Einzelwerte mit Box-Plot (C) von $n = 600$ Nuklei aus $N = 3$ Zellkultur-Passagen.

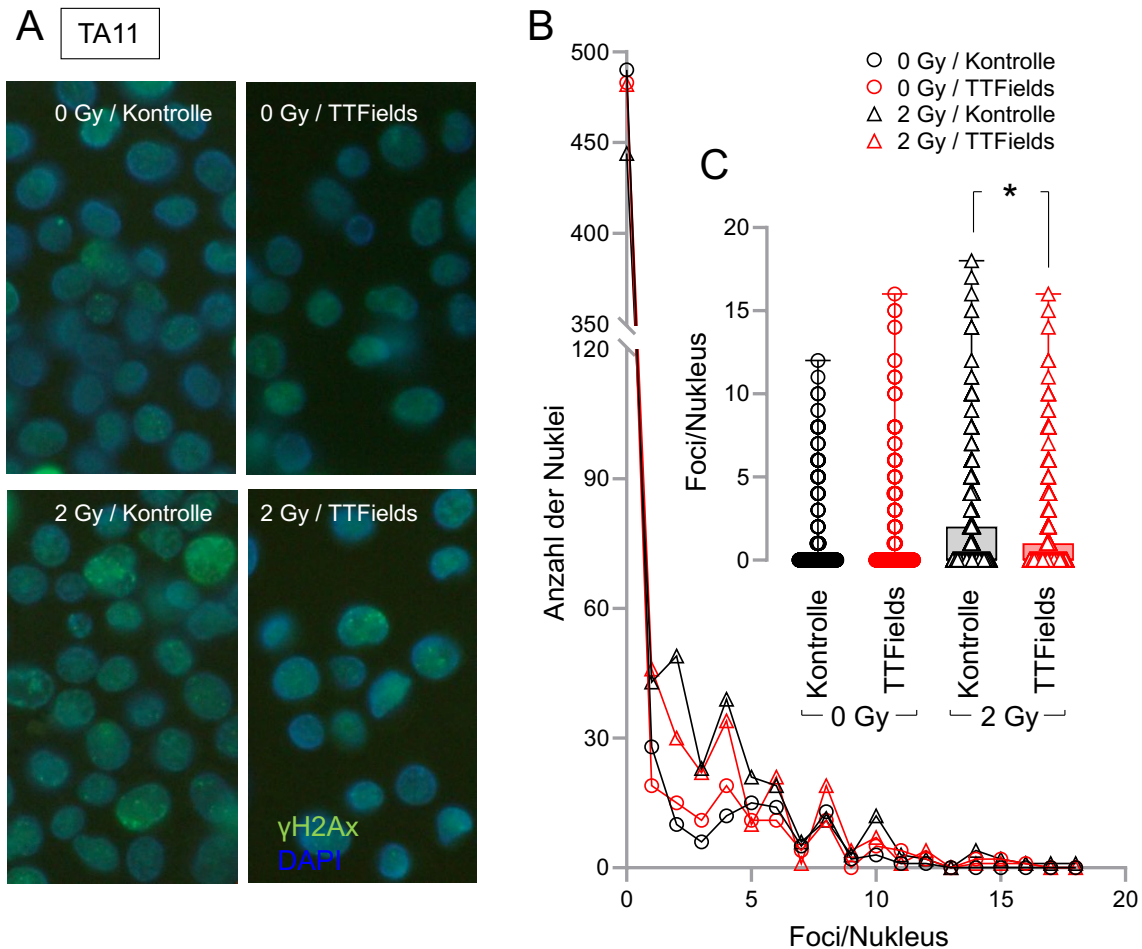


Abb. 15. Neoadjuvante und adjuvante Kurzzeit-TTFields-Behandlung erniedrigt die Anzahl der residualen nukleären γ H2AX-Foci in einmalbestrahlten LK11 pGSCs. **A.** Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von fluoreszenzmarkierter γ H2AX-Immunreaktivität (grün) und DNA-spezifischer DAPI-Fluoreszenz (blau) 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy (obere Reihe) bzw. 2 Gy (untere Reihe) und 30 min plus 24 h (neo-)adjuvanter TTFields-Behandlung mit 0 V_{pp}/cm (Kontrolle, linke Spalte) bzw. 5 V_{pp}/cm (rechte Spalte). **B, C.** Häufigkeitsverteilung der Nuklei in Abhängigkeit von der Anzahl residualer γ H2AX-Foci (B) sowie Anzahl der nukleären γ H2AX-Foci (C) 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy (Kreise) bzw. 2 Gy (Dreiecke) und neoadjuvanter und adjuvanter TTFields-Behandlung mit 0 V_{pp}/cm (Kontrolle, schwarze Symbole) bzw. 5 V_{pp}/cm (TTFields, rote Symbole). Dargestellt sind Einzelwerte im Histogramm (B) und Einzelwerte mit Box-Plot (C) von $n = 600-684$ Nuklei aus $N = 3$ Zellkulturpassagen (*: $p \leq 0.05$, nichtparametrischer Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Mehrfachvergleich Posthoc-Test).

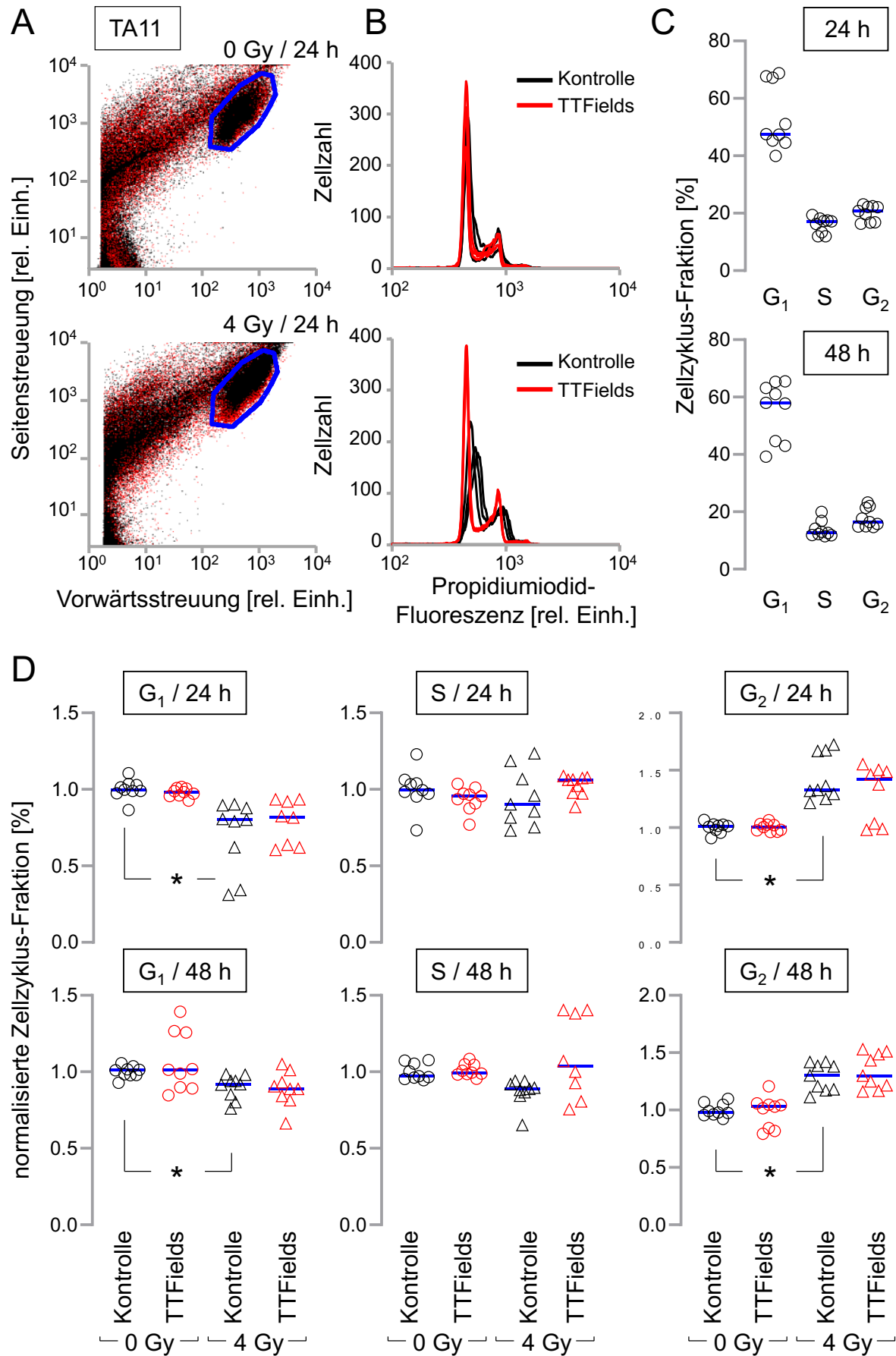


Abb. 16. Die beobachtete verbesserte DNA Doppelstrangreparatur in TTFields-behandelten TA11 pGSCs ist nicht mit einer modifizierten Zellzykluskontrolle assoziiert. **A.** Punktwolke-Diagramm von Seitwärts- und Vorwärtslichtstreuung im Durchflusszytometer von TA11 pGSCs 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy (oben) bzw. 4 Gy (unten). **B.** DNA-mengenabhängige Häufigkeitsverteilung der pGSCs 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy (oben) bzw. 4 Gy (unten) und 30 min plus 24 h (neo-)adjuvanter Behandlung mit TTFields (0 V_{pp}/cm jeweils in schwarz und 5 V_{pp}/cm jeweils in rot). **C.** Verteilung der TA11 pGSCs zwischen G_1 , S und G_2 Zellzyklus-Phase unter Kontrollbedingungen (0 V_{pp}/cm und 0 Gy) nach 24 h (oben) und 48 h (unten) Versuchszeitraum. **D.** Normalisierte TA11 pGSC Fraktionen in G_1 (links), S (mitte) und G_2 (rechts) Zellzyklus-Phase 24 h (oben) bzw. 48 h (unten) nach Bestrahlung mit 0 Gy (Kreise) bzw. 4 Gy (Dreiecke) und 30 min plus 24 h bzw. 48 h (neo-)adjuvanter TTFields-Behandlung mit 0 V_{pp}/cm (Kontrolle, schwarze Symbole) bzw. 5 V_{pp}/cm (TTFields, rote Symbole). Dargestellt sind $n = 9$ Einzelwerte von $N = 3$ Zellkultur-Passagen und Mediane (blaue Linie, (*: $p \leq 0.05$, Bonferroni-korrigierter Welch t-Test).

3.7 TTFields aktivieren einwärtsrektifizierende, TRAM-34-sensitive und K^+ -selektive IK_{Ca} -Kanäle in der Plasmamembran von TA4- und TA11-pGSCs.

Zunächst wurde in der Spannungsklemme im on-cell- (cell-attached)-Modus mit einer NaCl reichen physiologisch eingestellten Extrazellulärlösung in Superfusat und in der Ableitpipette Plasmamembranströme von TA4-pGSCs aufgezeichnet. Beim on-cell-Modus bleiben die Zellen intakt. Die Klemmspannung und das physiologische Membranpotenzial der Zelle addieren sich (Abb. 17C). Analysiert wurden nicht Einzelkanal-Ereignisse, sondern die makroskopischen Ströme, also der Gesamtstrom über den in die Ableitpipette eingesaugten und so elektrisch isolierten Membranfleck (Patch). TTFields im Minutenbereich stimulierten in TA4 pGSCs makroskopische on-cell-Ströme (Abb. 17D-G), deren Umkehrpotenzial (V_{rev} , Klemmspannung bei der die Stromrichtung sich umkehrt) im negativen Klemmspannungsbereich lag (Abb. 17E, F; die TTFields-spezifische Stromfraktion errechnet sich aus der Subtraktion der beiden dargestellten Kurven) und im Mittel $V_{rev} \approx -35$ mV betrug (Abb. 17F). Nimmt man nun ein negatives physiologisches Membranpotenzial, das die Zellen in physiologischer NaCl-Superfusatlösung normalerweise aufbauen, im Bereich von $V_{rev} \approx -40$ mV im Mittel an ¹³⁶, so würde das tatsächliche Umkehrpotenzial des TTFields-induzierten Stroms im Mittel bei -75 mV und somit im Bereich des elektrochemischen Gleichgewichtspotenzials für K^+ (E_K , geschätzt -85 mV) liegen.

Die daraus abgeleitete K^+ -Selektivität des TTFields-stimulierten Stroms ließ sich auch pharmakologisch untermauern. Wie Abbildung 18 zeigt, inhibierte der IK_{Ca} K^+ -Kanal Blocker TRAM-34 den durch elektrische Wechselfelder aktivierten Strom reversibel. In dieser Stromableitung lag das V_{rev} des TTFields-stimulierten Stroms (Abb. 18D) nahe 0 mV Klemmspannung. Dieser Umstand wäre hier über ein durch K^+ -Kanal-Aktivierung auf das E_K hyperpolarisiertes physiologisches Membranpotenzial erklärbar (je negativer das physiologische Membranpotenzial ist, desto weniger negativ muss die Klemmspannung sein, um E_K zu erreichen).

Ähnlich TA4 wurden auch in TA11-pGSCs makroskopische on-cell Ströme durch die Plasmamembran aktiviert (Abb. 19), die wiederum bei negativen Klemmspannungen (gemitteltes $V_{rev} \approx -25$ mV, Abb. 19C) ihr V_{rev} zeigten und durch TRAM-34 blockierbar waren (Abb. 20). Die TRAM-34-sensitiven Stromfraktionen (Abb. 18D und 20D) wie auch die TTFields-aktivierte Stromfraktion (Abb. 17F und 19C) rektifizierten (gleichrichteten) einwärts (i.e., die Steigung der Strom-Spannungsbeziehung der nach unten angetragenen Einwärtsströme übersteigt die der nach oben angetragenen Auswärtsströme). Zusammengefasst lassen diese Daten auf eine TTFields-induzierte Aktivierung von TRAM-34-sensitiven, einwärtsrektifizierenden K^+ -selektiven IK_{Ca} -K-Kanälen schließen.

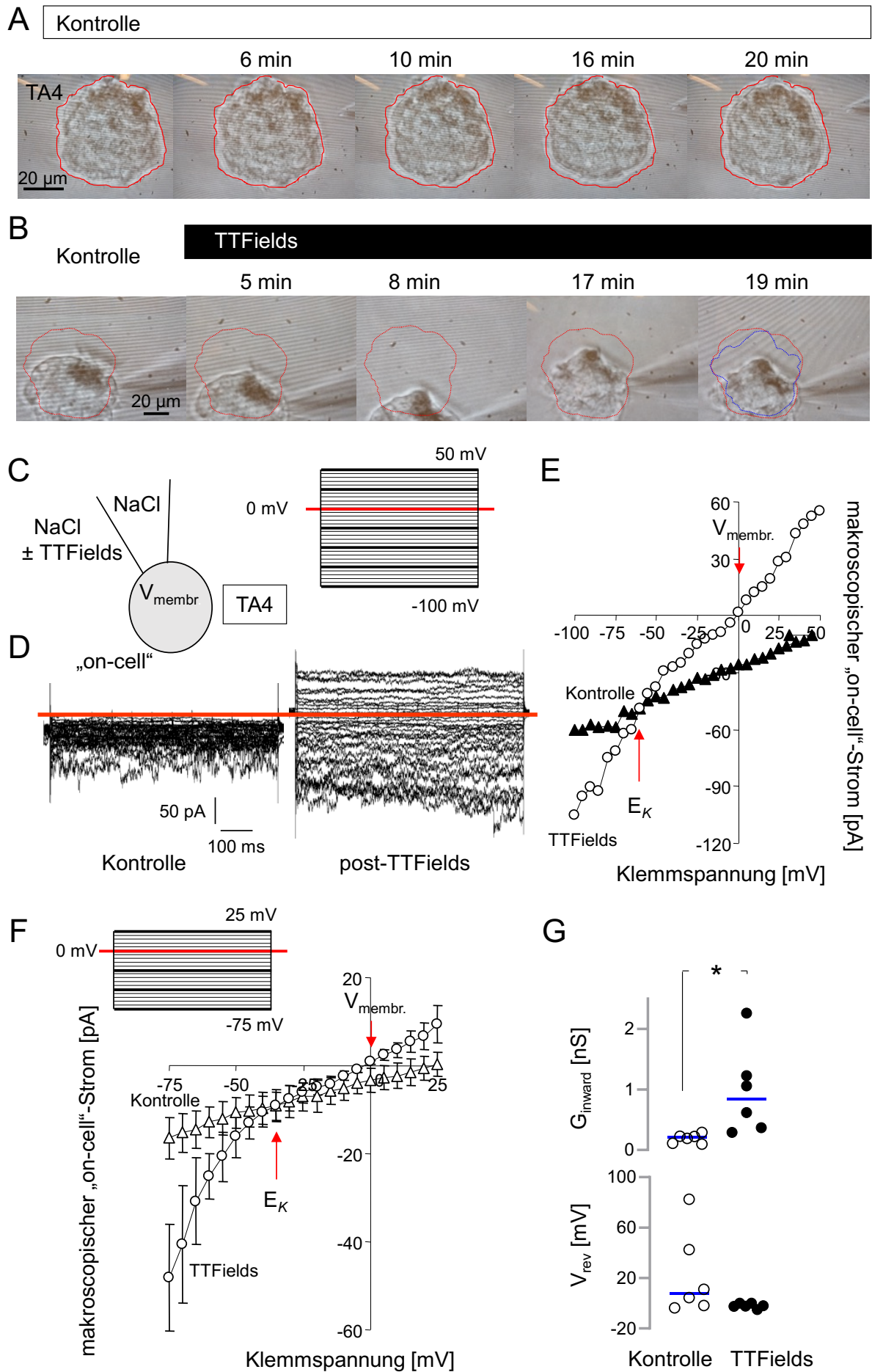


Abb. 17. TTFields induzieren in TA4 pGSCs Zellschrumpfung und erhöhen die K^+ -Leitfähigkeit der Plasmamembran. **A, B.** Zeitabhängige Sequenz lichtmikroskopischer Aufnahmen von je einem TA4-Sphäroid unter Kontroll-Bedingungen (A), sowie (B) vor (Kontrolle) und zu verschiedenen Zeiten nach Applikation von TTFields ($5 V_{pp}/cm$ für 1 min). In den Aufnahmen ist der Umriss der initialen Sphäroid-Fläche blau (oben) bzw. rot (unten) eingezeichnet. **C.** Konfiguration für das Ableiten von makroskopischen on-cell (cell-attached)-Strömen durch die Plasmamembran in der Patch-Clamp Spannungsklemme. Die Ströme wurden mithilfe von NaCl-reicher Pipetten- und Bad-Lösung und einem Rechteckpuls-Protokoll von Klemmspannungen zwischen maximal -100 mV und + 50 mV in 5 mV Schritten aufgezeichnet. **D, E.** Original makroskopische on-cell-Ströme (die Ströme der einzelnen Spannungssprünge sind übereinander gelagert dargestellt) einer TA4 pGSC-Zelle vor (Kontrolle, links) und nach TTFields-Applikation ($5 V_{pp}/cm$ für 0.5 min, rechts) (D) und (E) dazugehörige Strom-Spannungsbeziehungen (Kontrolle: Dreiecke, TTFields: Kreise). Zu beachten ist, dass sich die beiden Kurven bei einer sehr negativen Klemmspannung schneiden (Schnittpunkt = Strom-Umkehrpotenzial, V_{rev}). Zu der V_{rev} -Klemmspannung des TTFields-induzierten Stroms addiert sich noch das Membranpotenzial (V_{membr}) der Zelle, welches unter dieser Ableitkonfiguration nicht beeinflusst wird. Somit kann von einem tatsächlichen (i.e., an der Plasmamembran-anliegenden) V_{rev} des TTFields-induzierten Stroms im Bereich des elektrochemischen K^+ -Gleichgewichtspotenzials (E_K) ausgegangen werden. Letzteres lässt sich aufgrund der niedrigen K^+ -Konzentration in der verwendeten NaCl-Extrazellulär-Lösung und der natürlicherweise hohen K^+ -Konzentration im Zytosol von Glioblastomzellen im Bereich von -80 bis -90 mV verorten. **F.** Beziehung von gemittelten ($\pm SE$) makroskopischen on-cell-Strömen (abgeleitet wie in (C-E)) und Klemmspannung (Bereich von -75 mV bis +25 mV) von $N = 6$ TA4 pGSC Zellen vor (Kontrolle, geschlossene Dreiecke) und nach TTFields-Applikation (0.5-20 min, offene Kreise). **G.** Leitfähigkeiten des spannungsgeklemmten Membranflecks (oben) und Umkehrpotenziale (V_{revs}) der makroskopischen on-cell-Ströme (unten) vor (offene Kreise) und nach TTFields-Applikation (geschlossene Kreise). Gezeigt werden individuellen Daten aus (F). Die Leitfähigkeit G_{inward} wurde für die Einwärtsströme im Klemmspannungsbereich von -75 mV bis -35 mV durch lineare Regression berechnet (*: $p \leq 0.05$, zweiseitiger Welch-korrigierter t-Test).

Um nun die funktionelle Signifikanz einer TTFields-vermittelte IK_{Ca} -Kanal-Aktivierung für die beobachtete tumorizide und Radioresistenz-vermittelnde TTFields-Wirkung in den pGSCs zu definieren, wurden klonogenes Überleben und Radioresistenz der-pGSCs in Abhängigkeit von TTFields-Kurzzeit-Behandlung, Einmal-Bestrahlung und konkomitante pharmakologische IK_{Ca} -Blockade durchgeführt.

3.8 IK_{Ca} -Blockade durch TRAM-34 verbessert die tumorizide TTFields-Wirkung in TA11- und TA16- und verringert den Radioresistenz-vermittelnden TTFields-Effekt in TA4-pGSCs.

Hierzu wurden wiederum in preplated LDAs jeweils 3 Passagen von TA4-, TA11- und TA16-pGSCs in An- und Abwesenheit von TRAM-34 mit 4 Gy bestrahlt, 30 min neo- und 24 h adjuvant mit TTFields (0 bzw. $5 V_{pp}/cm$) behandelt und nach 28 Tagen die Anwachsrate (PE) und Überlebensfraktionen (SF_{4Gy}) bestimmt. In den DMSO-Vehikel-Kontrollen (Abb. 21A, B, offene Symbole) zeichnete sich zumindest numerisch (wegen der geringeren Anzahl der Replikate wurde statistische Signifikanz oft nicht erreicht) ein ähnliches Bild wie in den initialen TTFields-Kurzzeit-Behandlungsexperimenten (siehe Abb. 12A, mitte und rechts): TTFields verringerte die normalisierte PE in TA4 und TA11 nicht aber in TA 16 (Abb. 21A, links, offene Symbole) und erhöhte die SF_{4Gy} in TA4, in TA11 und – im Gegensatz zu den initialen Experimenten – auch in TA16 pGSC.

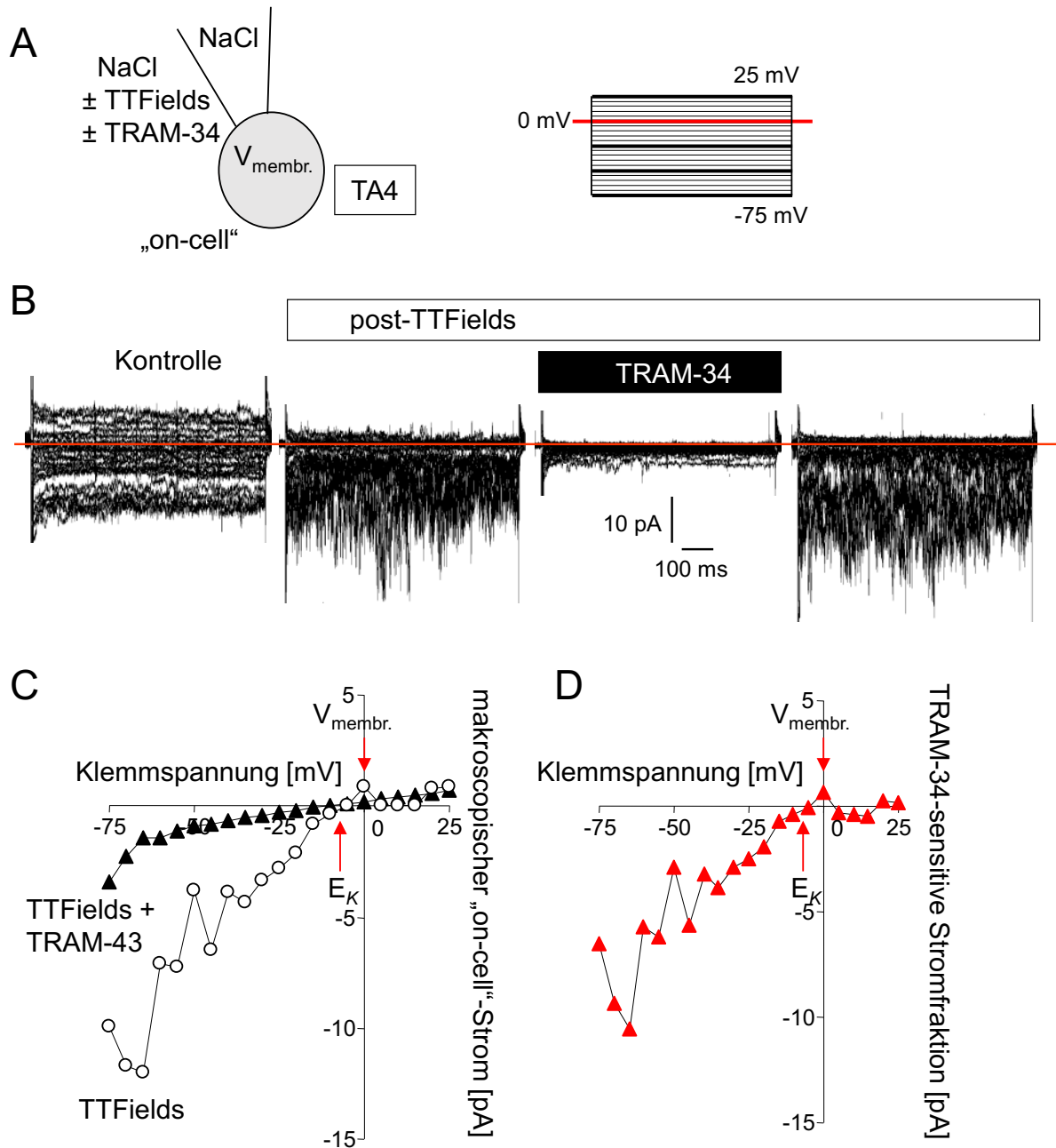


Abb. 18. Die TTFIELDS-induzierte K^+ -Leitfähigkeit in der Plasmamembran von TA4 pGSC-Zellen beinhaltet TRAM-34-sensitive einwärtsrektifizierende K^+ Kanäle. **A, B.** On-cell Ableitkonfiguration (A) und (B) original Ableitungen der makroskopischen on-cell Ströme einer TA4 pGSC-Zelle vor (Kontrolle, erste Stromspuren) und nach Applikation von TTFIELDS (5 mV_{pp}/cm für 20 min, zweite Stromspuren), sowie Ein- (dritte Stromspuren) und Auswaschen (vierte Stromspuren) des IK_{Ca} K^+ -Kanal-spezifischen Blockers TRAM-34 (200 nM) in der Badlösung. **C, D.** Dazugehörige Strom-Spannungsbeziehungen nach TTFIELDS-Applikation (Kreise) und Einwaschen von TRAM-34 (Dreiecke) in (C) und der durch Subtraktion der beiden Kurven errechneten TRAM-34-sensitive Stromfraktion in (D). Zu beachten ist die einwärtsrektifizierende (i.e., einwärtsgleichrichtende, negative Einwärtsströme > positive Auswärtsströme) Form dieser Strom-Spannungsbeziehung.

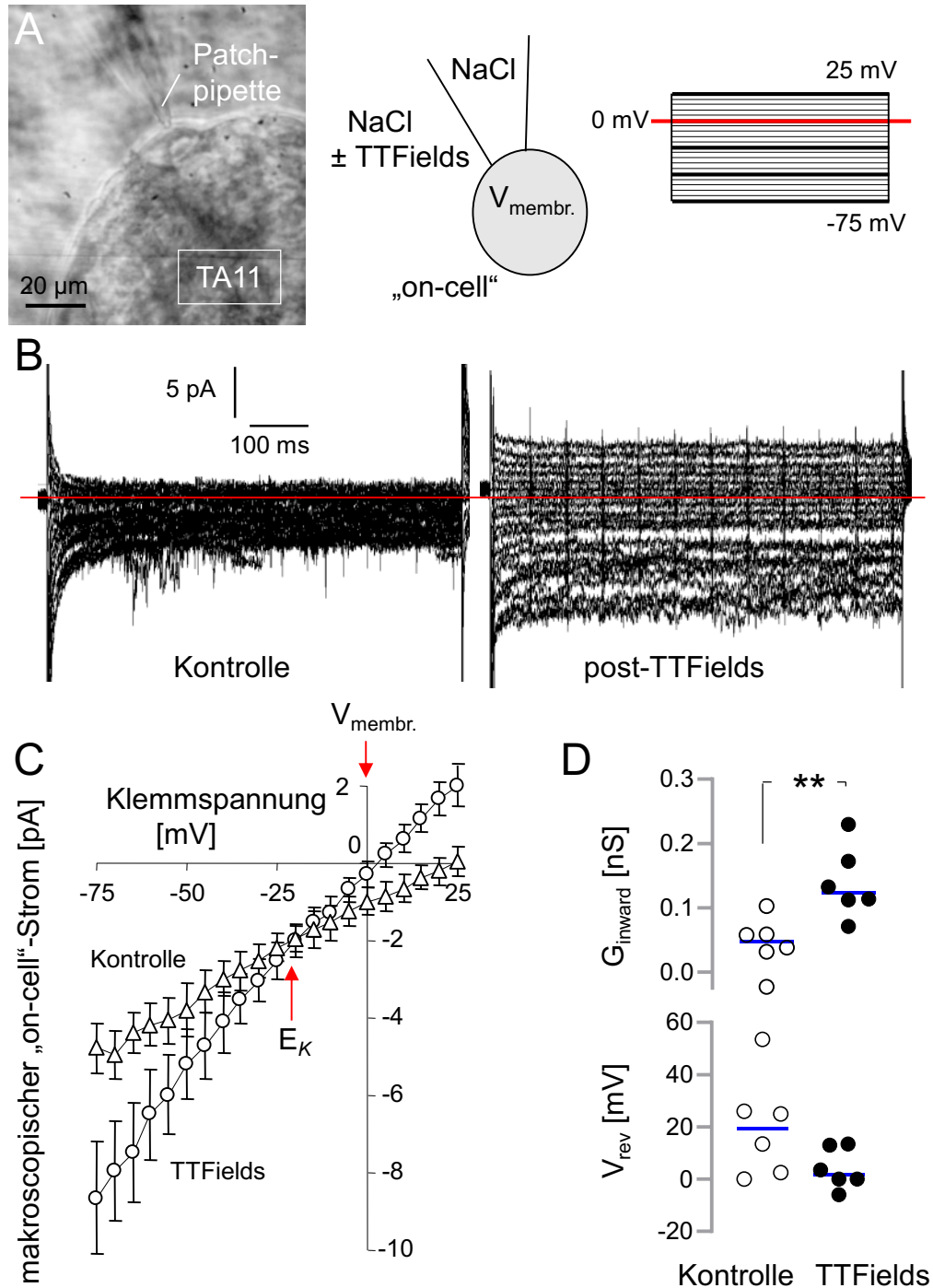


Abb. 19. TTFIELDS erhöhen in TA11 pGSCs ebenfalls die K^+ -Leitfähigkeit der Plasmamembran. **A.** Lichtmikroskopie eines TA11 Spheroids während Patch-Clamp-Ableitung (links) und on-cell Ableitkonfiguration (mitte und rechts) **B, C.** Original makroskopische on-cell-Ströme einer TA11 pGSC-Zelle vor (Kontrolle, links) und nach TTFIELDS-Applikation (5 V_{pp}/cm für 1.5-23 min, rechts) (**B**) und (**C**) dazugehörige Strom-Spannungsbeziehungen (Kontrolle: Dreiecke, TTFIELDS: Kreise). **D.** Leitfähigkeiten des spannungsgeklammten Membranflecks (oben) und Umkehrpotenziale (V_{rev} s) der makroskopischen on-cell-Ströme (unten) vor (offene Kreise) und nach TTFIELDS-Applikation (geschlossene Kreise). Gezeigt werden individuellen Daten aus (**C**). Die Leitfähigkeit G_{inward} wurde für die Einwärtsströme im Klemmspannungsbereich von -75 mV bis -50 mV durch lineare Regression berechnet (**: $p \leq 0.01$, zweiseitiger t-Test).

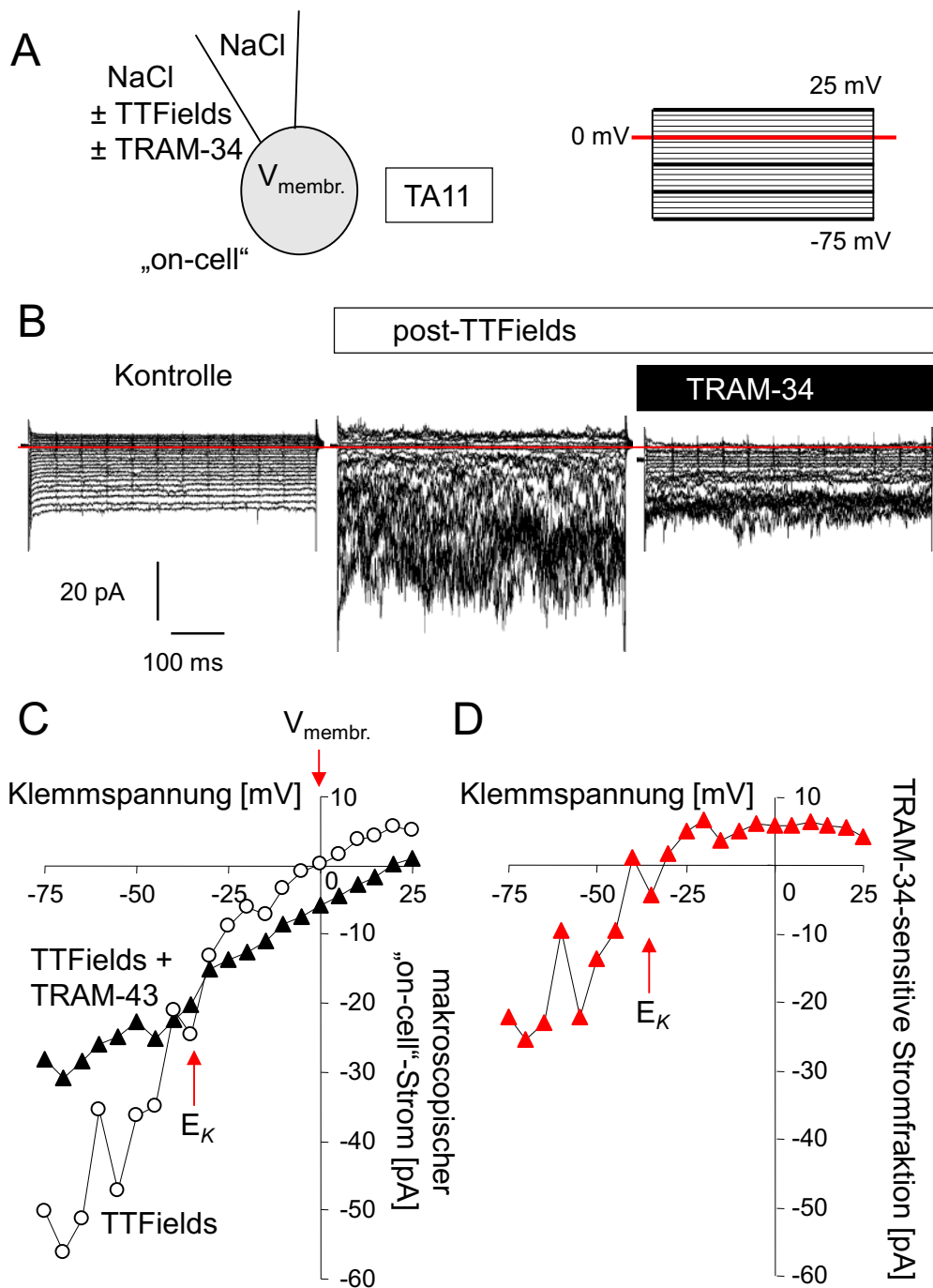


Abb. 20. Die TTFIELDS-induzierte K^+ -Leitfähigkeit in der Plasmamembran von TA11 pGSC-Zellen beinhaltet ebenfalls TRAM-34-sensitive einwärtsrektifizierende K^+ Kanäle. **A, B.** On-cell Ableitkonfiguration (**A**) und (**B**) original Ableitungen der makroskopischen on-cell Ströme einer TA4 pGSC-Zelle vor (Kontrolle, erste Stromspuren) und nach Applikation von TTFIELDS (5 mV_{pp}/cm, zweite Stromspuren), sowie Einwaschen (dritte Stromspuren) des IK_{Ca} K^+ -Kanal-spezifischen Blockers TRAM-34 (200 nM) in der Badlösung. **C, D.** Dazugehörige Strom-Spannungsbeziehungen nach TTFIELDS Applikation (Kreise) und Einwaschen von TRAM-34 (Dreiecke) in (**C**) und der durch Subtraktion der beiden Kurven errechneten TRAM-34-sensitive Stromfraktion in (**D**). Wiederum zeigt die TRAM-34-sensitive Strom-Fraktion eine deutliche einwärts-rektifizierende Strom-Spannungsbeziehung.

Der IK_{Ca} -Inhibitor TRAM-34 alleine erniedrigte zumindest numerisch (statistische Signifikanz wurde nicht erreicht) in TA4 nicht aber in TA11 und TA16 die basalen normalisierten Anwachsrate (Abb. 21A, links schwarze Symbole) und in TA11 und TA16 nicht aber in TA4 die normalisierten Anwachsrate nach Bestrahlung (Abb. 21, rechts, schwarze Symbole). Auffällig war, dass TRAM-34 alleine die $SF_{4\text{ Gy}}$ -Werte, also die Radioresistenz in TA4 pGSCs (wiederum nur numerisch) erhöhte, während der Inhibitor diese in TA11 und TA16 numerisch erniedrigte (Abb. 21B, schwarze Symbole).

In Gegenwart von TRAM-34 (Abb. 21A, B, geschlossene Symbole) bewirkten die TTFields im Gegensatz zu der Vehikel-Kontrolle eine statistisch signifikante Reduktion der normalisierten PE in TA11 und TA16 pGSCs (Abb. 21A, Mitte und unten links, geschlossene Symbole). Zudem wurde durch TRAM-34 die in TA4 und TA16 statistisch signifikante TTFields-induzierte $SF_{4\text{ Gy}}$ -Erhöhung abgeschwächt (Abb. 21B, oben und unten, geschlossene Symbole). Werden nun die tumoriziden und Radioresistenz-vermittelnde TTFields-Effekte direkt zwischen DMSO-Vehikel-Kontrolle und TRAM-34-Behandlung verglichen, zeigt sich, dass TRAM-34 den tumoriziden TTFields-Effekt in TA11 und TA16 verstärkte (Abb. 21C, links-mitte und links-unten) und die Radioresistenz-vermittelnde Wirkung in TA4 erniedrigte (Abb. 21D, oben). Dies deutet auf eine duale Rolle von IK_{Ca} , nämlich auf eine TTFields-Resistenz-vermittelnde und gleichzeitig eine Radioresistenz-stimulierende Funktion des K^+ -Kanals – allerdings unter dem Vorbehalt der IK_{Ca} -Spezifität von TRAM-34.

Um Letztere zu testen, regulierten wir im nächsten Schritt IK_{Ca} mittels *KCNN4*-spezifischer siRNA in TA4 pGSCs herunter. Das Ausmaß des IK_{Ca} Knockdowns wurde dabei auf funktioneller Ebene mittels Patch-Clamp on-cell-Ableitungen bestimmt.

3.9 *KCNN4* RNA-Interferenz erniedrigt die funktionelle Expression von IK_{Ca} -Kanälen in der Plasmamembran von TA4 pGSCs.

Die makroskopischen on-cell Ströme wurden diesmal mit einer KCl-reichen Pipettenlösung auf der Oberfläche von TA4 Sphäroiden (NaCl-reiches Superfusat) 48-72 h nach reverser Transfektion mit *KCNN4* siRNA bzw. nicht-kodierender Kontroll-ntRNA (Abb. 22A) abgeleitet. Eine hohe K^+ -Konzentration in der Pipettenlösung wurde deswegen gewählt, da dies höhere Einwärtsströme (i.e. Kationen-Fluss in die bzw. Anionen-Fluss aus der Zelle) durch insbesondere einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle bedingt. K^+ -Netto-Einwärtsströme werden durch Membranspannungen (resultierend aus physiologischen Membranpotential plus Klemmspannung) angetrieben, die negativer als E_K liegen ($E_K \approx 0\text{ mV}$ bei physiologischerweise hohen zytosolischen K^+ -Konzentrationen und hoher K^+ -Konzentration in der Ableitpipette).

Öffnen der IK_{Ca} -Kanäle durch den spezifischen Kanalöffner 1-EBIO verursachte in ntRNA-Kontrollzellen (Abb. 22B, oben) und auch in den *KCNN4* siRNA-behandelten Zellen (Abb. 22B, unten) eine Vergrößerung insbesondere der Einwärtsströme, die reversibel durch zusätzliche Applikation von TRAM-34 gehemmt wurden. Der Vergleich der Strom-Spannungs-Kurven unter Kontroll-, 1-EBIO-, und 1-EBIO/TRAM-34-Bedingungen zwischen den ntRNA- und *KCNN4* siRNA-behandelten TA4-Zellen (Abb. 22C) zeigte basale TRAM-34-sensitive makroskopische Ströme unter beiden Transfektionsbedingungen sowie höhere 1-EBIO-aktivierte (und TRAM-34 blockierte) Einwärtsströme in ntRNA- versus siRNA-transfizierten Zellen. Letzteres wurde auch ersichtlich aus den berechneten TRAM-34-sensitiven Stromfraktionen (Abb. 22D) und den daraus für die Einwärtsströme abgeleiteten Leitfähigkeiten (Abb. 22E). Aus den Leitfähigkeiten ließ sich auch erkennen, dass im Median der *KCNN4*-Knockdown die Oberflächenexpression von 1-EBIO-aktivierbaren IK_{Ca} -Kanälen um mehr als die Hälfte reduzierte, so dass es Sinn machte, die Auswirkungen des *KCNN4* Knockdown auf die TTFields-Effekte in TA4-pGSCs zu untersuchen.

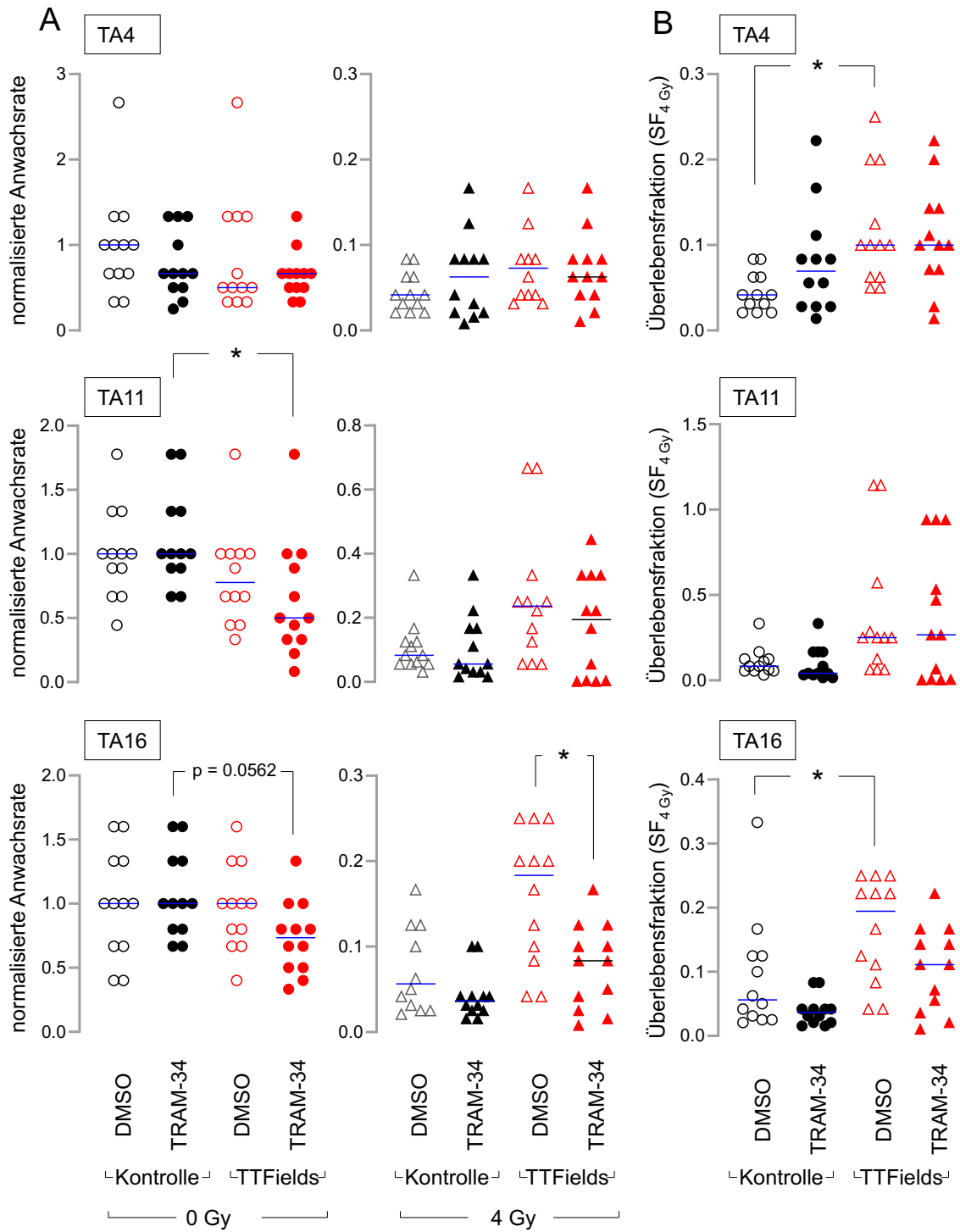


Abb. 21. (Teil 1)

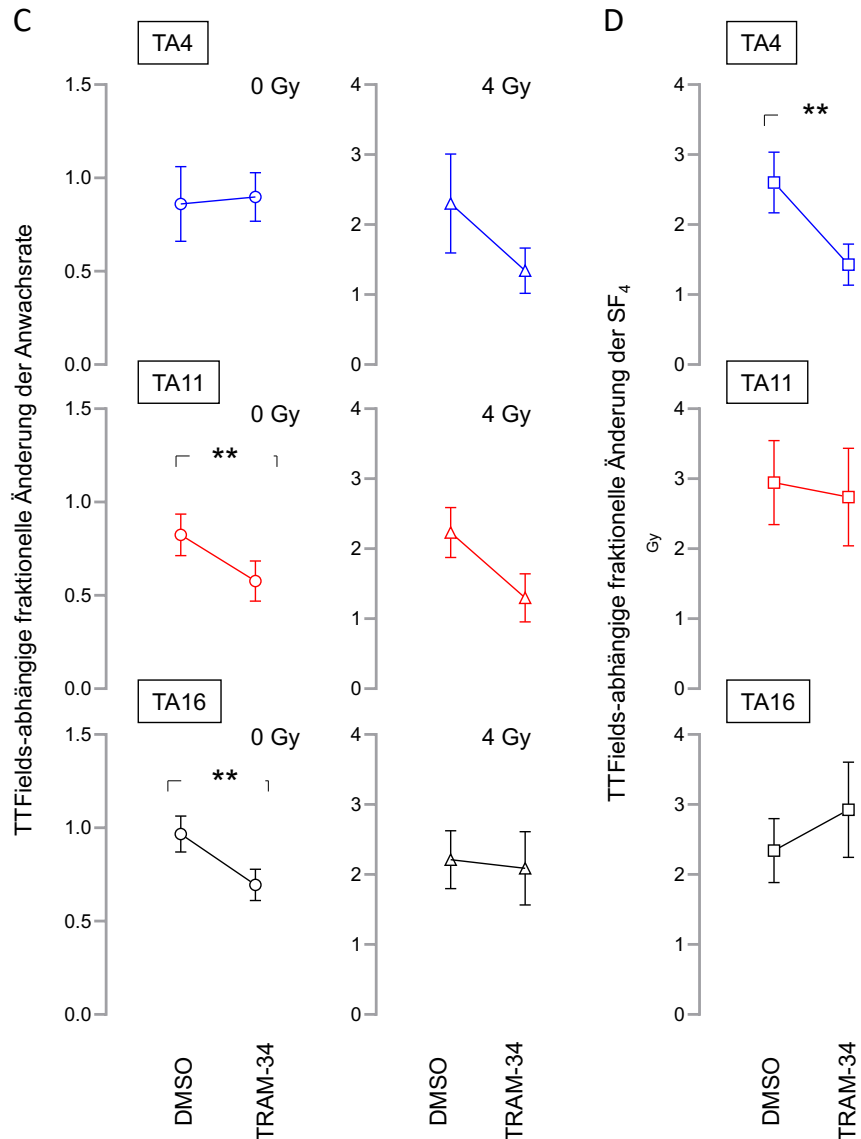


Abb. 21. (Fortsetzung) Der IK_{Ca} K^+ -Kanal-Blocker TRAM-34 verstärkt in TA11 und TA16 die tumoriziden und erniedrigt in TA4 pGSCs die Radioresistenz-induzierenden TTFIELDS-Effekte. **A, B.** Normalisierte Anwachsrate (A) und 4 Gy-Überlebensfraktionen (SF_{4Gy}) (B) von TA4 (obere Reihe), TA11 (mittlere Reihe) und TA16 (untere Reihe) pGSCs. Die Kulturen wurden unter Kontroll-Bedingungen (0 V_{pp}/cm , 0 Gy, schwarze Kreise), oder für 30 min plus 24 h unter (neo-)adjuvanter TTFIELDS-Behandlung (5 V_{pp}/cm , 0 Gy, rote Kreise), oder für 24 h nach 4 Gy Einmalbestrahlung (0 V_{pp}/cm , 4 Gy, schwarze Dreiecke), sowie für 24 h nach 4 Gy kombiniert mit 30 min plus 24 h (neo-)adjuvanter-TTFIELDS-Behandlung (5 V_{pp}/cm , 4 Gy, rote Dreiecke) kultiviert. Diese Experimente wurden zudem in Ab- (DMSO-Vehikel-Kontrolle, offene Symbole) und Anwesenheit des IK_{Ca} K^+ -Kanalblockers TRAM-34 (5 μM , geschlossene Symbole) durchgeführt und das klonogene Überleben nach 28 Tagen weiterer Kultur ohne Medienwechsel mittels LDA erfasst. **C, D.** Aus (A, B) errechnete fraktionale TTFIELDS-abhängige Veränderung der Anwachsrate in unbestrahlten (links) und 4 Gy-bestrahlten (rechts) TA4 (blaue Symbole, oben), TA11 (rote Symbole, mitte) und TA16 (schwarze Symbole, unten) pGSCs (C) sowie deren 4 Gy-Überlebensfraktionen (SF_{4Gy}) (D) in Ab- (DMSO) und Anwesenheit von TRAM-34. Gezeigt werden individuelle Datenpunkte ($n = 12$, $N = 3$) und Mediane (blaue Linien) in (A, B) und in (C, D) Mittelwerte $\pm$ SE (*: $p \leq 0.05$, nicht parametrischer Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Mehrfachvergleich Posthoc-Test in (A, B) und zweiseitiger gepaarter t-Test in (C, D)).

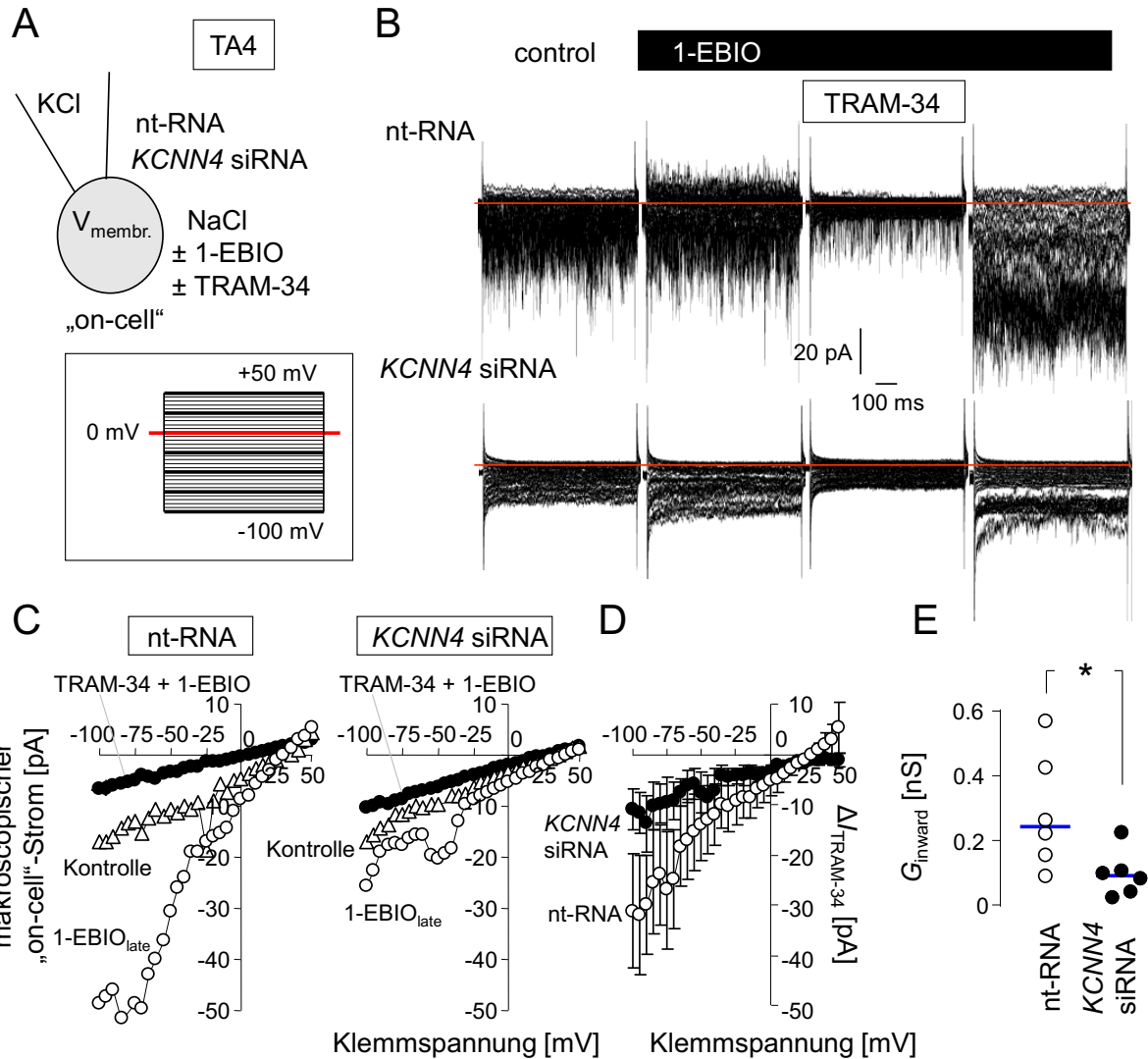


Abb. 22. KCNN4-Knockdown erniedrigt die 1-EBIO-aktivierbare, TRAM-34-sensitve Leitfähigkeit in der Plasmamembran von TA4 pGSCs. **A, B.** On-cell Ableitkonfiguration (A), und (B) original Ableitungen der makroskopischen on-cell Ströme einer ntRNA- (oben) und einer KCNN4 siRNA-behandelten (unten) TA4 pGSC-Zelle vor (Kontrolle, erste Stromspuren) und nach Bad-Applikation des IK_{Ca} K^+ -Kanal-Aktivators 1-EBIO (500 μ M, zweite bis vierte Stromspuren) sowie nach zusätzlichem Ein- (dritte Stromspuren) und Auswaschen (vierte Stromspuren) des IK_{Ca} K^+ -Kanal-Blockers TRAM-34 (200 nM). Die Zellen wurden entweder für 48-72 h mit non-targeting (nt)-RNA (obere Reihe) oder KCNN4 siRNA (untere Reihe) vorbehandelt (beide 20 nM). Zu beachten ist, dass diese Ströme im on-cell-Modus mit KCl in der Pipetten-Lösung durchgeführt wurden, um höhere IK_{Ca} -generierte K^+ -Einwärtsströme zu erzielen. Mit der somit hohen K^+ -Konzentration extrazellulär des abgeleiteten Membranflecks und der anzunehmenden hohen K^+ -Konzentration im Zytosol liegt das E_K über der Plasmamembran nahe 0 mV Membranspannung. 0 mV Membranspannung werden dann erreicht, wenn das positive Klemmpotenzial das negative physiologische Membranpotenzial aufhebt. K^+ -selektive Ströme haben damit ihr V_{rev} bei positiven Klemmpotenzialen. **C.** Mittlere Strom-Spannungsbeziehungen ($\pm$ SE, $n = 6$) nt-RNA (links) bzw. KCNN4 siRNA (rechts) vorbehandelten Zellen aufgenommen wie in (B, erste, dritte und vierte Stromspuren) unter Kontroll-Bedingungen (Dreiecke) sowie nach 1-EBIO-vermittelter IK_{Ca} -Aktivierung und Ein- (TRAM-34 + 1-EBIO, geschlossene Kreise) bzw. Wiederauswaschen (1-EBIO_{late}, offene Kreise) von TRAM-34. **D.** Mittlere Strom-Spannungsbeziehungen ($\pm$ SE, Daten aus (C)) der

TRAM-34-sensitiven Stromfraktion in 1-EBIO stimulierten nt-RNA (offene Kreise) bzw. KCNN4 siRNA (geschlossene) behandelten TA4 Zellen. E. TRAM-34-sensitive makroskopische Leitfähigkeit des spannungsgeklammten Membranflecks der 1-EBIO-stimulierten nt-RNA- (offene Kreise) bzw. KCNN4 siRNA- (geschlossene) vorbehandelten (n = 6) TA4 Zellen. Gezeigt werden individuellen Daten aus (D). Die Leitfähigkeit G_{inward} wurde für die Einwärtsströme im Klemmspannungsbereich von -100 mV bis -30 mV durch lineare Regression berechnet (: $p \leq 0.05$, Welch-korrigierter zweiseitiger t-Test).*

3.10 KCNN4-Knockdown erniedrigt tendenziell die basale Klonogenizität sowie nach Einmal-Bestrahlung die TTFIELDS-vermittelte Klonogenizitätssteigerung in TA4-pGSCs.

Hierzu wurden mit ntRNA- und KCNN4 siRNA-transfizierten TA4 pGSCs (48 h nach Transfektion) preplating LDAs mit Einmal-Bestrahlung und TTFIELDS-Kurzzeitbehandlung durchgeführt (Abb. 23). Ähnlich dem pharmakologischen IK_{Ca}-Targeting mit TRAM-34, bewirkte IK_{Ca}-Knockdown eine numerische Erniedrigung der basalen Anwachsrate (jedoch im Gegensatz zur TRAM-34-Behandlung nur eine numerische Reduktion der Anwachsrate nach Einmal-Bestrahlung mit 4 Gy, Abb. 23A, links bzw. rechts, jeweils schwarze Symbole). Analog der TRAM-34-Wirkung verbesserte IK_{Ca}-Knockdown kaum den tumoriziden TTFIELDS-Effekt in TA4-pGSCs (Abb. 23C, links), verringerte jedoch die steigernde TTFIELDS-Wirkung auf die Anwachsrate nach Bestrahlung (Abb. 23C, rechts) sowie zumindest numerisch auch die steigernde TTFIELDS-Wirkung auf die SF_{4 Gy} (Abb. 23D). Um die ähnlichen Effekte von pharmakologischer Inhibition und Knockdown von IK_{Ca} noch einmal herauszustellen, wurden die TRAM-34 Daten aus Abb. 21C, D (oben) noch einmal der Abb. 23C, D in blauer Farbe unterlegt. Diese Ähnlichkeit zwischen der TRAM-34- und der KCNN4 Knockdown-Modulation der TTFIELDS-Effekte auf Klonogenizität -und Radioresistenz-deutet somit nicht darauf hin, dass (zumindest in TA4) TRAM-34 seine Wirkung anders als über eine IK_{Ca}-Blockade entfaltet.

Neben IK_{Ca} stellt der ebenfalls Ca²⁺-aktivierte BK_{Ca} (KCNMA1) K⁺-Kanal einen weiteren wichtigen Player im Elektrosignalling von Glioblastomzellen dar¹³⁵. Glioblastomzellen exprimieren dabei eine spezielle BK_{Ca} Variante¹¹⁸, die durch Paxilline pharmakologisch blockiert werden kann¹³⁷. Da BK_{Ca} zum einen bei der Elektroortung von Fischen¹³⁸ zum anderen in der Tumorbilogie und Therapieresistenz von Glioblastomzellen herausragende Rollen spielt¹³⁴, untersuchte diese Arbeit als nächsten Schritt die Aktivität von BK_{Ca}-Kanälen in der Plasmamembran von pGSC-Zellen und deren Rolle bei der TTFIELDS-Wirkung auf Klonogenizität und Radioresistenz.

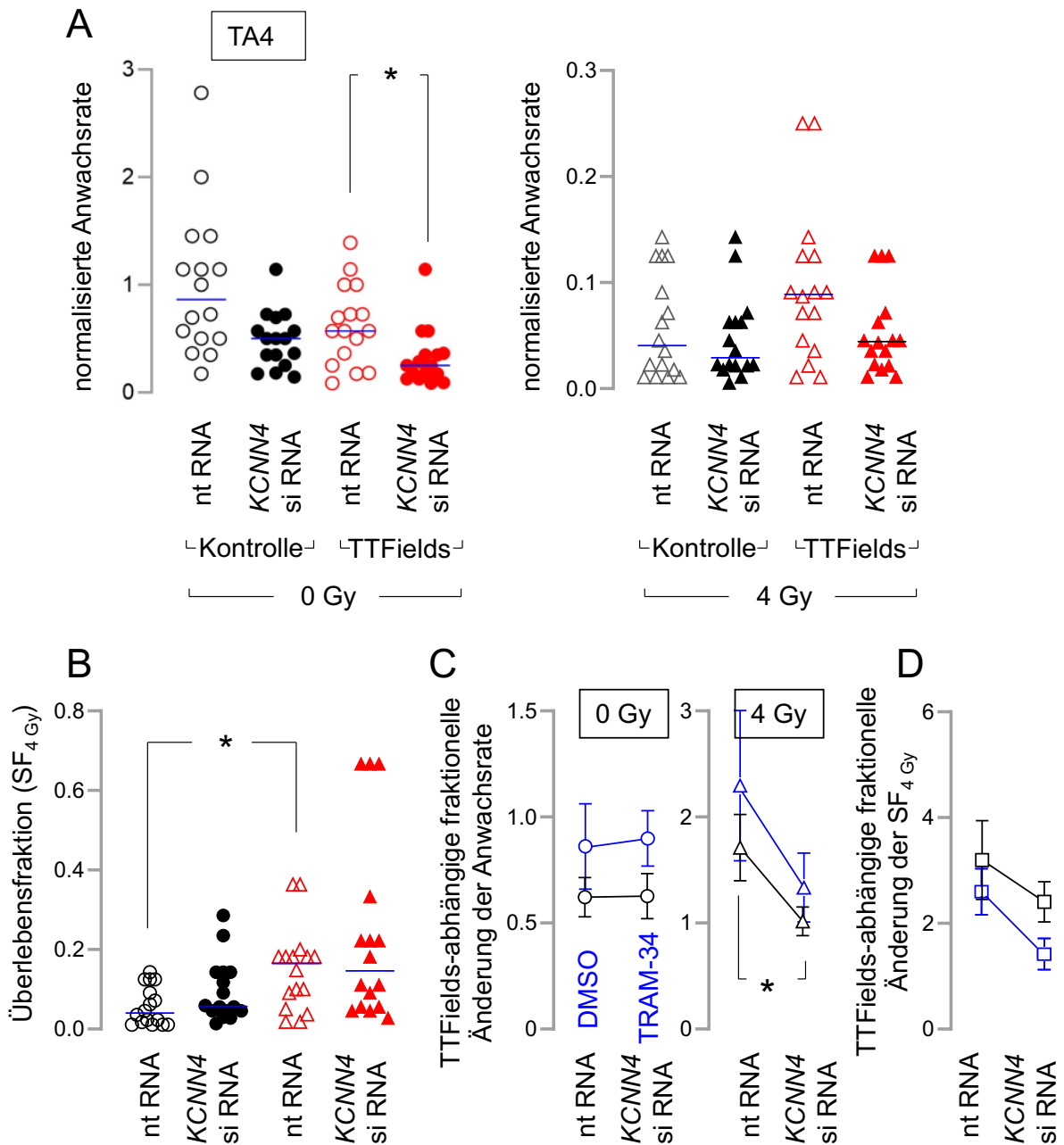


Abb. 23. KCNN4-Knockdown erniedrigt die TTFIELDS-vermittelte Radioresistenz in TA4 pGSCs. **A, B.** Normalisierte Anwachsrate (A) und 4 Gy-Überlebensfraktionen ($SF_{4\text{ Gy}}$) (B) von TA4 pGSCs. Die Kulturen wurden für 48 h mit nt-RNA (offene Symbole) bzw. KCNN4 siRNA (geschlossene Symbole) vorbehandelt (beides 20 nM). Danach wurden die Zellen entweder für 24 h unter Kontroll-Bedingungen (0 V_{pp}/cm , 0 Gy, schwarze Kreise), oder für 30 min plus 24 h unter TTFIELDS-Behandlung (5 V_{pp}/cm , 0 Gy, rote Kreise), oder für 24 h nach 4 Gy Einmalbestrahlung (0 V_{pp}/cm , 4 Gy, schwarze Dreiecke), sowie für 24 h nach 4 Gy kombiniert mit 30 min plus 24 h (neo-)adjuvanter-TTFIELDS-Behandlung (5 V_{pp}/cm , 4 Gy, rote Dreiecke) kultiviert. Nach weiteren 28 Tagen Kultur wurde das klonogene Überleben mittels LDA analysiert. **C, D.** Aus (A, B) errechnete fraktionale TTFIELDS-abhängige Veränderung der Anwachsrate (C) in unbestrahlten (links) und 4 Gy-bestrahlten Zellen (rechts) sowie der 4 Gy-Überlebensfraktionen ($SF_{4\text{ Gy}}$) (D) in Abhängigkeit einer Vorbehandlung mit nt-RNA bzw. KCNN4 siRNA (schwarze Symbole). Blau unterlegt sind nochmals die in Abb. 19C, D, oben bereits gezeigten TA4-Daten zur pharmakologischen Hemmung von IK_{Ca} mit Tram-34. Dargestellt

werden individuelle Datenpunkte ($n = 16$, $N = 4$ Passagen) und Mediane (blaue Linien) in (A, B) und in (C, D) Mittelwerte $\pm$ SE (*: $p \leq 0.05$, nicht parametrischer Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Mehrfachvergleich Posthoc-Test in (A, B) und zweiseitiger t-Test in (C)).

3.11 Die Hemmung von BK_{Ca} -Kanälen mit Paxilline modifiziert nicht die tumoriziden und Radioresistenz-vermittelnden TTFIELDS-Effekte in TA4-, TA11- und TA16 pGSCs

Die *KCNMA1* mRNA-Abundanzen variierten stark zwischen den einzelnen Passagen, wobei TA11 pGSCs noch die höchste BK_{Ca} -mRNA-Menge der 3 untersuchten pGSC-Kulturen exprimierte (Abb. 24A). In TA11 pGSCs ließen sich auch in on-cell Patch-Clamp Experimenten (NaCl-reiche Lösung in Superfusat und Ableitpipette (Abb. 24B) spannungsabhängige (Abb. 24C) K^+ -Kanäle mit sehr hoher Einzelkanal-Leitfähigkeit im Bereich von 200 pS (Abb. 24D) nachweisen – Eigenschaften die typisch für Paxilline-sensitive BK_{Ca} -Kanäle sind^{118, 137}. Um deren Funktion zu untersuchen, wurden analog zu den TRAM-34-Versuchen preplating LDAs mit Einmal-Bestrahlung und Kurzzeit-TTFIELDS-Behandlung in An- und Abwesenheit des BK_{Ca} -Blockers Paxilline in TA4, TA11 und TA16 pGSCs durchgeführt. Wie Abbildung 24E, F am Beispiel von TA11 und in der Zusammenschau aller 3 Kulturen in Abbildung 24G, H zeigen, hatte Paxilline keinerlei Auswirkungen auf die tumoriziden und Radioresistenz-vermittelnde TTFIELDS-Effekte, womit eine Funktion von BK_{Ca} hierin weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

Um auf molekularer Ebene neben IK_{Ca} weitere Kandidaten zu identifizieren, die während einer zellulärer TTFIELDS-Antwort differentiell exprimiert werden und möglicherweise zu der tumoriziden und Radioresistenz-vermittelnden TTFIELD-Wirkung beitragen, wurden im weiteren Verlauf dieses Projekts die Transkriptomdaten von TA11 und TA16 pGSCs (jeweils 3 Passagen) nach Langzeit-TTFIELDS-Behandlung (0 bzw 5 V_{pp}/cm) für 5 Tage und gleichzeitiger fraktionierter Bestrahlung (5x 0 Gy bzw. 5x 2 Gy) analysiert. TA11 und TA16 pGSCs wurden deshalb für diese Analyse ausgewählt, da sie sich bezüglich der TRAM-34-Effekte auf die tumorizide und Radioresistenz-vermittelnden TTFIELDS-Wirkung ähnlich verhielten (siehe Abb. 21C, links).

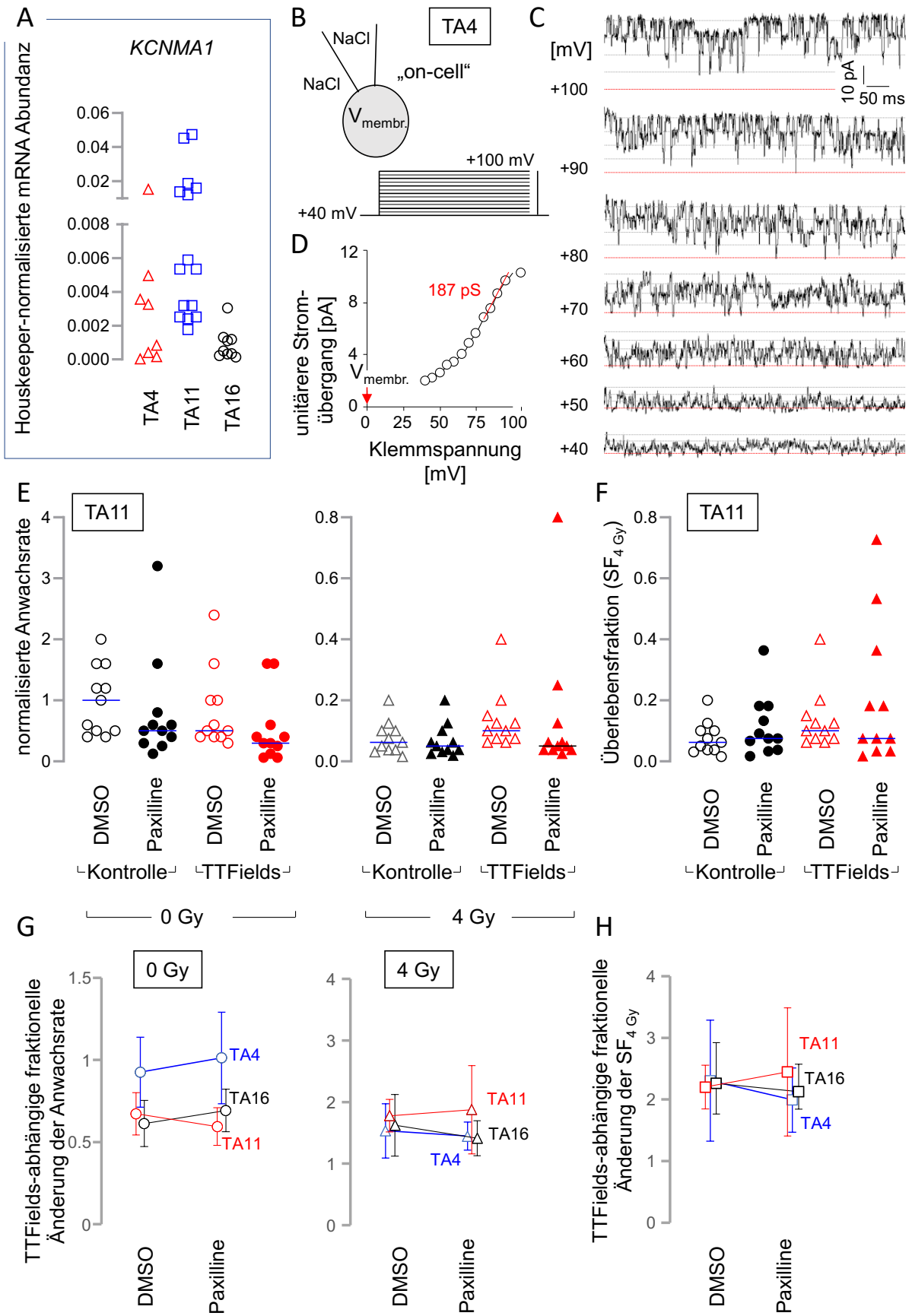


Abb. 24. Blockade des BK_{Ca} K^+ -Kanals durch Paxilline führt zu keiner beobachtbaren Modifizierung der tumoriziden und Radioresistenz-vermittelnden Effekte in TA4, TA11 und TA16 pGSCs. **A.** Housekeeper-normalisierte KCNMA1 mRNA Abundanz in den drei pGSC-Kulturen (gezeigt werden $n = 8-16$ individuelle Werte). **B-D.** Einzelkanal Ableitungen in einer TA4-Zelle mit on-cell-Ableitkonfiguration in (B), original Stromspuren bei verschiedenen Haltepotenzialen in (C) und dazugehörige Beziehung zwischen „Unitary Current Transitions“ (i.e., Einzelkanal-Amplituden) und Haltepotenzial in (D). Aus Letzterer errechnete sich mittels linearer Regression zwischen +80 und +95 mV Haltepotential (rote Linie) eine Einzelkanal-Leitfähigkeit von annähernd 200 pS. Zu beachten ist in (C) die zunehmende Anzahl gleichzeitig offener Kanäle (gestrichelte graue Linien) mit zunehmend positiven Haltepotenzial, die den Kanal als spannungsabhängig ausweist. **E, F.** Normalisierte Anwachsrate (A) und 4 Gy-Überlebensfraktionen (SF_{4Gy}) (B) von TA11 pGSCs. Die Kulturen wurden für 24 h unter Kontroll-Bedingungen (0 V_{pp}/cm , 0 Gy, schwarze Kreise), nach 30 min plus 24 h unter (neo-)adjuvanter TTFields-Behandlung (5 V_{pp}/cm , 0 Gy, rote Kreise), oder für 24 h nach 4 Gy Einmalbestrahlung (0 V_{pp}/cm , 4 Gy, schwarze Dreiecke), sowie für 24 h nach 4 Gy kombiniert mit 30 min plus 24 h (neo-)adjuvanter-TTFields-Behandlung (5 V_{pp}/cm , 4 Gy, rote Dreiecke) kultiviert. Diese Experimente wurden zudem in Ab- (DMSO-Vehikel-Kontrolle, offene Symbole) und Anwesenheit des BK_{Ca} K^+ -Kanal Blockers Paxilline (5 μM , geschlossene Symbole) durchgeführt und das klonogene Überleben nach 28 Tagen weiterer Kultur ohne Medienwechsel mittels LDA erfasst. **G, H.** Aus (C, D) und weiteren Experimenten errechnete fraktionelle TTFields-abhängige Veränderung der Anwachsrate (G) in unbestrahlten (links) und 4 Gy-bestrahlten (rechts) TA4 (blaue Symbole), TA11 (rote Symbole) und TA16 (schwarze Symbole) pGSCs (rechts) sowie in (H) deren 4 Gy-Überlebensfraktionen (SF_{4Gy}) in Abhängigkeit einer Ko-Inkubation mit Vehikel (DMSO) oder dem BK_{Ca} -Inhibitor Paxilline. Gezeigt werden individuelle Datenpunkte ($n = 12$, $N = 3$) und Mediane (blaue Linien) in (E, F) und Mittelwerte $\pm$ SE in (G, H).

3.12 Transkriptomanalyse und Kandidaten für TTFields-regulierten Signalwege.

Zunächst wurde eine Hauptkomponenten-Analyse der RNA Abundanzen von TA11- (Abb. 25, links) und TA16-pGSCs (Abb. 25, rechts) für alle vier Versuchsarne durchgeführt. Überraschenderweise unterschieden sich in beiden Kulturen die jeweils drei analysierten Passagen in ihren Hauptkomponenten deutlich voneinander. Zum Teil waren diese Unterschiede insbesondere bei TA11 pGSCs zwischen den Zellkultur-Passagen innerhalb eines Versucharmes größer als die Unterschiede zwischen den Versucharmen innerhalb einer Passage.

Wurden nun in den TTFields-unbehandelten Kulturen die alleinigen Effekte der fraktionierten Bestrahlung auf die RNA-Abundanzen in Vulkandiagrammen betrachtet, so zeigten sich in beiden Kulturen große radiogene Expressionsänderungen (Abb. 26A). Anschließende Netzwerkanalysen (Abb. 26B) sagten dabei differentiell regulierte zelluläre Programme voraus (rote Schrift), die bekanntermaßen bei der DNA-Schadensantwort beteiligt sind (Übersichtsartikel in ¹³⁹), wie hier graphisch für TA11 illustriert.

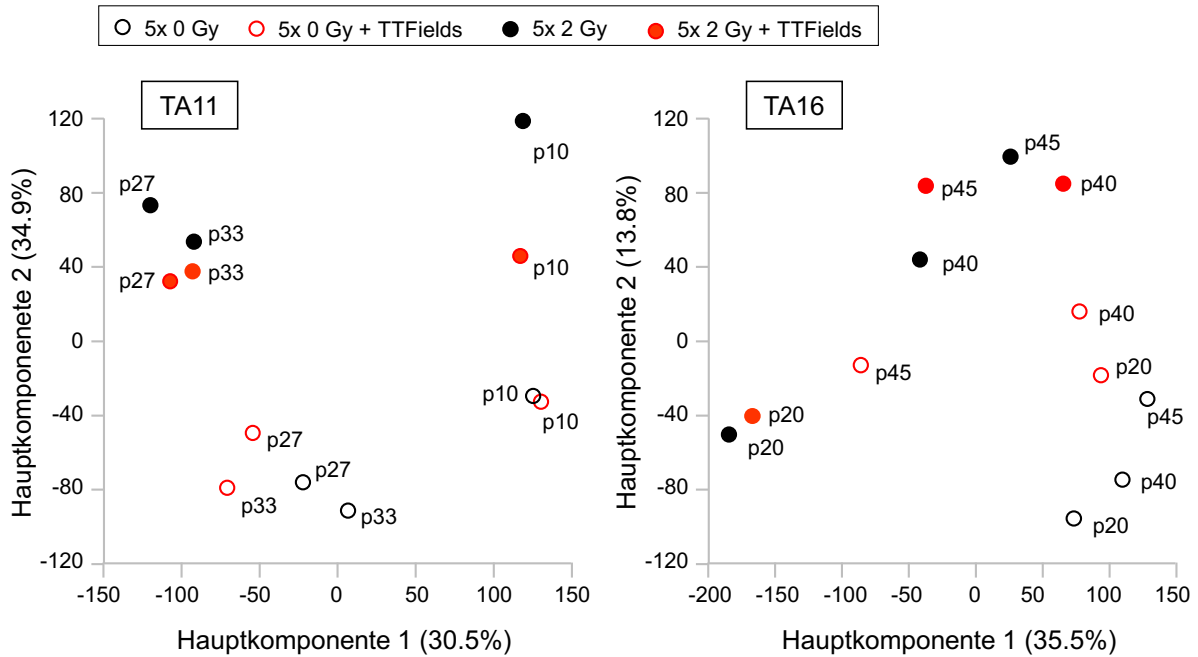


Abb. 25. Transkriptom-Hauptkomponentenanalyse (principal component plot) der Transkripte (Illumina NovaSeq® 6000 RNA-Sequencing) von jeweils drei unterschiedlichen Zellkulturpassagen (pXX) der TA11 (links) und TA16 (rechts) pGSC-Kulturen. Die Transkript-Abundanz der pGSCs wurde unter Kontrollbedingungen (schwarze offene Kreise), nach Langzeit-TTFields-Behandlung (rote offene Kreise), nach fraktionierter Bestrahlung (schwarze geschlossene Kreise), sowie nach konkomitanter fraktionierter Bestrahlung und TTFields-Behandlung (rote geschlossene Kreise) analysiert. Die pGSC-Kulturen wurden dafür an 5 aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 0 oder 2 Gy bestrahlt und vor der ersten Strahlenfraktion für 30 min neoadjuvant und nach den Strahlenfraktionen jeweils für 24 h adjuvant mit TTFields (0 oder 5 V_{pp}/cm) behandelt.

Im Gegensatz zu fraktionierter Bestrahlung induzierten Langzeit-TTFields sowohl in unbestrahlten (Abb. 27A) als auch in fraktioniert-bestrahlten Kulturen (Abb. 27B) signifikante Abundanzänderungen in nur wenigen RNA-Spezies. Werden nun in den Vulkandiagrammen die TTFields-abhängig differentiell exprimierte RNA-Spezies von TA11 (Abb. 27A, B, links) in den Datenpunkten von TA16 (Abb. 27A, B, rechts) blau markiert und umgekehrt, so kann nur für die fraktioniert-bestrahlten Kulturen und auch nur für ein Transkript (Ubiquitin specific peptidase 6 N-terminal like (*USP6NL*)-202) eine, in beiden Kulturen gleichsinnige – in diesem Falle – Hochregulation (Faktor 200 bzw. 290) durch TTFields beobachtet werden. Dies deutet – zumindest bezüglich der Genexpression – auf nicht gleichartige zelluläre TTFields-Stressantworten in TA11 und TA16 pGSCs. RNAs, die beschriebenermaßen durch Hitzeschock differentiell reguliert werden, wurden in den Vulkandiagrammen in Abb. 27A, B rot markiert und zeigten keine TTFields-abhängige Abundanz-Änderungen. Hieraus ergab sich neben der direkten Temperaturmessung (siehe Abb. 11B) eine weitere, indirekte Evidenz für eine isotherme TTFields-Behandlung durch das in diesem Projekt verwendete Applikationssystem.

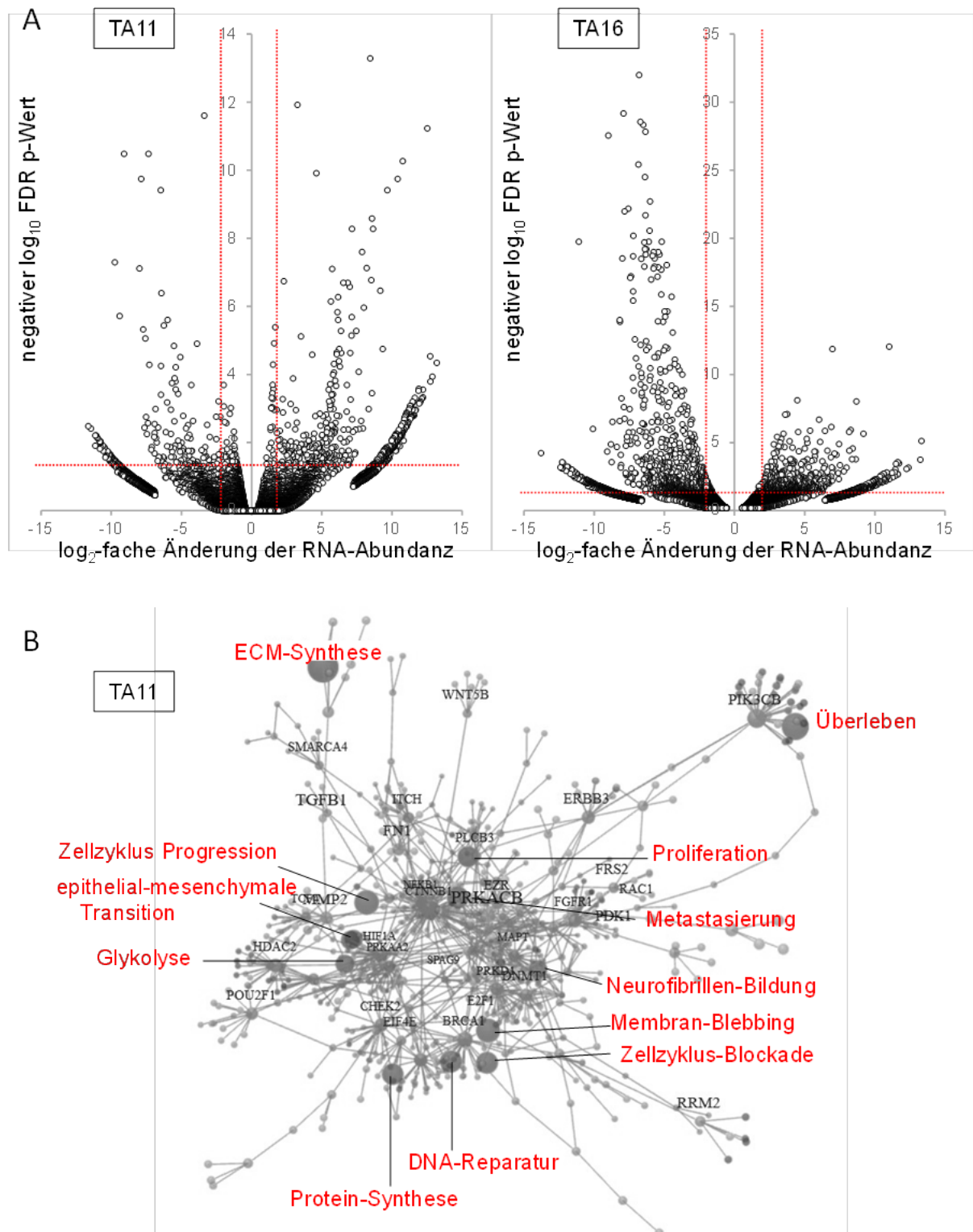


Abb. 26. Strahlungsinduzierte Änderung der RNA Abundanzen. **A.** Volcano-Plots der durch fraktionierte Bestrahlung (5x 2 Gy über 5 Tage) induzierte Änderung ($\log_2$ -Werte) der Transkript-Mengen in TA11 (links) und TA16 (rechts) pGSC Kulturen. Die differentiellen RNA Expressionen wurden mittels RNA-Sequencings durch den Vergleich jeweils drei Kulturpassagen von schein- (5x 0 Gy) und fraktioniert bestrahlter (5x 2 Gy) TA11 (links) bzw. TA16 (rechts) pGSCs bestimmt. Die rote horizontale Linie zeigt den negativen dekadischen Logarithmus der Falscherkennungsrate (false discovery rate,

FDR) von $p = 0.05$ an. Oberhalb dieser Linie werden die differentiellen Expressionsdaten als statistisch signifikant angesehen. Die vertikalen Linien indizieren ein $\log_2$ -fache strahleninduzierte Expressionsänderungen von -2 bzw. +2. Davon negativere bzw. positivere Werte werden als biologisch relevante Änderungen betrachtet. **B.** prognostizierte genregulatorische Interaktionsnetzwerke (<https://www.networkanalyst.ca/NetworkAnalyst/>¹⁴⁰) der strahlungsinduziert (5x 2 Gy vs. 5x 0 Gy) differentiell exprimierten Genen in TA11 pGSCs mit dem differentiell modifizierten Phänotyp (rote Schrift).

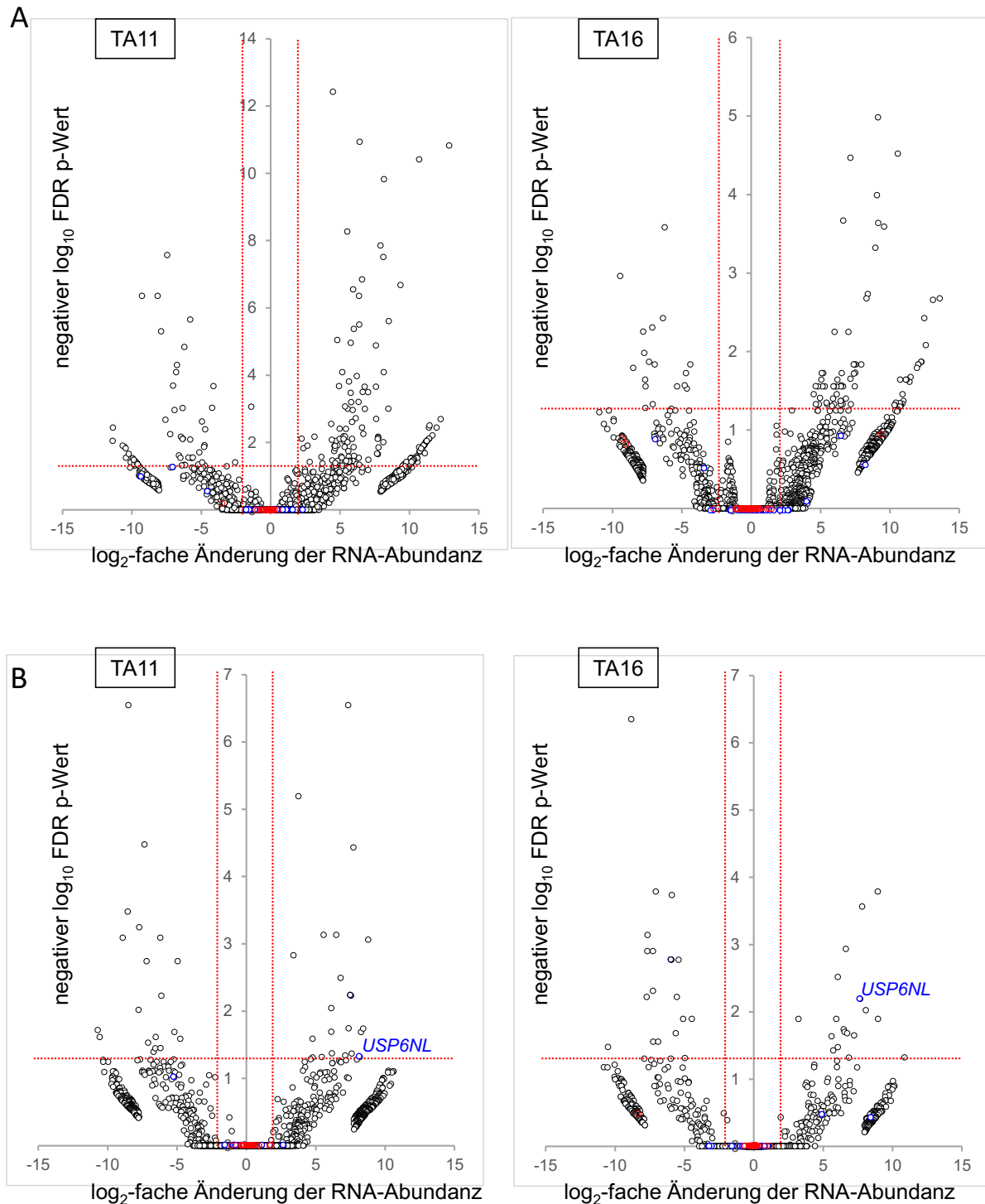


Abb. 27. Langzeit TTFIELDS-induzierte Änderung der RNA Abundanzen in pGSCs. **A, B.** Volcano-Plots der durch Langzeit-TTFIELDS-Behandlung (5 Tage) evozierten Änderung ($\log_2$ -Werte) der Transkript-Abundanzen in un- (A) und (B) fraktioniert bestrahlten TA11 (links) und TA16 (rechts) pGSC Kulturen. Die differentiellen RNA-Expressionen wurden mittels RNA-Sequencings durch den Vergleich jeweils drei Kulturpassagen von scheinbehandelten und Langzeit-TTFIELDS (5 V_{pp}/cm für 5 d)-ausgesetzter unbestrahlter- (5x 0 Gy)(A) und fraktioniert bestrahlter (5x 2 Gy) (B) TA11 (links) bzw. TA16 (rechts) pGSCs ermittelt. Rote horizontale und vertikale Linien indizieren wiederum den Signifikanz-Schwellenwert des negativen dekadischen Logarithmus der Falscherkennungsrate bzw. die Schwellenwerte der als biologisch relevante Änderungen betrachteten $\log_2$ -fachen Langzeit-TTFIELDS-induzierten Expressionsänderungen. Blaue Symbole kennzeichnen die in den jeweils anderen pGSC-Kultur differentiell exprimierte Transkripte, rote Symbole Transkripte, die bei der Anpassung an Hitze-Schock eine Rolle spielen (USP6NL-202: Transkript der Ubiquitin specific peptidase 6 N-terminal like).

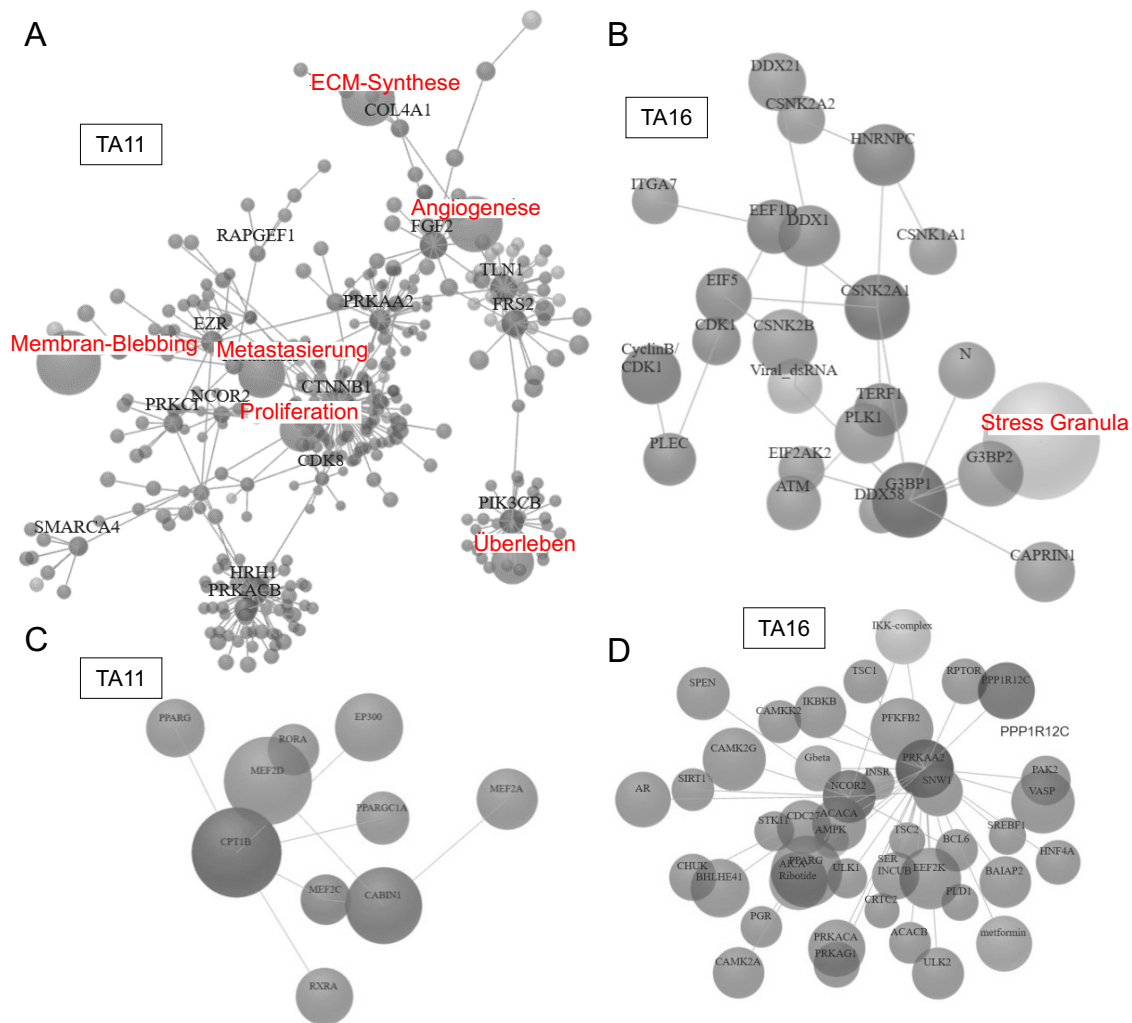


Abb. 28. Genregulatorische Interaktionsnetzwerke Langzeit-TTFIELDS-induzierter Genexpression. **A-D.** Prognostizierte ((<https://www.networkanalyzer.ca/NetworkAnalyst/>¹⁴⁰) TTFIELDS (5 V_{pp}/cm vs. 0 V_{pp}/cm für 5 d)-induzierte Modulation von Signalmolekülen und zellulären Programmen (rote Schrift) in scheinbestrahlten (5x 0 Gy, (A, B)) und fraktioniert bestrahlten (5x 2 Gy (B, C)) TA11 (A, C) und TA16 (B, D) pGSCs.

Analysen genregulatorischer Netzwerke (Gene regulatory Networks) prognostizierten unter Verwendung der SiGnaling Network Open Resource-Datenbank ¹⁴¹ für unbestrahlte TA11- (Abb. 28A) aber nicht für unbestrahlte TA16-pGSCs (Abb. 28B) oder fraktioniert bestrahlte TA11- und TA16-Kulturen (Abb. 28C, D) eine TTFIELDS-induzierte Regulation von Membran-„Blebbing“, Synthese extrazellulärer Matrix, Angiogenese, Metastasierung, Zellproliferation oder Zellüberleben. In unbestrahlten TA16 pGSCs deuteten diese Analysen auf eine mögliche TTFIELDS-Regulation von Stressgranula hin. (Abb. 28B). In bestrahlten Zellen ließen sich dagegen die durch TTFIELDS differentiell veränderten RNA-Abundanzen keinem speziellen zellulären Programm zuordnen (Abb. 28C, D).

Weiterhin konnten in Analysen von Signaltransduktions-Netzwerken durch Abgleich der Transkript-Abundanzen mit den Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)-Datenbanken ¹⁴² in schein- und fraktioniert bestrahlten pGSCs Langzeit-TTFIELDS-assoziierte Transkriptanreicherungen/-abreicherungen bestimmten Signalwegen zugeordnet werden (Tab. 2). Hierbei wurden nur prognostizierte Signalwege berücksichtigt, für die sich bei mindestens zwei der vier experimentellen Bedingungen (TA11 und TA16 jeweils schein- und fraktioniert bestrahlt) eine Falscherkennungsrate (FDR) von $FDR \leq 0.05$ vorhergesagt wurden. Dabei zeigten sich durchaus Übereinstimmungen zwischen scheinbestrahlten TA11- und TA16-Zellen (z.B. Wnt Signaling) oder zwischen schein- und fraktioniert bestrahlten TA11- (z.B. AMP Kinase Signaling) bzw. TA16-pGSCs (z.B., Mitophagy-Signaling).

Tab. 2. Prognostizierte, durch Langzeit-TTFIELDS (5 V_{pp}/cm vs. 0 V_{pp}/cm für 5 d) modifizierte Signalwege in schein- und fraktioniert bestrahlten TA11- und TA16-pGSCs. Pathway-Anreicherungsanalyse unter Verwendung der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)-Datenbank. Angegeben sind Signalwege, bei denen bei mindestens zwei der vier experimentellen Bedingungen eine TTFIELDS-assoziierte Veränderung mit einer Falscherkennungsrate (False discovery rate, FDR) von $FDR \leq 0.05$ (rot) vorhergesagt wurden.

Signalwege	Falscherkennungsrate (FDR)				
	pGSC-Kultur: Behandlung:	TA11 5x 0 Gy	TA16 5x 0 Gy	TA11 5x 2 Gy	TA16 5x 2 Gy
Wnt-Signalweg		1.22e-26	0.00773	0.193	-
Adhärenz-Verbindungen		5.73e-12	0.0102	-	0.212
Mitophagie		8.33e-07	0.00938	-	2.39e-07
Zellzyklus		7.06e-06	0.0361	-	-
AMPK-Signalweg		3.48e-18	-	0.0182	1.65e-21
Adipocytokin-Signalweg		3.13e-09	-	0.00718	1.02e-06
Glucagon-Signalweg		1.82e-08	-	0.0144	5.12e-08
Apelin-Signalweg		4.14e-08	-	0.00352	0.149
cGMP/PKG-Signalweg		3.51e-06	-	0.0356	-
Schilddrüsenkrebs		1.02e-14	-	0.0356	-
Transkriptionelle Fehlregulation bei Krebs		1.7e-05	-	0.0406	-
Langlebigkeit-Regulationswege		2.83e-15	-	0.142	1.17e-05
mTOR-Signalweg		3.47e-17	-	-	7.09e-08
FoxO-Signalweg		4.75e-19	0.493	-	4.67e-06
PI3K/Akt-Signalweg		8.06e-23	-	-	0.000609
zirkadianer Rhythmus		4.56e-07	-	0.706	0.00806
Ras-Signalweg		1.65e-14	-	-	0.0117
Langleit-Potenzierung		1.53e-07	-	-	0.05

(<https://www.networkanalyst.ca/NetworkAnalyst/Secure/vis/NetworkView.xhtml>, function explorer).

Resümierend lässt sich feststellen, dass Langzeit-TTFields das Transkriptom von schein- und fraktioniert bestrahlten pGSCs moduliert. Dabei wurden Interaktionen mit vielen Signalwegen und zellulären Programmen prognostiziert. Diese unterschieden sich aber weitgehend zwischen den beiden analysierten pGSC-Kulturen und Bestrahlungs-Bedingungen.

Zuletzt untersuchte dieses Projekt den Einfluss von TTFields auf Funktionen des Immunsystems. Als Messsystem wurde dabei die Lyse von TA4-, TA11- und TA16-pGSC-Zellen durch CD276-gerichtete CAR-NK92-Zellen in Abhängigkeit einer TTFields Vor- und Co-Behandlung der Immunzellen verwendet. pGSC-Zellen exprimieren in unterschiedlichem Ausmaß CD276 auf ihrer Oberfläche ¹²⁸.

3.13 TTFields hemmen nicht die Lyse von pGSC-Kulturen durch CAR-NK92-Zellen

Hierzu wurden CAR-NK-92-Zellen für 24 h mit TTFields (0 bzw. 5 V_{pp}/cm) (schein-)behandelt und dann mit vereinzelt, Calcein-beladenen TA4, TA11 bzw. TA16 pGSCs in NK-92/pGSC-Mischungsverhältnissen von 10:1, 2,5:1 bzw. 0,5:1 für 2 h während TTFields (0 bzw. 5 V_{pp}/cm) (Schein-)Behandlung ko-inkubiert. Wie Abbildung 29 (Kreise) zeigt, veränderte 24 h TTFields-Vorbehandlung der NK-92-Zellen deren Lyse-Aktivität nicht. TTFields-Behandlung der pGSC-/NK-92-Zell-Ko-Inkubation erhöhte dagegen (statistisch signifikant in TA4 und TA16, numerisch in TA11) die pGSC-Lyse in nicht-vorbehandelten NK-92-Zellen (Abb. 29, schwarze Symbole), nicht aber in mit TTFields vorbehandelten NK-92-Zellen (Abb. 27, rote Symbole).

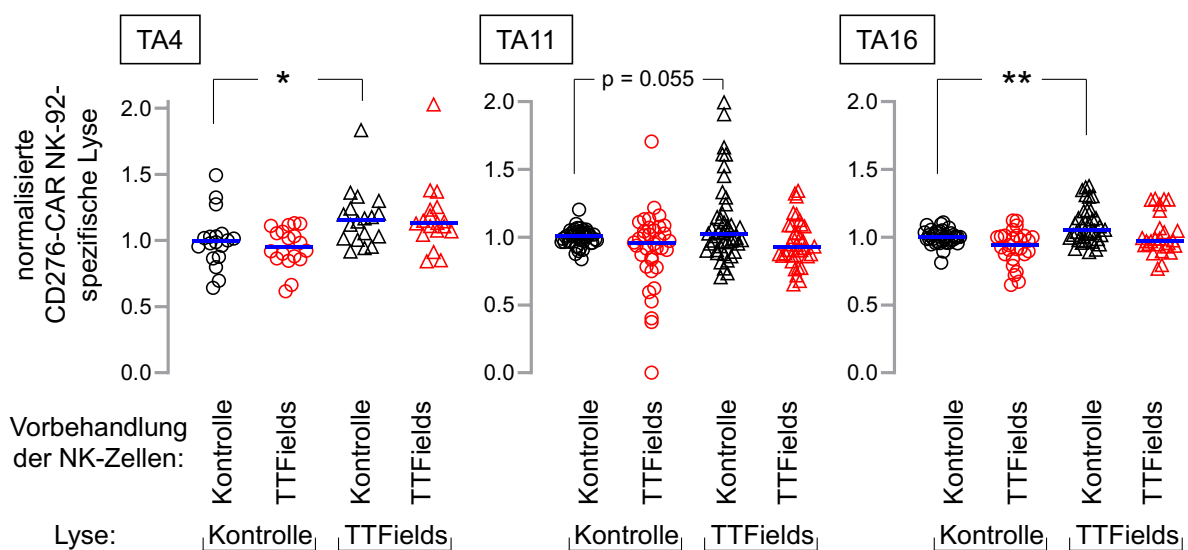


Abb. 29. TTFields haben nur schwache Auswirkungen auf die pGSC-Lyse durch CD276-gerichtete CAR-NK-92-Zellen. Normalisierte Calcein Freisetzung (Einzelwerte und Mediane, blaue Linien, $n = 18-36$, $N = 4-5$) aus Calcein-beladenen TA4 (links), TA11 (Mitte) und TA16 Zellen (rechts) während Co-Inkubation (2 h) mit CD276-gerichteten CAR-NK-92-Zellen. Die Lyse Experimente (10:1, 2,5:1 bzw. 0,5:1 NK-Zell:pGSC-Verhältnis) wurden mit Schein- (schwarze Symbole) oder TTFields (5 V_{pp}/cm für 24 h, rote Symbole) vorbehandelten CAR-NK-92-Zellen in Abwesenheit (Kreise) und Anwesenheit (Dreiecke) von (weiterer) TTFields-Behandlung (5 V_{pp}/cm für 2 h) während der 2-stündigen Lyse durchgeführt. Die Lyse wurde als Fraktion der Detergenzlyse berechnet und auf die Mittelwerte der Kontrollen (ohne TTFields-Vorbehandlung der NK-Zellen, ohne TTFields während der Lyse) der jeweiligen unabhängigen Experimente normalisiert (*, **: $p \leq 0,05$ und $0,01$, Bonferroni-korrigierter zweiseitiger Welch t-Test).

4 Diskussion

4.1 Biologische TTFields-Antworten

Die große EF-14-Studie zur adjuvanten TTFields-Behandlung von Glioblastompatienten wurde nicht placebokontrolliert, da aus ethischen Gesichtspunkten einer Placebo-Kontrollgruppe nicht zugemutet wurde, sich dreitglich die Kopfhaut zu rasieren, Elektroden-Arrays auf diese aufzukleben und nach Radio-Temozolomid-Therapie die meiste Zeit des Tages stationär an einem TTFields-Netzgerät oder mobil an einem Akku-Rucksack angeschlossen zu sein, ohne dass elektrische Felder appliziert werden. Das Fehlen der Placebo-Kontrollgruppe aber schließt nicht aus, dass es sich bei den TTFields-assoziierten Verlängerungen von progressionsfreien- und Gesamtüberleben um einen reinen Placebo-Effekt handelt. Auch gibt die eingeschränkte Interpretierbarkeit (siehe Einleitung) der mit wenigen Ausnahmen (z.B., ^{97, 98}) mit dem inovitro™-Applikationssystem der Firma Novocure (oder einem vergleichbaren Gerät) erhobenen *in vitro*-Daten letztlich keinen eindeutigen „Proof of Principle“ für tumorbiologisch relevante molekulare Effekte der TTFields. Mit ihrer isothermischen und isoosmotischen Applikation von (für die Klinik angenommenen relevanten) TTFields-Feldstärken, erweitert die vorliegende Arbeit die Evidenz für tatsächliche biologische Effekte der TTFields, welche im Folgenden diskutiert werden.

4.2 Tumorzide TTFields-Wirkung

Das klonogene berleben von Tumorzellen beschreibt die Fähigkeit eines Tumors nach einer Therapie zu rezidivieren. Es gilt daher als der Goldstandard-Parameter für den therapeutischen Nutzen einer Intervention ¹⁴³. In Übereinstimmung mit den Literaturdaten (siehe Einleitung) veränderte in der vorliegenden Arbeit TTFields Kurzzeit-Behandlung und Langzeit-Behandlung die Klonogenizität der stammzellanreichernden pGSC-Kulturen um den Faktor 0.4 bis 0.9 (siehe Abb. 12) bzw. um Faktor 0.7 bis 0.8 (siehe Abb. 13). Hierdurch bestätigte sich die tumorizide Wirkung von TTFields bei Glioblastomzellen auch mit einem isoosmotischen Applikationssystem der elektrischen Wechselfelder.

4.3 TTFields-Effekte auf Radioresistenz

Strahlentherapie kann Tumorzellen dann eradizieren, wenn die Anzahl der eingefügten DNA-DSBs die DNA Reparaturkapazität der Zelle durch Nicht-Homologes End-Joining und Homologe Rekombination (Letztere in später S- und G₂ Phase des Zellzyklus) während DSB-induzierten Zellzyklusarrests übersteigt (Übersichtsartikel in ¹⁴⁴). Sollten TTFields - wie in der Literatur beschrieben (siehe Einleitung) - die DNA DSB-Reparatur hemmen, sollte sich dies in einer verminderten berlebensfraktion (SF) uern. Durch getrennte Normalisierung des klonogenen Überlebens nach 4 Gy Bestrahlung auf die jeweilige 0 Gy Scheinbestrahlungs-Kontrollen für 0 bzw. 5 V_{pp}/cm TTFields, kürzen sich bei dem dimensionslosen SF_{4 Gy}-Wert die direkten tumoriziden Effekte der TTFields heraus. Die SF gibt somit die alleinigen Auswirkungen der TTFields auf die DNA-Schadensantwort der pGSCs wieder.

In der vorliegenden Arbeit erhöhten TTFields unerwartet die SF_{4 Gy} bei Einmal-Bestrahlung in 4 von 5 pGSC-Kulturen (Faktor 0.95 bis 2.1, siehe Abb. 12) und die SF_{5x2 Gy} bei fraktionierter Bestrahlung in 3 von 3 pGSC-Kulturen (Faktor 1.8 bis 3.6, siehe Abb. 13). Hierdurch lässt sich im vollkommenen Gegensatz zu den Literatur-Befunden (siehe Einleitung) eine Strahlenresistenz-Induktion und keine Radiosensibilisierung durch TTFields in den pGSC-Kulturen ableiten. Wird im Glioblastom rein

spekulativ eine konstante TTFields-Steigerung der $SF_{5 \times 2 \text{ Gy}}$ von Faktor 2 bis 3 zugrundegelegt, dann ließe sich dies für die klinische 6-wöchige fraktionierte Glioblastom-Bestrahlung (5x 2 Gy/Woche, bestrahlt wird Montag bis Freitag) auf eine Steigerung der $SF_{30 \times 2 \text{ Gy}}$ von Faktor 2^6 bis 3^6 hochrechnen. Und damit sänke die Wahrscheinlichkeit drastisch, die Glioblastomzellen zu eradizieren, welche bereits vor der Operation um die zu resezierende primäre Tumor-Läsion in das umgebende Gehirn-Parenchym disseminiert waren. Genau diese lokal disseminierten, nicht resezierten Zellen versucht das Strahlen-Zielvolumen mitzuerfassen¹⁴⁵. Sie spielen wahrscheinlich eine entscheidende Rolle für die Rezidivierung des Tumors. Die Mehrzahl (70%) der Glioblastome rezidivieren lokal (= nahe der Tumor-Resektionshöhle) und nicht distant¹⁴⁶. Demnach würden die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit translatiert auf die klinische Situation bedeuten, dass TTFields konkomitant zur Radio-Temozolomid-Therapie nicht nur keinen Benefit für den Glioblastom-Patienten brächte, sondern diesen schlimmstenfalls sogar schaden könnte.

4.4 TTFields-Effekte auf DNA-Reparatur und Zell-Zyklus

In TA11- nicht aber in TA4-pGSCs erniedrigte TTFields-Kurzzeit-Behandlung die residuellen $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ -Foci 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy, ein Umstand, der auf eine TTFields-induzierte Verbesserung der DNA DSB-Reparatur in TA11- (nicht aber in TA4-) pGSCs deutet. In der Literatur wird dagegen überwiegend an Tumor-Zelllinien verschiedener Entitäten eine TTFields-assoziierte Hemmung der DNA-Reparatur beschrieben^{42, 72, 73}. Eine Ausnahme stellt hier eine Arbeit dar⁸⁷, die in pGSCs eine robuste TTFields-Aktivierung von PARP- und ATR-vermittelter DNA-Reparatur aufzeigte. Da letztere Daten so wie die Arbeiten an den Zelllinien^{42, 72, 73} ebenfalls mit dem inovitro™-Applikationssystem erhoben wurden, lassen sich diese Unterschiede nicht auf eine unterschiedliche Methodik, sondern am ehesten auf eine sich unterscheidende Biologie der untersuchten Zellmodelle zurückführen.

Die zelluläre DNA-Schadensreaktion umfasst neben Aktivierung der DNA-Reparatur eine Verlangsamung des Zellzyklus. Mehr oder weniger strenge DNA-Schadens-Checkpoints in den Phasen G_1 , S und G_2 des Zellzyklus lösen einen G_1 - oder G_2 /M-Zellzyklusarrest oder eine Verlangsamung der S-Phasen-Progression aus¹⁴⁷, um die für die DNA-Reparatur erforderliche Zeit bis zur Mitose zu gewinnen. Darüber hinaus stellen auch während der Mitose bzw. postmitotisch Decatenation (erfolgreiche „Entkettung“ der Schwester-Chromatide)-, Spindelassemblierungs- und Tetraploidie-Checkpoints die Chromosomenintegrität der Zelle¹⁴⁸ sicher. Gerade der Spindelassemblierungs-Checkpoint sollte bei der postulierten TTFields-induzierten Störung des Spindelapparat-Aufbaus (siehe Einleitung) in der Prometaphase zu einem mitotischen Zellzyklusarrest führen. Dieser wäre dann in der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie in einem Auflaufen der Zellen im G_2 -Peak des Propidiumjodid-DNA-Färbehistogramm sichtbar sein. In der vorliegenden Arbeit konnte bei TA11-Zellen in der Durchflusszytometrie eine TTFields-assoziierte Akkumulation der Zellen nach 24 h bzw. 48 h im G_2 -Peak dagegen nicht beobachtet werden (siehe Abb. 16). Dies wäre aber zu erwarten gewesen, falls alleinig eine Störung des Spindelapparat-Aufbaus durch Kurzzeit-TTFields-Behandlung die Erniedrigung des klonogenen TA11-Überlebens verursacht hätte. Auch modulierten TTFields nicht den radiogenen G_2 /M-Arrest der TA11-Zellen (siehe Abb. 12).

Zusammenfassend lassen sich daher die TTFields-assoziierte Radioresistenz in TA11 pGSCs wahrscheinlich auf eine Verbesserung der DNA DSB-Reparatur nicht aber auf eine Modulation des radiogen Zellzyklusarrests zurückführen. Für TA4-Zellen konnte dies dagegen nicht gezeigt werden.

4.5 TTFIELDS-assoziierte Ionenkanal-Aktivitäten

TTFIELDS induzierten in der Einzellzell-Applikation in der vorliegenden und in einer früheren Arbeit meiner Arbeitsgruppe in Tübingen Ionenkanal-Aktivitäten in der Plasmamembran von Glioblastomzellen. Im Speziellen konnte dabei in der älteren Arbeit eine TTFIELDS-induzierte Aktivierung eines $\text{Ca}_v1.2$ -vermitteltem Ca^{2+} -Einstroms in zwei Glioblastom-Zelllinien beobachtet werden, der mit wenigen Minuten Verzögerung auftrat⁹⁷. Auch in den beiden Zell-Linien verringerten TTFIELDS das klonogene Überleben. Diese tumorizide Wirkung, ging mit einem, G_1 - oder S-Phase-Zellzyklusarrest, dem Zusammenbruch des inneren mitochondrialen Membranpotentials und/oder einem DNA-Abbau einher. Interessanterweise erhöhte $\text{Ca}_v1.2$ -Blockade in einer der beiden Linien die tumoriziden TTFIELDS-Effekte⁹⁷. Dies wäre durch eine, im Rahmen einer TTFIELDS-Stressantwort, $\text{Ca}_v1.2$ -vermittelten TTFIELDS-Resistenzreaktion erklärbar.

Glioblastomzellen exprimieren zwei Typen von Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen, IK_{Ca} und BK_{Ca} , die als „Oncochannels“ bezeichnet in vielen Tumorentitäten überexprimiert werden, wo sie zur malignen Transformation, lokaler Tumorstreuung, Fernmetastasierung, oder Therapieresistenz beitragen können (Übersichtsartikel in^{134, 149}). Im Glioblastom, in dem IK_{Ca} und BK_{Ca} vor allen in mesenchymalen GSCs überexprimiert werden, wirken beide Kanaltypen bei einer sogenannten radiogenen Hypermigration der Tumorzellen mit^{137, 150, 151}.

Für IK_{Ca} wurde zudem wichtige Funktionen für Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps, Tumorstreuung im Gehirn¹⁵¹⁻¹⁵⁶, Immun-Escape¹⁵⁷⁻¹⁵⁹, sowie für DNA-Reparatur, Strahlen-^{156, 160} und Temozolomid-Resistenz¹⁶¹ des Glioblastoms postuliert. Diese „onkogenen“ Funktionen von IK_{Ca} deuten sich auch durch eine inverse Korrelation der *KCNM4*-Abundanzen im Tumor und der Prognose der Glioblastom- und niedergradigen Gliom-Patienten^{154, 162}, sowie einer positiven Korrelation zwischen IK_{Ca} -Tumorexpression und dem WHO-Malignitäts-„Grading“ der Hirntumor-Entitäten¹⁵⁹ an.

In der vorliegenden Arbeit aktivierten TTFIELDS innerhalb Minuten IK_{Ca} -Kanäle in der Plasmamembran von TA4- und TA11 pGSCs, die als 1-EBIO-aktivierbare, TRAM-34-sensitive, einwärts-gleichrichtende und K^+ -selektive Ströme eindeutig als IK_{Ca} identifizierbar waren (siehe Abb. 17-20). Eine TTFIELDS-induzierte Aktivierung von BK_{Ca} -Kanälen ließ sich hingegen nicht nachweisen (siehe Abb. 24). Obwohl beide Kanaltypen Ca^{2+} -aktiviert sind, zeigen BK_{Ca} - und IK_{Ca} -Kanäle nicht gleichmäßige Aktivitäten in der Plasmamembran, da sie i) verschiedenen Ca^{2+} -Abhängigkeiten zeigen und ii) in unterschiedlichen Membranspannungs-Fenstern arbeiten: IK_{Ca} zeigt bezüglich seiner Aktivität keine Spannungsabhängigkeit hat aber wegen seiner Einwärtsgleichrichterfunktion (zunehmende Ströme mit zunehmender Negativität des Membranpotentials) zunehmenden hyperpolarisierenden Einfluss auf das Membranpotential: je negativer dieses wird, desto mehr Einfluss nimmt die IK_{Ca} -Aktivität auf das Membranpotential, so dass IK_{Ca} das Membranpotential auf sehr negative Werte „klemmt“. Depolarisation des Membranpotentials, hingegen erhöht die Offenwahrscheinlichkeit von BK_{Ca} , wobei eine Erhöhung der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, die Offenwahrscheinlichkeit/Spannungs-Kurve nach links (d. h., zu negativeren Spannungen) hin verschiebt. Eine durch Depolarisation-induzierte Aktivierung von BK_{Ca} -Strömen repolarisiert das Membranpotential, wodurch sich die BK_{Ca} -Kanal Offenwahrscheinlichkeit wieder verringert (Übersichtsartikel in^{163, 164}). Eine selektive IK_{Ca} - aber nicht BK_{Ca} -Aktivierung nach z.B. TTFIELDS-induzierter $\text{Ca}_v1.2$ Aktivierung und daraus resultierender Erhöhung der zytosolischen freien Ca^{2+} -Konzentration lässt sich somit mit den Unterschieden in der Physik beider K^+ -Kanaltypen erklären.

4.6 IK_{Ca} als TTFields-Resistenzfaktor und Vermittler einer TTFields-induzierten Radioresistenz

Der IK_{Ca}-Inhibitor TRAM-34 verstärkte den tumoriziden Effekt in TA11 und TA16, nicht aber in TA4 pGSCs, wohingegen TRAM-34 den Radioresistenz-vermittelnden TTFields-Effekt in TA4, nicht aber in TA11 und TA16, abschwächte (siehe Abb. 21). *KCNN4*-Knockdown in TA4 pGSCs (siehe Abb. 22) hatte dabei eine analoge Wirkung auf die TTFields-vermittelte Radioresistenz wie TRAM-34 in der TA4-Kultur (siehe Abb. 23). Hieraus lässt sich eine duale Funktion von IK_{Ca} für die TTFields-Antwort der Zellen ableiten. Abhängig von der individuellen pGSC-Kultur bewirkte TTFields-induzierte IK_{Ca}-Aktivierung TTFields-Resistenz in unbestrahlten oder Radioresistenz in bestrahlten Zellen.

Eine derartige IK_{Ca}-vermittelte Radioresistenz wurde im Glioblastom¹⁶⁰ und in murinen Brustkrebszellen¹⁶⁵ nachgewiesen. Über diese Entitäten hinaus konnte eine IK_{Ca}-Aktivierung durch ionisierende Strahlung auch in menschlichem Lungenadenokarzinom-^{166, 167} und menschlichen T-Zell-Leukämiezellen^{168, 169} gezeigt werden. Ein mögliches „Upstream“ Szenarium einer Kanal-Aktivierung könnte eine radiogene Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 α (HIF-1 α) und die Hochregulierung der HIF-1 α -Zielgene Stroma Cell derived Factor 1 (SDF1, CXCL12) und seines C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptors 4 (CXCR4), die auto-/parakrines Chemokin-Signalling¹³⁷, Bildung von Inositoltriphosphat (IP3) und Speicher-Freisetzung von Ca²⁺ darstellen (Übersichtsartikel in¹⁷⁰). Radiogenes Ca²⁺-Signalling wurde in mehreren Zellmodellen berichtet^{137, 160, 165, 166, 168, 171-182}. Neben der direkten Aktivierung über Ca²⁺ werden Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle auch von Ca²⁺-regulierten Kinasen wie Pyk2-Kinase (fokale Adhäsionskinase-2) moduliert^{177, 183}.

4.6.1 IK_{Ca}-Funktion im Ca²⁺-Signalosom. Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle beeinflussen dabei in reziproker Weise wiederum das Ca²⁺-Signalling.

Bemerkenswerterweise haben die radiogenen BK_{Ca}- und IK_{Ca}-K⁺-Kanalaktivitäten unterschiedliche, teilweise antagonistische Effekte auf die zytosolische freie Ca²⁺-Konzentration¹⁷⁷. In analoger Weise zeigten die radiogenen Aktivitäten von K_v3.4- und hERG1-K⁺-Kanälen gegensätzliche Effekte auf den Ca²⁺-Einstrom und die steady state freie zytosolische Ca²⁺-Konzentration in chronisch myeloischen Leukämie-Zellen^{184, 185}. Innerhalb des Ca²⁺-Signalosoms generiert somit das interaktive und komplexe Zusammenspiel von IK_{Ca} und/oder weiteren K⁺-Kanaltypen mit Ca²⁺-, spannungs- und Liganden-regulierten Ca²⁺-permeablen Kanälen in Plasmamembran und intrazellulären Membranen lokale Ca²⁺-Signale. Die K⁺-Kanalaktivität der Plasmamembran stabilisiert, re- oder hyperpolarisiert das Membranpotenzial, hält dabei die elektrochemische Triebkraft für den Ca²⁺-Einstrom in die Zelle aufrecht und reguliert die Aktivität spannungsgesteuerter Kanäle. Die so generierten Ca²⁺-Signale unterscheiden sich in subzellulärem Raum und Form (transient, lang-anhaltend oder oszillierend mit unterschiedlicher Amplitude und/oder Frequenz). Die unterschiedlichen Signale regulieren dabei unterschiedliche biochemische Effektorprotein-Signalwege (Übersichtsartikel in¹⁷⁷). In Übereinstimmung hiermit sensibilisiert die pharmakologische Hemmung und/oder der genetische Knockdown von K_v3.4¹⁸⁴ oder hERG1¹⁸⁵ in chronisch-myeloischen Leukämie- und von IK_{Ca} in Brustkrebs-¹⁸⁶ und in Glioblastom-Zelllinien die Zellen gegenüber ionisierender Strahlung. Darüberhinaus blockiert die pharmakologische Hemmung von IK_{Ca} in ektopen¹⁶⁰ und orthotopen Glioblastom-Mausmodellen^{151, 156} das Tumorwachstum, die Gehirninfiltration oder die DNA-DSB Reparatur. Dies weist eindeutig auf eine zentrale Funktion dieser Kanäle für die DNA-Schadensantwort hin.

4.6.2 Ca²⁺-Signalling im radiogenen Zellzyklusarrest.

Isoformen der vier Ca²⁺/Calmodulin (CaM)-abhängigen Kinase-II (CaMKII)-Gene übersetzen Ca²⁺-Signale in langanhaltende biochemische Signale. Nach CaM-Bindung induzierter Autophosphorylierung bleiben diese Kinasen unabhängig von Ca²⁺ aktiv¹⁸⁷. Ältere Arbeiten meiner

Arbeitsgruppe zeigten, dass Ionenkanal-regulierte nukleare CaMKII-Isoformen wichtige Rollen beim Zellzyklusarrest bestrahlter chronisch-myeloischer Leukämie-^{184, 185, 188}, T-Zell-Leukämie-¹⁶⁸ und Glioblastom-Zelllinien¹⁷⁶ spielen. CaMKIIs regulieren dabei cdc25-Phosphatasen durch inhibitorische Phosphorylierung und verhindern so die Aktivierung von phosphoryliertem cdc2 durch cdc25. Phosphoryliertes cdc2 im Komplex mit Cyclin B arretiert den Zellzyklus an der G₂/M-Grenze. Ionenkanal-„Targeting“ in bestrahlten Glioblastom- und Leukämiezellen hemmt beschriebenermaßen die CaMKII-Aktivierung, wodurch es zur cdc25-vermittelten Dephosphorylierung und Aktivierung von cdc2 und damit zur Aufhebung des Zellzyklusarrests kommt^{160, 168, 176, 184}. Diese Zellzyklusarrest-Verkürzung bewirkt, dass die bestrahlten Zellen mit unfertiger DNA-DSB-Reparatur in die Mitose eintreten, wodurch das klonogene Überleben vermindert wird^{160, 176}.

4.6.3 Ca²⁺-Signalling und Reparatur radiogener DNA-Schäden.

Über die Zellzykluskontrolle hinausgehend kann radiogenes Ca²⁺-Signalling direkt die DNA-Reparatur steuern. In A549-Lungenadenokarzinomzellen verzögert die Inhibition oder der Knockdown bestimmter Ca²⁺-permeabler nichtselektiver Kationenkanäle die Aktivierung der Serine/Threonine Kinase Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) oder die Akkumulation von Tumor suppressor p53-binding protein 1 (53BP1) an den DNA DSBs^{189, 190}. ATM erkennt DNA-Doppelstrangbrüche und leitet die DNA Schadensreparatur ein (Übersichtsartikel in¹⁹¹). In analoger Weise wurde in Nicht-Kleinzelligen Lungenkrebszellen (NSCLC) die $\alpha\delta 1$ -Untereinheit eines spannungsgesteuerten Ca_v-Kanals (CACNA2D1) als ein „upstream“ Ereignis der ATM-Aktivierung identifiziert. Die Überexpression von CACNA2D1 in NSCLC beschleunigt die DNA-DSB-Reparatur und verleiht Strahlenresistenz¹⁹².

4.6.4 Ca²⁺-Signaltransducer-Proteine.

Molekulare Schnittstelle zwischen Ca²⁺- und biochemischem Signalling stellt die niedermolekulare Ca²⁺-sensitive S100-Proteinfamilie dar. S100-Proteine werden gewebe- und zelltypspezifisch exprimiert und besitzen zwei Ca²⁺-bindende Helix-Loop-Helix-EF-Hand-Motive. Sie agieren häufig als Dimere und ähneln somit dem ubiquitär exprimierten Calmodulin mit seinen vier EF-Hand-Motiven¹⁹³. In der menschlichen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT wurde nachgewiesen, dass DNA-Schäden die Nucleolin-vermittelte Translokation von S100A11 in den Zellkern induzieren¹⁹⁴, wo es zusammen mit Rad54B an DNA-DSBs lokalisiert¹⁹⁵. Darüber hinaus bildet S100A11 in HaCaT-Zellen Berichten zufolge Komplexe mit RAD51 an DNA-Reparaturstellen. Die Herunterregulierung von S100A11 verzögert den Schwesterchromatidaustausch¹⁹⁶ und deutet somit auf seine Rolle bei der Rad54/RAD51-abhängigen DSB-Reparatur durch Homologe Rekombination¹⁹⁷.

Neben der homologen Rekombination wird auch die DNA DSB-Reparatur durch Nicht-homologes End-Joining (NHEJ) über Ca²⁺-Signale reguliert. Die Ca²⁺-Permeabilisierung der Plasmamembran der spontan immortalisierten menschlichen Brustepithelzelllinie MCF-10 stimuliert nachweislich die proteolytische Spaltung von K80 durch die nukleär translozierte Calcium-aktivierte Protease m-Calpain. Die gespaltene Form von Ku80 heterodimerisiert mit Ku70 und initiiert NHEJ durch Rekrutierung und Aktivierung von DNA-PKcs an den Ort der DNA-Schädigung¹⁹⁸.

Isoformen der CaMKII-Kinasen fungieren als weitere Ca²⁺-Signaltransducer-Proteinen bei der DNA-Schadensreparatur indem sie PARPs regulieren¹⁹⁹. PARPs erkennen und initiieren die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen²⁰⁰. Letztlich wurde gezeigt, dass Annexin-A3, ein Mitglied der Familie der Ca²⁺-abhängigen Phospholipid-bindenden Proteine, bei Nasopharynxkarzinomen die radiogene EGFR-Aktivierung und -Translokation in den Zellkern hemmt, wodurch die nachgeschaltete DNA-PKcs-Aktivierung verringert und die DNA DSB-Reparatur durch NHEJ beeinträchtigt wird²⁰¹.

4.6.5 IK_{Ca}-zielgerichtete Therapie.

Diese publizierten Daten zur Ca²⁺-Regulation der DNA-Schadensantwort kombiniert mit den Befunden der vorliegenden Arbeit und eines älteren Projekts meiner Arbeitsgruppe in Tübingen zur TTFields-induzierten Aktivierung von Ca_v Ca²⁺-Kanälen⁹⁷ könnten darauf hindeuten, dass in den pGSCs TTFields-induziertes Ca²⁺-Signalling an der beobachteten TTFields-assoziierte Radioresistenz beteiligt ist. Diese Hypothese wird zum einen gestützt durch den Umstand, dass in TA4 pGSCs die Hemmung von dem Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanals IK_{Ca} die Radioresistenz-auslösende TTFields-Wirkung abschwächte. Zum anderen legt auch die IK_{Ca}-Abhängigkeit der tumoriziden TTFields-Wirkung in TA11- und TA16-pGSCs ein durch TTFields ausgelöstes Ca²⁺-Signalling nahe. Hieraus lässt sich eine duale Rolle von IK_{Ca} als Resistenzfaktor von TTFields- und Strahlentherapie ableiten. Obwohl IK_{Ca} in sehr vielen Geweben, so auch in Immunzellen exprimiert wird²⁰², ist der Kanal „druggable“. In klinischen Studien zur Sichelzellanämie wurde der potente IK_{Ca}-Inhibitor Senicapoc sehr gut von den Patienten vertragen^{203, 204}. Auch scheint ein pharmakologisches IK_{Ca}-Targeting die Antitumor-Immunantwort in syngenem Glioblastom-Mausmodellen nicht zu schwächen^{151, 157, 205}. Somit wäre IK_{Ca}-„Targeting“ auch in der klinischen Situation eine Option, Glioblastome für TTFields zu sensibilisieren bzw. ungewollte TTFields-vermittelte Radioresistenz zu unterbinden.

4.7 Transkriptom

Die Auswirkungen von TTFields auf das Transkriptom von fraktioniert bzw. scheinbestrahlten TA11 und TA16 pGSCs ergaben jedoch keine, in beiden pGSC-Kulturen übereinstimmenden, Hinweise auf eine TTFields-abhängige differentielle Expression von Ionenkanälen/-Pumpen/-Transporter des Signalosoms. Ebenso unterschieden sich fast alle weiteren TTFields-abhängig differentiell-exprimierten Transkripte zwischen TA11 und TA16 pGSCs (siehe Abb. 27, blaue Symbole). Einzig ein Transkript des USP6NL-Gens wurde in beiden fraktioniert bestrahlten pGSC-Kulturen durch TTFields hochreguliert. USP6NL fungiert als GTPase-aktivierendes Protein kleiner monomer GTPasen der Ras-Superfamilie wie Rab5²⁰⁶, Rab41²⁰⁷ oder Rab43²⁰⁸. USP6NL reguliert Endosomen-Trafficking in der Endozytose^{208, 209}, Actin-Remodelling²⁰⁶, Turnover von fokalen Adhäsionen und Zellmigration²¹⁰, wirkt mit bei der Golgi Organisation²⁰⁹ und ist assoziiert mit Alzheimer Demenz²¹¹. USP6NL fördert zudem die maligne Progression und Tumorizität bei Mamma-^{212, 213}, kolorektalen-²¹⁴⁻²¹⁶ und Magenkarzinomen²¹⁷. Insbesondere hemmt es die Internalisierung von EGFR^{218, 219}. Bei Mammakarzinomen wurde gezeigt, dass diese verzögerte EGFR-Internalisierung und -Degradation und die daraus resultierende anhaltende chronische AKT-Aktivierung und nachfolgende Stabilisierung des Glukose-Uniporters Glut1 die aerobe Glykolyse und Laktatgärung bei Brustkrebszellen fördert²¹². Analog wurde für das Glioblastom *in vivo* und *in vitro* eine positive Assoziation zwischen USP6NL und EGFR und einem Temozolomid-resistenten, stark migrierenden und invasiven Phänotyp beschrieben. Herunterregulierung von USP6NL verringerte die DNA Schadensreparatur und erhöhte dabei die Temozolomid-Sensitivität²²⁰.

Damit könnten diese Literaturbefunde einen ersten Hinweis darauf geben, dass die in fraktioniert bestrahlten TA11 und TA16 pGSCs beobachtete TTFields-induzierte Hochregulation eines USP6NL-Transkripts zur TTFields-vermittelten Radioresistenz (siehe Abb. 13) mit beitragen könnte. Zudem prognostizierten Anreicherungsanalysen genregulatorischer (siehe Abb. 28) und Signaltransduktions-Netzwerke (siehe Tabelle 2) die TTFields-Modulation von z.B. Zell-Survival und Proliferation in unbestrahlten TA11 pGSCs bzw. von Signalwegen wie z.B. Wnt-, AMP-abhängige Kinase (AMPK)-, PI3K-AKT-, RAS-, oder mTOR-Signalling in unbestrahlten und/oder bestrahlten TA11 und/oder TA16 pGSCs. In Übereinstimmung mit den Literaturdaten (siehe Einleitung) weisen diese Projektionen somit auf ein wahrscheinliches Eingreifen der TTFields in multiple Signalwege und zelluläre Prozesse

hin. Darüberhinaus deuten diese Analysen auf eine hohe interindividuelle Heterogenität der TTFields-Wirkung im Glioblastom hin, welche im übernächsten Kapitel (Kapitel 4.9) näher diskutiert wird.

4.8 Immunsystem

In der vorliegenden Arbeit wurde das in meiner Arbeitsgruppe in Tübingen etablierte CAR-NK-Zell Lyse-Testsystem verwendet, um den Einfluss einer TTFields Vorbehandlung der CAR-NK-Zellen bzw. einer TTFields-Behandlung während der Lyse auf die Eliminierung von Glioblastomzellen durch NK-Zellen zu analysieren. NK-Zellen, als Vertreter des angeborenen Immunsystems erkennen und lysieren Glioblastomzellen z.B. über deren herunterregulierten MHC-Klasse-I Oberflächenexpression. Dabei sezernieren NK-Zellen Interferone, Perforine und Granzyme und induzieren das Hochregulieren der Todesrezeptoren wie Fas-Ligand und TRAIL in der Glioblastomzelle. Zudem unterstützen sie die T-Zell-vermittelte Tumorimmunität, indem sie die Antigenexpression der Glioblastomzellen induzieren, die Aktivität der dendritischen (DC)-Zellen aufrechterhalten und die T-Zell-Infiltration fördern. Entsprechend assoziieren genetische NK-Zell-Signaturen im Tumor mit dem Überleben der Patienten. Aufgrund des hoch-immunsuppressiven Tumormikromilieus birgt das immunologisch „kalte“ Glioblastom jedoch nur minimale NK-Zell-Infiltration, auch wenn diese die T-Zell-Infiltration übersteigt (Übersichtsartikel in ²²¹).

NK-Zell-basierte adoptive Immuntherapien stellen aussichtsreiche Konzepte für zukünftige Behandlungen von Glioblastompatienten dar. Identifizierung und Blockade von NK-Zell-Immun-Checkpoints und spezifisches „Targeting“ von Glioblastom-assoziierten Antigenen durch Transduktion von chimären Antigenrezeptoren (CAR) erlauben die hohe lytische Kapazität der NK-Zellen therapeutisch auszunützen. Die geringe zu erwartende „Graft-versus-Host“ Reaktion von NK-Zellen ermöglichen zudem eine allogene "off-the-Shelf" Transplantation von proliferations-inaktivierten immortalisierten NK-Zelllinien wie sie die CD276-gerichteten CAR-NK-92-Zelllinie darstellt (Übersichtsartikel in ²²²)

Die vorliegende Arbeit ergab - analog zu den in der Literatur beschriebenen Effekten in T-Zellen (siehe Einleitung) - keine Hinweise auf eine Störung der CAR-NK-92-Funktion durch TTFields, weder im Vorbehandlungsmodus noch während der Glioblastomzelllyse. Bei letzterem wurde sogar eine leicht TTFields-induzierte Verbesserung der Lyse beobachtet (siehe Abb. 29). Damit deuten diese Befunde auf die Möglichkeit, TTFields mit zukünftigen CAR-NK-Zell-Therapien beim Glioblastom zum kombinieren.

4.9 Patienten-individuelle Unterschiede

In den funktionellen Tests (klonogenes Überleben, Radioresistenz; DNA-Reparatur, TRAM-34-Sensitivität) und in den Transkriptom-Analysen der vorliegenden Arbeit unterschieden sich die TTFields-induzierten Effektstärken zwischen den individuellen pGSC-Kulturen. Dies lässt sich am ehesten durch patientenindividuelle biologische Unterschiede zwischen den in Kultur genommenen Glioblastomzellen erklären. Tatsächlich wurden im Glioblastom verschiedene molekulare Subklassen identifiziert, die sich bezüglich GSC-Eigenschaften, Treibermutationen und Prognose deutlich unterscheiden.

4.9.1 Molekulare Glioblastom Subklassen

Über Genom- und Transkriptomdaten konnten letztendlich drei diskrete (proneural, klassisch und mesenchymal) molekulare Subklassen des Glioblastoms identifiziert werden ^{1, 223, 224}. Patienten mit eindeutig einer molekularen Subklasse zuordenbaren Tumoren unterscheiden sich in ihrem

medianen Gesamtüberleben (proneural > klassisch > mesenchymal) ²²⁴. In einem umgekehrten Ansatz ließen sich über die Assoziation mit dem Patienten-Überleben prognostische Epigenom- (DNA-Methylierungscluster 1-3) und Transkriptom- (mitotisch, intermediär und invasiv) Subklassen des Glioblastoms definieren. Hier zeigten die invasive Transkriptomklasse und die DNA-Methylierungsklasse-3, welche in der mesenchymalen Subklasse angereichert ist, die schlechteste Krankheitsprognose ^{225, 226}. Letztlich belegten frühere Arbeiten meiner Arbeitsgruppe in Tübingen, dass Glioblastome mit einer mesenchymalen, invasiven pGSC-Signatur distanter rezidivieren und mit einer schlechteren Patienten-Prognose assoziieren als Tumoren mit einer proneuralen Signatur ^{8, 9}. Das Glioblastom zeigt somit eine hohe intertumorale Heterogenität. Letztere lässt sich auf heterogene onkogenetische Prozesse während der malignen Transformation zurückführen

4.9.2 Treibermutationen

In Glioblastomen liegen gehäuft Einzelkopie-Deletionen in Chromosom-10 (Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN)) und Amplifikationen in Chromosom-4 (PDGFRA, Platelet-derived Growth Factor Receptor-A), in Chromosom-7 (Cyclin-dependent Kinase-6 (CDK6), Hepatocyte Growth Factor receptor (HGFR) und EGFR), in Chromosom-12 (Mouse double minute-2 Homolog (MDM2), Cyclin-dependent Kinase 4 (CDK4)), und in den Chromosomen-19 und -20 vor. Somatische Mutationen in Telomerase reverse Transkriptase-Promoter (TERTp, als eines der frühen Ereignisse in der malignen Transformation), TP53, EGFR (EGFRvIII), PTEN, Neurofibromin-1 (NF1), PI3K catalytic Subunit alpha Isoform (PIK3CA)), PI3K regulatory Subunit alpha (PIK3R1), Retinoblastoma-associated Protein 1 (RB1), Spectrin alpha Chain, Erythrocytic-1 (SPTA1), α -Thalassemia/mental Retardation Syndrome X-linked (ATRX), KEL (Kell Blood Group Glycoprotein), PDGFRA (Platelet-derived Growth Factor Receptor A), und GABRA6 (Gamma-aminobutyric Acid Receptor Subunit alpha-6) wurden als häufige Treiber bzw. Begleit(Passanger)-Mutationen erkannt. Proneurale Tumoren weisen dabei gehäuft Veränderungen in PI3K, PDGFRA, TP53 auf. PTEN Deletionen und EGFR Amplifikation sowie seltener TP53 Mutationen kennzeichnen klassische Glioblastome. Mesenchymale Glioblastome besitzen dagegen eine hohe NF1 Mutationslast (Übersichtsartikel in ²²⁷).

Diese intertumorale Heterogenität in der Biologie des Glioblastoms bedeutet auch, dass Glioblastompatienten wahrscheinlich sehr heterogen auf eine TTFields-Therapie ansprechen. Um so wichtiger ist es demnach, molekulare Wirk- und/oder Resistenz-Mechanismen zu kennen, um mit diesem Wissen, Patienten für die TTFields-Therapie zu stratifizieren oder auch TTFields-Resistenzen bei TTFields-Therapie-refraktären Patienten pharmakologisch durchbrechen zu können.

4.10 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit bestätigt unter isoosmotischen und isothermen TTFields-Applikationsbedingungen die tumorizide Wirkung der elektrischen Wechselfelder im Glioblastom. Im vollkommenen Gegensatz zu Berichten anderer Arbeitsgruppen konnte eine radiosensibilisierende TTFields-Wirkung nicht nachgewiesen werden. Im Gegenteil, TTFields induzierten in den verwendeten pGSC-Modellen Radioresistenz. Eine zur Temozolomid-Radiotherapie konkomitante Anwendung von TTFields könnte sich daher sogar nachteilig für die Glioblastompatienten auswirken.

Die vorliegende Arbeit liefert zudem Hinweise auf einen alternativen molekularen Mechanismus der elektro-biologischen Transduktion von TTFields: externe elektrische Wechselfelder steigerten die Aktivität von Ca^{2+} -abhängigen IK_{Ca} K^+ -Kanälen. In der Signalkette upstream von IK_{Ca} könnten dabei spannungsgesteuerte Ca_v Ca^{2+} -Kanäle als molekulare „Receiver“ von externen Feldstärken-Änderungen agieren. Downstream von IK_{Ca} , einem wichtigen Modul des Ca^{2+} -Signalosoms in

Glioblastomzellen, stehen nachgewiesenerweise Ca^{2+} -Effektorproteine, die zur Zellzyklus-Kontrolle, DNA-Schadensreparatur oder Zellmigration/Gehirninvasion beitragen.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Blockierung von IK_{Ca} mit TRAM-34 die tumorizide TTFields-Wirkung in 2 von 3 untersuchten pGSC-Kulturen gesteigert und die TTFields-vermittelte Radioresistenz in 1 von 3 Kulturen abgeschwächt werden. Somit kann IK_{Ca} als Faktor beschrieben werden, der im Rahmen der zellulären TTFields-Stressantwort, das Überleben der Glioblastomzelle steigert.

Letztlich verdeutlichte die vorliegende Arbeit die Heterogenität der patienten-individuellen TTFields-Effekte im Glioblastom. Übersetzt in die klinische Situation sind daher große Unterschiede in den Ansprechraten einer TTFields-Therapie zu erwarten. Mit IK_{Ca} stellt die vorliegende Arbeit einen möglichen Kandidaten für einen Prognosefaktor vor, über dessen Glioblastom-Abundanz in Zukunft Patienten möglicherweise für eine TTFields-Therapie stratifiziert werden könnten. Auch wäre eine TTFields-Sensibilisierung bzw. eine Blockade einer TTFields-induzierten Radioresistenz durch systemische Ko-Applikation des IK_{Ca} -Inhibitors Senicapoc denkbar.

Für eine zukünftige Therapiestratifizierung und/oder Überwindung von TTFields-Resistenzen braucht es aber mehr und vor allem robustere präklinische Daten - Daten über die genauen molekularen Mechanismen der vermutlich multiplen TTFields-Effekte im Glioblastom, dem zugrundeliegenden Signalling und der dadurch modulierten Tumorbiologie und -Physiologie. Insbesondere könnten hierzu genregulatorische und Signaltransduktionsnetzwerke, die - wie auch in der vorliegenden Arbeit - durch Omics-Daten als TTFields-abhängig reguliert prognostiziert wurden, biochemisch verifiziert und deren funktionelle Signifikanz dann in Knock-out/-down Experimenten analysiert werden. Eine weitere Strategie wäre Prognosemarker für ein TTFields-Ansprechen aus der retrospektiven Assoziation von Patientenüberleben und biochemischen/molekularbiologischen Daten von Glioblastomresektaten oder patientenstämmigen Glioblastomkulturen zu identifizieren. Bis dies aber in hoffentlich nicht allzu langer Zeit so weit sein wird, bleibt die Antitumor-Therapie mit elektrischen Wechselfeldern, abgesehen von ihrer inzwischen von der Scientific Community weitestgehend anerkannten Wirksamkeit, ein biologisches Mysterium.

4.11 Limitationen

Die vorliegende Arbeit hat folgende technisch-methodische, biologische und inhaltliche Fehleranfälligkeiten bzw. Limitationen.

4.11.1 Technisch-methodisch

Mit dem verwendeten TTFields-Applikationssystem war es leider nicht möglich, die eingestrahlten Feldstärken direkt während eines Experiments zu monitorieren. Wegen der niedrigen Permittivität von Luft bedingen schon kleine Änderungen in der Plattenkondensator-Geometrie des Elektrodenplatten/Multiloch-Zellkulturplatten/Mediumssäulen-Sandwichs signifikante Feldstärkenänderungen im Medium. Obwohl hier immer versucht wurde, die Geometrie der Testplatten für die Feldstärken- und Temperaturmessung genauertens in den biologischen Experimenten nachzustellen, wäre ein direktes „Real-Time“-Monitoring von den elektrischen Feldstärken wünschenswert gewesen.

Das klonogene Überleben von frei flottierenden Zellen bzw. daraus entstehenden Sphäroiden kann nicht wie bei adherent wachsenden Zellen mittels Koloniebildungstest durch Auszählen der sich bildenden Zellkolonien bestimmt werden. Stattdessen wurde mit dem „Limited Dilution Assay“ (LDA) in einem Alles-oder-Nichts-„Read-out“ das Überleben sequentiell 1:2-verdünnter Zellen detektiert,

wodurch die daraus resultierenden Größenunterschiede der Messdaten von Faktor $1/2^n$ große Datenstreuungen verursachten.

4.11.2 Biologisch

Die Transkriptom-Hauptkomponentenanalyse (siehe Abb. 25) deuten darauf hin, dass sich entgegen früherer Beobachtungen ⁸ die pGCS-Kulturen während längerem Passagierens biologisch veränderten. Da alle Experimente mit mehreren Passagen durchgeführt wurden, verringert diese passagenbedingte Varianz zwangsläufig die Wahrscheinlichkeit, TTFields-bedingte Unterschiede zu identifizieren.

4.11.3 Inhaltlich

TTFields werden in der Klinik in Studien und Standardtherapie konkomitant zur Temozolomid-Radiotherapie bzw. Temozolomid-Erhalt-Chemotherapie appliziert. Obwohl ursprünglich geplant, war es in der vorliegenden Arbeit wegen der limitierten Anzahl von benötigten Gerätschaften (TTFields-Generator, Brutschränke etc.) und den langen Nachbeobachtungszeiten im LDA (28 Tage) nicht möglich, eventuelle Temozolomid-sensibilisierende oder -Resistenz-vermittelnde Effekte der TTFields in der für dieses Projekt zur Verfügung stehenden Zeitspanne von 3 Jahren zu untersuchen. Folglich ergeben sich Einschränkungen für die klinische Relevanz der hier vorgestellten Ergebnisse.

5 Zusammenfassung

Das Gehirn-infiltrierende Wachstum und die hohe Therapieresistenz von Glioblastoma multiforme, dem häufigsten primären Hirntumor bei Erwachsenen, bedingt eine sehr schlechte Prognose für die Glioblastom-Patienten mit einem medianen Überleben von unter zwei Jahren. TTFields, eine von der Firma Novocure in Haifa entwickelte Elektrotherapie mit schwachen (1-3 V/cm) elektrischen 200 kHz Wechselfeldern, wird bei Glioblastom-Patienten optional adjuvant (nach chirurgischer Tumorresektion und Radiochemotherapie mit Temozolomid) zusammen mit der Temozolomid Erhaltungstherapie eingesetzt. Eine multizentrische Studie untersucht derzeit bei Glioblastom-Patienten den Benefit von TTFields konkomitant zur Radiochemotherapie. Hinweise für eine radiosensibilisierende Wirkung von TTFields ergaben hierzu *in vitro*-Daten die mehrheitlich mit dem Inovitro-System der Firma Novocure an Glioblastom-Zelllinien erhoben wurden. Das Inovitro-System hat allerdings den Nachteil, dass es systembedingt durch die TTFields-Applikation, nicht aber bei den Kontrollzellen, die Osmolarität des Zellkulturmediums erhöht, und so nicht zwischen TTFields- und Osmolaritätseffekten unterschieden werden kann. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, ein TTFields-*in vitro*-Applikationssystem zu entwickeln, das klinisch relevante Feldstärken ohne Osmolaritätserhöhung des Mediums appliziert und die beschriebenen tumoriziden und radiosensibilisierenden Eigenschaften der TTFields an - in diesem Fall - patientenstämmigen Glioblastomstammzell-anreichernden Kulturen (pGSCs) zu überprüfen.

Molekulares Dipol-Alignment und Dielektrophorese an der Zellteilungsfurche wurden als biologische Mechanismen der TTFields-Wirkung in der Literatur postuliert, die das Ausbilden des Spindelapparats während der Mitose bzw. die symmetrische Verteilung von Zellkomponenten während der Zytokinese behindern. Bemerkenswerterweise können manche Fischarten elektrische Gleich- oder Wechsel-Felder mit speziellen Organen perzeptieren deren Feldstärken weit unter denen der TTFields-Therapie liegen. Da hierbei als „molekulare Antennen“ spannungsaktivierte Ionenkanäle und resultierende Ca^{2+} -Signale fungieren, und eine TTFields-induzierte Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen in einer früheren Arbeit direkt gezeigt werden konnte, untersuchte diese Arbeit als zweites Ziel eine TTFields-induzierte Aktivierung von IK_{Ca} - und $\text{BK}_{\text{Ca}}\text{-K}^+$ -Kanälen in pGSCs als weiterer bzw. alternativer molekularer Mechanismus der Elektrotherapie-Wirkung im Glioblastom.

Sind weitere molekulare Wirk- und/oder Resistenzmechanismen der TTFields-Therapie bekannt, könnten Patienten über Sensitivitäts- bzw. Resistenzmarker des Glioblastoms für eine TTFields-Therapie stratifiziert bzw. sensibilisiert werden, letzteres durch pharmakologische Blockade der identifizierten Resistenzmechanismen. Ein drittes Ziel dieser Arbeit war daher über differentielle Transkriptom-Analysen, TTFields-regulierte mRNAs in unbestrahlten und bestrahlten pGSC-Kulturen zu identifizieren, um so Hinweise über weitere TTFields-modifizierte Signalwege zu erlangen.

Das Glioblastom stellt einen immunologisch „kalten“ Tumor dar. Die Patientenprognose korreliert dabei mit der Anzahl der in den Tumor eingewanderten CD8^+ zytotoxischen T-Zellen, wodurch sich Therapien zur Überwindung der Immunsuppression im Glioblastom anbieten. Auch wenn bisher klinische Studien hierzu negativ verliefen, untersuchte diese Arbeit als letztes Ziel die Auswirkungen von TTFields auf die anti-Glioblastom-Immunabwehr exemplarisch an der Lyse von pGSCs durch CD276 -gerichtete CAR-NK-Zellen.

Methodisch wurden aus resezierten Tumorproben pGSC-Kulturen angelegt und bezüglich ihrer mesenchymal-proneuralen Stammzell-Signaturen und Radioresistenz charakterisiert. TTFields wurden mit einem neu entwickelten TTFields-Generator unter Temperatur- und Osmolaritäts-Konstanz zusammen mit ionisierender Strahlung (0, 2, oder 4 Gy) einmal über 24 h, oder fraktioniert über 5 Tage appliziert. Als Messgrößen wurde das klonogene Überleben in „Limited Dilution Assays“, der Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie, die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur durch Zählen der

nukleären residualen $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ -Foci in der Immunfluoreszenz sowie die Aktivierung von IK_{Ca} - und BK_{Ca} K^+ -Kanälen während TTFIELDS-Einzelzell-Applikation im Patch-Clamp-Verfahren analysiert. Die Funktionen der IK_{Ca} - und BK_{Ca} K^+ -Kanäle für die beobachteten TTFIELDS-Effekte wurde durch Knockdown mittels siRNA und/oder durch pharmakologische Kanalmodulation definiert. Transkriptomanalysen wurden mittels RNA-Sequencing (Illumina NovaSeq® 6000) an zwei ausgewählten pGSC-Kulturen in Abhängigkeit von fraktionierter TTFIELDS-Applikation und Bestrahlung durchgeführt. Die Analyse von TTFIELDS-modulierten Pathways erfolgte mit dem Online Tool „NetworkAnalyst“ Version 3.0 (<https://www.networkanalyst.ca/>). Die Effekte von TTFIELDS auf die Lyse von pGSC-Kulturen durch CD276-gerichtete CAR-NK92-Zellen wurden in Calcein-Freisetzungsexperimenten in Abhängigkeit von gleichzeitiger bzw. vorgeschalteter TTFIELDS-Behandlung der NK-Zellen determiniert.

Als Ergebnis deutete ein in unterschiedlichen Ausmaßen verringertes klonogenes Überleben der pGSC-Kulturen auf die tumorizide Wirkung einer ein- bzw. fünftägigen TTFIELDS-Behandlung. Anders wie in der Literatur beschrieben, erhöhten TTFIELDS in den pGSC-Kulturen die Überlebensfraktion nach Einzel- und fraktionierter Bestrahlung. Diese Radioresistenz-vermittelnde Wirkung ging in einer von zwei daraufhin getesteten pGSC-Kulturen mit einer erniedrigten Anzahl von residualen nukleären $\gamma\text{H}_2\text{Ax}$ -Foci 24 h nach Bestrahlung einher, indikativ für eine TTFIELDS-induzierte Verbesserung der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur in dieser Kultur. Signifikante TTFIELDS-assoziierte Veränderungen des Zellzyklus wurden weder in Kontroll- noch in bestrahlten pGSC-Kulturen beobachtet.

Akute TTFIELDS-Einzelzell-Applikation erhöhte in zwei von zwei daraufhin untersuchten pGSC-Kulturen die Aktivität von Ca^{2+} -aktivierten IK_{Ca} K^+ -Kanälen. Inhibition der IK_{Ca} Kanäle mit TRAM-34 verstärkte die tumorizide in zwei und erniedrigte die Radioresistenz-vermittelnde TTFIELDS-Effekte in einer von jeweils drei getesteten pGSC-Kulturen. Hemmung der BK_{Ca} K^+ -Kanäle hatte dagegen keinen Einfluss auf die tumorizide und Radioresistenz-vermittelnde TTFIELDS-Wirkung.

Transkriptomanalysen zweier ausgewählter pGSC-Kulturen deuteten auf TTFIELDS-regulierte Transkripte hin. Übereinstimmungen zwischen beiden Kulturen ergaben sich hierbei nur nach fraktionierter Bestrahlung für USP6NL (Ubiquitin-Specific Protease 6 n-Terminal-like Protein), einem Regulator von monomeren GTPasen der Ras-Superfamilie. Anreicherungsanalysen von Signaltransduktions-Netzwerken prognostizierten für beide pGSC-Kulturen verschiedene TTFIELDS-modifizierte Signalwege wie z.B. Wnt-Signalling, jeweils in unbestrahlten als auch in und fraktioniert bestrahlten Kulturen Überschneidungen nur in verschiedenen Signalwegen.

Letztlich zeigten die Analyse der pGSC-Zellyse durch CD276-gerichtete CAR-NK-Zellen, dass TTFIELDS-Vorbehandlung der CAR-NK-Zellen keinen Einfluss auf die Lyse, TTFIELDS Applikation während der CAR-NK/pGSC-Kokultivierung eine leichte Steigerung der pGSC-Lyse hervorruft.

Aus den funktionellen und Transkriptom-Daten lässt sich schlussfolgern, dass die individuellen patientenstämmigen und stammzellangereicherten Glioblastom-Zellkulturen unterschiedlich auf klinisch relevante TTFIELDS-Elektrotherapie reagieren. Die hier beobachteten Radioresistenz-erhöhende Effekte der TTFIELDS sprechen gegen eine Kombination von TTFIELDS mit der fraktionierten Radiotherapie in der Klinik. Sowohl bei der tumoriziden als auch der Radioresistenz-erhöhende Wirkung könnten Ca^{2+} -aktivierte IK_{Ca} K^+ -Kanäle beteiligt sein. Für Letzteres wurde eine funktionelle Signifikanz von IK_{Ca} für die Radioresistenz des Glioblastoms und weiteren Tumorentitäten in der Literatur berichtet. Mechanistisch könnte in manchen pGSC-Kulturen eine verbesserte DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur zur TTFIELDS-induzierten Radioresistenz beitragen. Auch wenn hier mit den CAR-NK-Zellen ein sehr artifizielles Modell einer anti-Glioblastom-Immunantwort verwendet wurde, so sprechen die pGSC-Lyse-Daten zumindest nicht gegen eine Kombination von TTFIELDS und zukünftig möglicher Immuntherapie.

6 Literatur

1. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006;**9**: 157–73.
2. von Bueren AO, Bacolod MD, Hagel C, Heinimann K, Fedier A, Kordes U, Pietsch T, Koster J, Grotzer MA, Friedman HS, Marra G, Kool M, et al. Mismatch repair deficiency: a temozolomide resistance factor in medulloblastoma cell lines that is uncommon in primary medulloblastoma tumours. *Br J Cancer* 2012;**107**: 1399–408.
3. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;**352**: 987–96.
4. McBain C, Lawrie TA, Rogozińska E, Kernohan A, Robinson T, Jefferies S. Treatment options for progression or recurrence of glioblastoma: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev* 2021;**5**: Cd013579.
5. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;**352**: 997–1003.
6. Chai RC, Chang YZ, Wang QW, Zhang KN, Li JJ, Huang H, Wu F, Liu YQ, Wang YZ. A Novel DNA Methylation-Based Signature Can Predict the Responses of MGMT Promoter Unmethylated Glioblastomas to Temozolomide. *Front Genet* 2019;**10**: 910.
7. Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med* 2017;**23**: 1124–34.
8. Ganser K, Eckert F, Riedel A, Stransky N, Paulsen F, Noell S, Krueger M, Schittenhelm J, Beck-Wödl S, Zips D, Ruth P, Huber SM, et al. Patient-individual phenotypes of glioblastoma stem cells are conserved in culture and associate with radioresistance, brain infiltration and patient prognosis. *Int J Cancer* 2022;**150**: 1722–33.
9. Eckert F, Ganser K, Bender B, Schittenhelm J, Skardelly M, Behling F, Tabatabai G, Hoffmann E, Zips D, Huber SM, Paulsen F. Potential of pre-operative MRI features in glioblastoma to predict for molecular stem cell subtype and patient overall survival. *Radiother Oncol* 2023;**188**: 109865.
10. Sarfraz Z, Maharaj A, Venur VA, Lathia JD, Odia Y, Ahluwalia MS. Immunotherapy in Glioblastoma: An Overview of Current Status. *Clin Pharmacol* 2025;**17**: 185–209.
11. Fu X, Shi D, Feng Y. The Efficacy and Safety of Adjuvant Lomustine to Chemotherapy for Recurrent Glioblastoma: A Meta-analysis of Randomized Controlled Studies. *Clin Neuropharmacol* 2022;**45**: 162–7.
12. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, Taylor LP, Lieberman F, Silvani A, Fink KL, Barnett GH, Zhu JJ, et al. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Jama* 2015;**314**: 2535–43.
13. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, Toms S, Idbaih A, Ahluwalia MS, Fink K, Di Meco F, Lieberman F, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Jama* 2017;**318**: 2306–16.
14. Kanamori M, Tsuzuki S, Shibahara I, Saito K, Shimoda Y, Tanaka K, Yamaguchi S, Natsumeda M, Matsutani T, Hanihara M, Nakada M, Kuroda JI, et al. Impact of tumor-treating fields on the survival of Japanese patients with newly diagnosed glioblastoma: A multicenter, retrospective cohort study. *Neurooncol Adv* 2024;**6**: vdae176.
15. Vymazal J, Kazda T, Novak T, Slanina P, Sroubek J, Klener J, Hrbac T, Syrucek M, Rulseh AM. Eighteen years' experience with tumor treating fields in the treatment of newly diagnosed glioblastoma. *Front Oncol* 2022;**12**: 1014455.

16. She L, Gong X, Su L, Liu C. Effectiveness and safety of tumor-treating fields therapy for glioblastoma: A single-center study in a Chinese cohort. *Front Neurol* 2022;**13**: 1042888.
17. Lazaridis L, Bumès E, Căcilia Spille D, Schulz T, Heider S, Agkatsev S, Schmidt T, Blau T, Oster C, Feldheim J, Stummer W, Kessler AF, et al. First multicentric real-life experience with the combination of CCNU and temozolomide in newly diagnosed MGMT promoter methylated IDH wildtype glioblastoma. *Neurooncol Adv* 2022;**4**: vdac137.
18. Ballo MT, Qualls KW, Michael LM, Sorenson JM, Baughman B, Karri-Wellikoff S, Pandey M. Determinants of tumor treating field usage in patients with primary glioblastoma: A single institutional experience. *Neurooncol Adv* 2022;**4**: vdac150.
19. Chen C, Xu H, Song K, Zhang Y, Zhang J, Wang Y, Sheng X, Chen L, Qin Z. Tumor Treating Fields Combine with Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Retrospective Analysis of Chinese Patients in a Single Center. *J Clin Med* 2022;**11**.
20. Nishikawa R, Yamasaki F, Arakawa Y, Muragaki Y, Narita Y, Tanaka S, Yamaguchi S, Mukasa A, Kanamori M. Safety and efficacy of tumour-treating fields (TTFields) therapy for newly diagnosed glioblastoma in Japanese patients using the Novo-TTF System: a prospective post-approval study. *Jpn J Clin Oncol* 2023;**53**: 371–7.
21. Zhang L, Ren Y, Peng Y, Luo Y, Liu Y, Wang X, Yang Y, Liu L, Ai P, Yang X, Li Y, Mao Q, et al. Tumor treating fields for newly diagnosed high-grade glioma based on the criteria of 2021 WHO CNS5: A retrospective analysis of Chinese patients in a single center. *Cancer Med* 2024;**13**: e7350.
22. Riegel DC, Bureau BL, Conlon P, Chavez G, Connelly JM. Long-term survival, patterns of progression, and patterns of use for patients with newly diagnosed glioblastoma treated with or without Tumor Treating Fields (TTFields) in a real-world setting. *J Neurooncol* 2025;**173**: 49–57.
23. Takido Y, Ohka F, Deguchi S, Motomura K, Mitsuya K, Aoki K, Shiba Y, Takeuchi K, Nagata Y, Yamaguchi J, Kibe Y, Fuse Y, et al. Distant parenchymal recurrence during long-term use of TTFields treatment for glioblastoma. *Int J Clin Oncol* 2025.
24. Ballo MT, Urman N, Lavy-Shahaf G, Grewal J, Bomzon Z, Toms S. Correlation of Tumor Treating Fields Dosimetry to Survival Outcomes in Newly Diagnosed Glioblastoma: A Large-Scale Numerical Simulation-Based Analysis of Data from the Phase 3 EF-14 Randomized Trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2019;**104**: 1106–13.
25. Wang J, Du Q, Chen J, Liu J, Gu Z, Wang X, Zhang A, Gao S, Shao A, Zhang J, Wang Y. Tumor treating fields in glioblastoma: long-term treatment and high compliance as favorable prognostic factors. *Front Oncol* 2024;**14**: 1345190.
26. Glas M, Ballo MT, Bomzon Z, Urman N, Levi S, Lavy-Shahaf G, Jeyapalan S, Sio TT, DeRose PM, Misch M, Taillibert S, Ram Z, et al. The Impact of Tumor Treating Fields on Glioblastoma Progression Patterns. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2022;**112**: 1269–78.
27. Shi W, Blumenthal DT, Oberheim Bush NA, Kebir S, Lukas RV, Muragaki Y, Zhu JJ, Glas M. Global post-marketing safety surveillance of Tumor Treating Fields (TTFields) in patients with high-grade glioma in clinical practice. *J Neurooncol* 2020;**148**: 489–500.
28. Mrugala MM, Shi W, Iwamoto F, Lukas RV, Palmer JD, Suh JH, Glas M. Global post-marketing safety surveillance of Tumor Treating Fields (TTFields) therapy in over 25,000 patients with CNS malignancies treated between 2011-2022. *J Neurooncol* 2024;**169**: 25–38.
29. Guzauskas GF, Pollom EL, Stieber VW, Wang BCM, Garrison LP, Jr. Tumor treating fields and maintenance temozolomide for newly-diagnosed glioblastoma: a cost-effectiveness study. *J Med Econ* 2019;**22**: 1006–13.
30. Xiang Y, Chen Y, Xu Z, Zhou S, Qin Z, Chen L, Xiao D, Liu S. Real-world cost- effectiveness analysis: Tumor Treating Fields for newly diagnosed glioblastoma in China. *J Neurooncol* 2024;**168**: 259–67.
31. Palmer JD, Chavez G, Furnback W, Chuang PY, Wang B, Proescholdt C, Tang CH. Health-Related Quality of Life for Patients Receiving Tumor Treating Fields for Glioblastoma. *Front Oncol* 2021;**11**: 772261.

32. Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, Schatzberger R, Palti Y. Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer Res* 2004;**64**: 3288–95.
33. Giladi M, Schneiderman RS, Porat Y, Munster M, Itzhaki A, Mordechovich D, Cahal S, Kirson ED, Weinberg U, Palti Y. Mitotic disruption and reduced clonogenicity of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo by tumor treating fields. *Pancreatology* 2014;**14**: 54–63.
34. Giladi M, Schneiderman RS, Voloshin T, Porat Y, Munster M, Blat R, Sherbo S, Bomzon Z, Urman N, Itzhaki A, Cahal S, Shteingauz A, et al. Mitotic Spindle Disruption by Alternating Electric Fields Leads to Improper Chromosome Segregation and Mitotic Catastrophe in Cancer Cells. *Sci Rep* 2015;**5**: 18046.
35. Gera N, Yang A, Holtzman TS, Lee SX, Wong ET, Swanson KD. Tumor treating fields perturb the localization of septins and cause aberrant mitotic exit. *PLoS One* 2015;**10**: e0125269.
36. Gutin PH, Wong ET. Noninvasive application of alternating electric fields in glioblastoma: a fourth cancer treatment modality. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2012: 126–31.
37. Kirson ED, Dbaly V, Tovarys F, Vymazal J, Soustiel JF, Itzhaki A, Mordechovich D, Steinberg-Shapira S, Gurvich Z, Schneiderman R, Wasserman Y, Salzberg M, et al. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**: 10152–7.
38. Kirson ED, Schneiderman RS, Dbaly V, Tovarys F, Vymazal J, Itzhaki A, Mordechovich D, Gurvich Z, Shmueli E, Goldsher D, Wasserman Y, Palti Y. Chemotherapeutic treatment efficacy and sensitivity are increased by adjuvant alternating electric fields (TTFields). *BMC Med Phys* 2009;**9**: 1.
39. Schneiderman RS, Shmueli E, Kirson ED, Palti Y. TTFields alone and in combination with chemotherapeutic agents effectively reduce the viability of MDR cell sub-lines that over-express ABC transporters. *BMC Cancer* 2010;**10**: 229.
40. Giladi M, Weinberg U, Schneiderman RS, Porat Y, Munster M, Voloshin T, Blatt R, Cahal S, Itzhaki A, Onn A, Kirson ED, Palti Y. Alternating electric fields (tumor-treating fields therapy) can improve chemotherapy treatment efficacy in non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo. *Semin Oncol* 2014;**41 Suppl 6**: S35–41.
41. Voloshin T, Munster M, Blatt R, Shteingauz A, Roberts PC, Schmelz EM, Giladi M, Schneiderman RS, Zeevi E, Porat Y, Bomzon Z, Urman N, et al. Alternating electric fields (TTFields) in combination with paclitaxel are therapeutically effective against ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2016;**139**: 2850–8.
42. Karanam NK, Srinivasan K, Ding L, Sishc B, Saha D, Story MD. Tumor-treating fields elicit a conditional vulnerability to ionizing radiation via the downregulation of BRCA1 signaling and reduced DNA double-strand break repair capacity in non-small cell lung cancer cell lines. *Cell Death Dis* 2017;**8**: e2711.
43. Kirson ED, Giladi M, Gurvich Z, Itzhaki A, Mordechovich D, Schneiderman RS, Wasserman Y, Ryffel B, Goldsher D, Palti Y. Alternating electric fields (TTFields) inhibit metastatic spread of solid tumors to the lungs. *Clin Exp Metastasis* 2009;**26**: 633–40.
44. Castellvi Q, Ginesta MM, Capella G, Ivorra A. Tumor growth delay by adjuvant alternating electric fields which appears non-thermally mediated. *Bioelectrochemistry* 2015;**105**: 16–24.
45. Li J, Guo C, Wang Z, Gao K, Shi X, Liu J. Electrical stimulation towards melanoma therapy via liquid metal printed electronics on skin. *Clin Transl Med* 2016;**5**: 21.
46. Salzberg M, Kirson E, Palti Y, Rochlitz C. A pilot study with very low-intensity, intermediate-frequency electric fields in patients with locally advanced and/or metastatic solid tumors. *Onkologie* 2008;**31**: 362–5.
47. Pless M, Droege C, von Moos R, Salzberg M, Betticher D. A phase I/II trial of Tumor Treating Fields (TTFields) therapy in combination with pemetrexed for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013;**81**: 445–50.

48. Vergote I, von Moos R, Manso L, Van Nieuwenhuysen E, Concin N, Sessa C. Tumor Treating Fields in combination with paclitaxel in recurrent ovarian carcinoma: Results of the INNOVATE pilot study. *Gynecol Oncol* 2018;**150**: 471–7.
49. Porat Y, Giladi M, Schneiderman RS, Blat R, Shteingauz A, Zeevi E, Munster M, Voloshin T, Kaynan N, Tal O, Kirson ED, Weinberg U, et al. Determining the Optimal Inhibitory Frequency for Cancerous Cells Using Tumor Treating Fields (TTFields). *J Vis Exp* 2017.
50. Wong ET, Lok E, Swanson KD. Clinical benefit in recurrent glioblastoma from adjuvant NovoTTF-100A and TCCC after temozolomide and bevacizumab failure: a preliminary observation. *Cancer Med* 2015;**4**: 383–91.
51. Silginer M, Weller M, Stupp R, Roth P. Biological activity of tumor-treating fields in preclinical glioma models. *Cell Death Dis* 2017;**8**: e2753.
52. Chang E, Pohling C, Beygui N, Patel CB, Rosenberg J, Ha DH, Gambhir SS. Synergistic inhibition of glioma cell proliferation by Withaferin A and tumor treating fields. *J Neurooncol* 2017;**134**: 259–68.
53. Jo Y, Kim EH, Sai S, Kim JS, Cho JM, Kim H, Baek JH, Kim JY, Hwang SG, Yoon M. Functional Biological Activity of Sorafenib as a Tumor-Treating Field Sensitizer for Glioblastoma Therapy. *Int J Mol Sci* 2018;**19**.
54. Lee YJ, Cho JM, Sai S, Oh JY, Park JA, Oh SJ, Park M, Kwon J, Shin US, Beak JH, Lim SH, Song JY, et al. 5-Fluorouracil as a Tumor-Treating Field-Sensitizer in Colon Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 2019;**11**.
55. Clark PA, Gaal JT, Strebe JK, Pasch CA, Deming DA, Kuo JS, Robins HI. The effects of tumor treating fields and temozolomide in MGMT expressing and non-expressing patient-derived glioblastoma cells. *J Clin Neurosci* 2017;**36**: 120–4.
56. Shi P, Tian J, Ulm BS, Mallinger JC, Khoshbouei H, Deleyrolle LP, Sarkisian MR. Tumor Treating Fields Suppression of Ciliogenesis Enhances Temozolomide Toxicity. *Front Oncol* 2022;**12**: 837589.
57. Fishman H, Monin R, Dor-On E, Kinzel A, Haber A, Giladi M, Weinberg U, Palti Y. Tumor Treating Fields (TTFields) increase the effectiveness of temozolomide and lomustine in glioblastoma cell lines. *J Neurooncol* 2023;**163**: 83–94.
58. Meletath SK, Pavlick D, Brennan T, Hamilton R, Chmielecki J, Elvin JA, Palma N, Ross JS, Miller VA, Stephens PJ, Snipes G, Rajaram V, et al. Personalized Treatment for a Patient With a BRAF V600E Mutation Using Dabrafenib and a Tumor Treatment Fields Device in a High-Grade Glioma Arising From Ganglioglioma. *J Natl Compr Canc Netw* 2016;**14**: 1345–50.
59. Vargas-Toscano A, Nickel AC, Li G, Kamp MA, Muhammad S, Leprivier G, Fritsche E, Barker RA, Sabel M, Steiger HJ, Zhang W, Hänggi D, et al. Rapalink-1 Targets Glioblastoma Stem Cells and Acts Synergistically with Tumor Treating Fields to Reduce Resistance against Temozolomide. *Cancers (Basel)* 2020;**12**.
60. Kim JY, Jo Y, Oh HK, Kim EH. Sorafenib increases tumor treating fields-induced cell death in glioblastoma by inhibiting STAT3. *Am J Cancer Res* 2020;**10**: 3475–86.
61. Giladi M, Munster M, Schneiderman RS, Voloshin T, Porat Y, Blat R, Zielinska-Chomej K, Hååg P, Bomzon Z, Kirson ED, Weinberg U, Viktorsson K, et al. Tumor treating fields (TTFields) delay DNA damage repair following radiation treatment of glioma cells. *Radiat Oncol* 2017;**12**: 206.
62. Lee WS, Seo SJ, Chung HK, Park JW, Kim JK, Kim EH. Tumor-treating fields as a proton beam-sensitizer for glioblastoma therapy. *Am J Cancer Res* 2021;**11**: 4582–94.
63. Salvador E, Kessler AF, Domröse D, Hörmann J, Schaeffer C, Giniunaite A, Burek M, Tempel-Brami C, Voloshin T, Volodin A, Zeidan A, Giladi M, et al. Tumor Treating Fields (TTFields) Reversibly Permeabilize the Blood-Brain Barrier In Vitro and In Vivo. *Biomolecules* 2022;**12**.
64. Iv M, Naya L, Sanan S, Van Buskirk SL, Nagpal S, Thomas RP, Recht LD, Patel CB. Tumor treating fields increases blood-brain barrier permeability and relative cerebral blood volume in patients with glioblastoma. *Neuroradiol J* 2024;**37**: 107–18.
65. Wong ET, Lok E, Gautam S, Swanson KD. Dexamethasone exerts profound immunologic interference on treatment efficacy for recurrent glioblastoma. *Br J Cancer* 2015;**113**: 232–41.

66. Simchony H, Diamant D, Ram Z, Volovitz I. Evaluation of the Compatibility of Electric Tumor Treating Fields with Key Anti-tumoral T-Cell Functions. *Isr Med Assoc J* 2019;**21**: 503.
67. Diamant G, Simchony Goldman H, Gasri Plotnitsky L, Roitman M, Shiloach T, Globerson-Levin A, Eshhar Z, Haim O, Pencovich N, Grossman R, Ram Z, Volovitz I. T Cells Retain Pivotal Antitumoral Functions under Tumor-Treating Electric Fields. *J Immunol* 2021;**207**: 709–19.
68. Voloshin T, Kaynan N, Davidi S, Porat Y, Shteingauz A, Schneiderman RS, Zeevi E, Munster M, Blat R, Tempel Bami C, Cahal S, Itzhaki A, et al. Tumor-treating fields (TTFields) induce immunogenic cell death resulting in enhanced antitumor efficacy when combined with anti-PD-1 therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2020;**69**: 1191–204.
69. Lee YJ, Seo HW, Baek JH, Lim SH, Hwang SG, Kim EH. Gene expression profiling of glioblastoma cell lines depending on TP53 status after tumor-treating fields (TTFields) treatment. *Sci Rep* 2020;**10**: 12272.
70. Branter J, Estevez-Cabrero M, Diksin M, Griffin M, Castellanos-Urbe M, May S, Rahman R, Grundy R, Basu S, Smith S. Genome-Wide Expression and Anti-Proliferative Effects of Electric Field Therapy on Pediatric and Adult Brain Tumors. *Int J Mol Sci* 2022;**23**.
71. Xu S, Luo C, Chen D, Tang L, Chen L, Liu Z. Whole transcriptome and proteome analyses identify potential targets and mechanisms underlying tumor treating fields against glioblastoma. *Cell Death Dis* 2022;**13**: 721.
72. Wainer-Katsir K, Haber A, Fishman H, Ding L, Story MD, Du R, Kahlert UD, Mannarino L, Mirimao F, Lupi M, D'Incalci M, Lavy-Shahaf G, et al. The transcriptomic fingerprint of cancer response to Tumor Treating Fields (TTFields). *Cell Death Discov* 2025;**11**: 319.
73. Karanam NK, Ding L, Aroumougame A, Story MD. Tumor treating fields cause replication stress and interfere with DNA replication fork maintenance: Implications for cancer therapy. *Transl Res* 2020;**217**: 33–46.
74. Kim EH. Tumor treating fields induced senescence on glioblastoma. *Am J Cancer Res* 2023;**13**: 5626–40.
75. Shteingauz A, Porat Y, Voloshin T, Schneiderman RS, Munster M, Zeevi E, Kaynan N, Gotlib K, Giladi M, Kirson ED, Weinberg U, Kinzel A, et al. AMPK-dependent autophagy upregulation serves as a survival mechanism in response to Tumor Treating Fields (TTFields). *Cell Death Dis* 2018;**9**: 1074.
76. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956;**124**: 269–70.
77. Patel CB, Beinat C, Xie Y, Chang E, Gambhir SS. Tumor treating fields (TTFields) impairs aberrant glycolysis in glioblastoma as evaluated by [(18)F]DASA-23, a non-invasive probe of pyruvate kinase M2 (PKM2) expression. *Neoplasia* 2021;**23**: 58–67.
78. Voloshin T, Schneiderman RS, Volodin A, Shamir RR, Kaynan N, Zeevi E, Koren L, Klein-Goldberg A, Paz R, Giladi M, Bomzon Z, Weinberg U, et al. Tumor Treating Fields (TTFields) Hinder Cancer Cell Motility through Regulation of Microtubule and Actin Dynamics. *Cancers (Basel)* 2020;**12**.
79. Xiang XW, Liu HT, Tao XN, Zeng YL, Liu J, Wang C, Yu SX, Zhao H, Liu YJ, Liu KF. Glioblastoma behavior study under different frequency electromagnetic field. *iScience* 2023;**26**: 108575.
80. Chang E, Patel CB, Pohling C, Young C, Song J, Flores TA, Zeng Y, Joubert LM, Arami H, Natarajan A, Sinclair R, Gambhir SS. Tumor treating fields increases membrane permeability in glioblastoma cells. *Cell Death Discov* 2018;**4**: 113.
81. Koltun B, Voloshin T, David C, Kan T, Barsheshet Y, Volodin A, Cahal S, Tempel-Bami C, Shai M, Jacobovitch S, Roash-Lancry D, Brant B, et al. Cancer Cell Permeability Induced by Tumor Treating Fields (TTFields) as a Physical Approach to Improve Chemotherapy Uptake and Overcome Multidrug Resistance. *Mol Cancer Ther* 2025.
82. Schlieper-Scherf S, Hebach N, Hausmann D, Azorín DD, Hoffmann DC, Horschitz S, Maier E, Koch P, Karreman MA, Etminan N, Ratliff M. Disrupting glioblastoma networks with tumor treating fields (TTFields) in in vitro models. *J Neurooncol* 2024;**170**: 139–51.
83. Klein-Goldberg A, Voloshin T, Zemer Tov E, Paz R, Somri-Gannam L, Volodin A, Koren L, Lifshitz L, Meir A, Shabtay-Orbach A, Blatt R, Cahal S, et al. Role of the PI3K/AKT signaling

- pathway in the cellular response to Tumor Treating Fields (TTFields). *Cell Death Dis* 2025;**16**: 210.
84. Tian J, Mallinger JC, Shi P, Ling D, Deleyrolle LP, Lin M, Khoshbouei H, Sarkisian MR. Aurora kinase A inhibition plus Tumor Treating Fields suppress glioma cell proliferation in a cilium-independent manner. *Transl Oncol* 2024;**45**: 101956.
 85. Krex D, Bartmann P, Lachmann D, Hagstotz A, Jugel W, Schneiderman RS, Gotlib K, Porat Y, Robel K, Temme A, Giladi M, Michen S. Aurora B Kinase Inhibition by AZD1152 Concomitant with Tumor Treating Fields Is Effective in the Treatment of Cultures from Primary and Recurrent Glioblastomas. *Int J Mol Sci* 2023;**24**.
 86. Chen D, Le SB, Manektalia H, Liu T, Hutchinson TE, O'Dell A, Salhia B, Tran DD. The EP3-ZNF488 Axis Promotes Self-Renewal of Glioma Stem-Like Cells to Induce Resistance to Tumor Treating Fields. *Cancer Res* 2025;**85**: 360–77.
 87. Vanderlinden A, Jones CG, Myers KN, Rominiyi O, Collis SJ. DNA damage response inhibitors enhance tumour treating fields (TTFields) potency in glioma stem-like cells. *Br J Cancer* 2023;**129**: 1829–40.
 88. Deshors P, Kheil Z, Ligat L, Gouazé-Andersson V, Cohen-Jonathan Moyal E. FGFR inhibition as a new therapeutic strategy to sensitize glioblastoma stem cells to tumor treating fields. *Cell Death Discov* 2025;**11**: 265.
 89. Cao Q, Hajosch A, Kast RE, Loehmann C, Hlavac M, Fischer-Posovszky P, Strobel H, Westhoff MA, Siegelin MD, Wirtz CR, Halatsch ME, Karpel-Massler G. Tumor Treating Fields (TTFields) combined with the drug repurposing approach CUSP9v3 induce metabolic reprogramming and synergistic anti-glioblastoma activity in vitro. *Br J Cancer* 2024;**130**: 1365–76.
 90. Pandey M, Xiu J, Mittal S, Zeng J, Saul M, Kesari S, Azadi A, Newton H, Deniz K, Ladner K, Sumrall A, Korn WM, et al. Molecular alterations associated with improved outcome in patients with glioblastoma treated with Tumor-Treating Fields. *Neurooncol Adv* 2022;**4**: vdac096.
 91. Li X, Yang F, Gao B, Yu X, Rubinsky B. A Theoretical Analysis of the Effects of Tumor-Treating Electric Fields on Single Cells. *Bioelectromagnetics* 2020;**41**: 438–46.
 92. Li X, Yang F, Rubinsky B. A Theoretical Study on the Biophysical Mechanisms by Which Tumor Treating Fields Affect Tumor Cells during Mitosis. *IEEE Trans Biomed Eng* 2020.
 93. Li X, Liu K, Fang H, Liu Z, Tang Y, Dai P. Electrodynamics interaction between tumor treating fields and microtubule electrophysiological activities. *APL Bioeng* 2024;**8**: 026118.
 94. Abed T, Ganzer K, Eckert F, Stransky N, Huber SM. Ion channels as molecular targets of glioblastoma electrotherapy. *Front Cell Neurosci* 2023;**17**: 1133984.
 95. Gentil N, Abend E, Naveh A, Marciano T, Balin I, Telepinsky Y, Miranda PC. Temperature and Impedance Variations During Tumor Treating Fields (TTFields) Treatment. *Front Hum Neurosci* 2022;**16**: 931818.
 96. Sun YS. Direct-Current Electric Field Distribution in the Brain for Tumor Treating Field Applications: A Simulation Study. *Comput Math Methods Med* 2018;**2018**: 3829768.
 97. Neuhaus E, Zirjacks L, Ganzer K, Klumpp L, Schüler U, Zips D, Eckert F, Huber SM. Alternating Electric Fields (TTFields) Activate Ca(v)1.2 Channels in Human Glioblastoma Cells. *Cancers (Basel)* 2019;**11**.
 98. Ye E, Lee JE, Lim YS, Yang SH, Park SM. Effect of duty cycles of tumor-treating fields on glioblastoma cells and normal brain organoids. *Int J Oncol* 2022;**60**.
 99. Ravin R, Cai TX, Pursley RH, Garmendia-Cedillos M, Pohida T, Freidlin RZ, Wang H, Zhuang Z, Giles AJ, Williamson NH, Gilbert MR, Bassar PJ. A Novel In Vitro Device to Deliver Induced Electromagnetic Fields to Cell and Tissue Cultures. *Biophys J* 2020;**119**: 2378–90.
 100. Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 2007;**87**: 1441–74.
 101. Zhou X, Naguro I, Ichijo H, Watanabe K. Mitogen-activated protein kinases as key players in osmotic stress signaling. *Biochim Biophys Acta* 2016;**1860**: 2037–52.

102. Slangen PLG, Porat Y, Mertz M, van den Broek B, Jalink K, de Gooijer MC, van Tellingen O, Borst GR. Protocol for live-cell imaging during Tumor Treating Fields treatment with Inovitro Live. *STAR Protoc* 2022;**3**: 101246.
103. Morgado-Valle C, Verdugo-Diaz L, Garcia DE, Morales-Orozco C, Drucker-Colin R. The role of voltage-gated Ca²⁺ channels in neurite growth of cultured chromaffin cells induced by extremely low frequency (ELF) magnetic field stimulation. *Cell Tissue Res* 1998;**291**: 217–30.
104. Grassi C, D'Ascenzo M, Torsello A, Martinotti G, Wolf F, Cittadini A, Azzena GB. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca²⁺ channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell calcium* 2004;**35**: 307–15.
105. Piacentini R, Ripoli C, Mezzogori D, Azzena GB, Grassi C. Extremely low-frequency electromagnetic fields promote in vitro neurogenesis via upregulation of Ca(v)1-channel activity. *J Cell Physiol* 2008;**215**: 129–39.
106. Li Y, Yan X, Liu J, Li L, Hu X, Sun H, Tian J. Pulsed electromagnetic field enhances brain-derived neurotrophic factor expression through L-type voltage-gated calcium channel- and Erk-dependent signaling pathways in neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *Neurochem Int* 2014;**75**: 96–104.
107. Luo FL, Yang N, He C, Li HL, Li C, Chen F, Xiong JX, Hu ZA, Zhang J. Exposure to extremely low frequency electromagnetic fields alters the calcium dynamics of cultured entorhinal cortex neurons. *Environ Res* 2014;**135**: 236–46.
108. Burke RC, Bardet SM, Carr L, Romanenko S, Arnaud-Cormos D, Leveque P, O'Connor RP. Nanosecond pulsed electric fields depolarize transmembrane potential via voltage-gated K(+), Ca(2+) and TRPM8 channels in U87 glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2017;**1859**: 2040–50.
109. Kim JH, Sohn UD, Kim HG, Kim HR. Exposure to 835 MHz RF-EMF decreases the expression of calcium channels, inhibits apoptosis, but induces autophagy in the mouse hippocampus. *Korean J Physiol Pharmacol* 2018;**22**: 277–89.
110. Jimenez H, Wang M, Zimmerman JW, Pennison MJ, Sharma S, Surratt T, Xu ZX, Brezovich I, Absher D, Myers RM, DeYoung B, Caudell DL, et al. Tumour-specific amplitude-modulated radiofrequency electromagnetic fields induce differentiation of hepatocellular carcinoma via targeting Ca(v)3.2 T-type voltage-gated calcium channels and Ca(2+) influx. *EBioMedicine* 2019;**44**: 209–24.
111. Pall ML. Microwave frequency electromagnetic fields (EMFs) produce widespread neuropsychiatric effects including depression. *J Chem Neuroanat* 2016;**75**: 43–51.
112. Catacuzzeno L, Franciolini F. The 70-year search for the voltage-sensing mechanism of ion channels. *J Physiol* 2022.
113. Crampton WGR. Electroreception, electrogenesis and electric signal evolution. *J Fish Biol* 2019;**95**: 92–134.
114. Helfman GSC, B. B.; Facey, D. E.; Bowen, B. W. . *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology*, 2nd Edition ed.: Wiley-Blackwell, 2009.
115. Baker CVH. The Development and Evolution of Lateral Line Electroreceptors: Insights from Comparative Molecular Approaches. In: Carlson BA, Sisneros JA, Popper AN, Fay RR. *Electroreception: Fundamental Insights from Comparative Approaches*ed. Cham: Springer International Publishing, 2019: 25–62.
116. Kramer B. Electric organ discharge. In: Binder M. D, Hirokawa N, Widhorst U. *Encyclopedia of neuroscience*ed. Berlin: Springer, 2009: 1050–6.
117. Smith GT, Unguez GA, Weber CM. Distribution of Kv1-like potassium channels in the electromotor and electrosensory systems of the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *J Neurobiol* 2006;**66**: 1011–31.
118. Liu X, Chang Y, Reinhart PH, Sontheimer H, Chang Y. Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells. *J Neurosci* 2002;**22**: 1840–9.

119. Guberina N, Pöttgen C, Kebir S, Lazaridis L, Scharmberg C, Lübcke W, Niessen M, Guberina M, Scheffler B, Jendrossek V, Jabbarli R, Pierscianek D, et al. Combined radiotherapy and concurrent tumor treating fields (TTFields) for glioblastoma: Dosimetric consequences on non-coplanar IMRT as initial results from a phase I trial. *Radiat Oncol* 2020;**15**: 83.
120. Stachelek GC, Grimm J, Moore J, Huang E, Spoleti N, Redmond KJ, Lim M, Bettegowda C, Kleinberg L. Tumor-Treating Field Arrays Do Not Reduce Target Volume Coverage for Glioblastoma Radiation Therapy. *Adv Radiat Oncol* 2020;**5**: 62–9.
121. Bokstein F, Blumenthal D, Limon D, Harosh CB, Ram Z, Grossman R. Concurrent Tumor Treating Fields (TTFields) and Radiation Therapy for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Prospective Safety and Feasibility Study. *Front Oncol* 2020;**10**: 411.
122. Miller R, Song A, Ali A, Niazi M, Bar-Ad V, Martinez N, Glass J, Alnahhas I, Andrews D, Judy K, Evans J, Farrell C, et al. Scalp-Sparing Radiation With Concurrent Temozolomide and Tumor Treating Fields (SPARE) for Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *Front Oncol* 2022;**12**: 896246.
123. Ali AS, Lombardo J, Niazi MZ, Miller RC, Alnahhas I, Martinez NL, Andrews DW, Judy KD, Shi W. Concurrent chemoradiation and Tumor Treating Fields (TTFields, 200 kHz) for patients with newly diagnosed glioblastoma: patterns of progression in a single institution pilot study. *J Neurooncol* 2022;**160**: 345–50.
124. Liang L, Chen L, Ni C, Shi W, Zhou Z, Chen S, Zhu W, Liu J, Qiu X, Lin W, Zhang J, Qin Z, et al. Chemoradiation treatment with or without concurrent tumor-treating fields (TTFields) therapy in newly diagnosed glioblastoma (GBM) patients in China. *Chin Neurosurg J* 2025;**11**: 5.
125. Grote S, Ureña-Bailén G, Chan KC, Baden C, Mezger M, Handgretinger R, Schleicher S. In Vitro Evaluation of CD276-CAR NK-92 Functionality, Migration and Invasion Potential in the Presence of Immune Inhibitory Factors of the Tumor Microenvironment. *Cells* 2021;**10**.
126. Miklavčič D, Pavšelj N, Hart FX. Electric Properties of Tissues *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*.
127. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991;**139**: 271–9.
128. Stransky N, Ji R, Prause L, Ganser K, Wels WS, Ruth P, Huber SM, Eckert F. Chimeric antigen receptor NK-92 cell function is modulated by HLA class I expression of target cells. *iScience* 2025;**28**: 112523.
129. Wenger C, Miranda PC, Salvador R, Thielscher A, Bomzon Z, Giladi M, Mrugala MM, Korshoej AR. A Review on Tumor-Treating Fields (TTFields): Clinical Implications Inferred From Computational Modeling. *IEEE Rev Biomed Eng* 2018;**11**: 195–207.
130. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 2008;**36**: 5678–94.
131. Stewart RD. Two-lesion kinetic model of double-strand break rejoining and cell killing. *Radiat Res* 2001;**156**: 365–78.
132. Lorat Y, Schanz S, Schuler N, Wennemuth G, Rübe C, Rübe CE. Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy. *PLoS One* 2012;**7**: e38165.
133. Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1988;**35**: 95–125.
134. Roth B, Huber SM. Ion Transport and Radioresistance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2022;**183**: 217–49.
135. Sontheimer H. An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;**233**: 779–91.
136. Nilsson A, Lidén E, Sellström A. Some observations made by intracellular recordings in a primary astrocyte culture and a glioblastoma '138 MG'. *Acta Physiol Scand* 1986;**126**: 413–7.

137. Edalat L, Stegen B, Klumpp L, Haehl E, Schilbach K, Lukowski R, Kühnle M, Bernhardt G, Buschauer A, Zips D, Ruth P, Huber SM. BK K⁺ channel blockade inhibits radiation-induced migration/brain infiltration of glioblastoma cells. *Oncotarget* 2016;**7**: 14259–78.
138. Bellono NW, Leitch DB, Julius D. Molecular basis of ancestral vertebrate electroreception. *Nature* 2017;**543**: 391–6.
139. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009;**461**: 1071–8.
140. Zhou G, Soufan O, Ewald J, Hancock REW, Basu N, Xia J. NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res* 2019;**47**: W234–w41.
141. Lo Surdo P, Iannuccelli M, Contino S, Castagnoli L, Licata L, Cesareni G, Perfetto L. SIGNOR 3.0, the SIGNaling network open resource 3.0: 2022 update. *Nucleic Acids Res* 2023;**51**: D631–d7.
142. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000;**28**: 27–30.
143. Matsui T, Nuryadi E, Komatsu S, Hirota Y, Shibata A, Oike T, Nakano T. Robustness of Clonogenic Assays as a Biomarker for Cancer Cell Radiosensitivity. *Int J Mol Sci* 2019;**20**.
144. Valerie K, Povirk LF. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 2003;**22**: 5792–812.
145. Braschi EL, Trumble O, Casper A, Amdur RJ, Morris CG, De Leo AN. Pattern of recurrence with 1.0 cm CTV in brain glioblastoma treated with radiotherapy. *J Neurooncol* 2025.
146. Straube C, Elpula G, Gempt J, Gerhardt J, Bette S, Zimmer C, Schmidt-Graf F, Meyer B, Combs SE. Re-irradiation after gross total resection of recurrent glioblastoma : Spatial pattern of recurrence and a review of the literature as a basis for target volume definition. *Strahlenther Onkol* 2017;**193**: 897–909.
147. Chao HX, Poovey CE, Privette AA, Grant GD, Chao HY, Cook JG, Purvis JE. Orchestration of DNA Damage Checkpoint Dynamics across the Human Cell Cycle. *Cell Syst* 2017;**5**: 445–59.e5.
148. Brown A, Geiger H. Chromosome integrity checkpoints in stem and progenitor cells: transitions upon differentiation, pathogenesis, and aging. *Cell Mol Life Sci* 2018;**75**: 3771–9.
149. Huber SM. Oncochannels. *Cell calcium* 2013;**53**: 241–55.
150. Steinle M, Palme D, Misovic M, Rudner J, Dittmann K, Lukowski R, Ruth P, Huber SM. Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K⁺ channels. *Radiother Oncol* 2011;**101**: 122–6.
151. Stransky N, Ganzer K, Quintanilla-Martinez L, Gonzalez-Menendez I, Naumann U, Eckert F, Koch P, Huber SM, Ruth P. Efficacy of combined tumor irradiation and K(Ca)_v3.1-targeting with TRAM-34 in a syngeneic glioma mouse model. *Sci Rep* 2023;**13**: 20604.
152. Ruggieri P, Mangino G, Fioretti B, Catacuzzeno L, Puca R, Ponti D, Miscusi M, Franciolini F, Ragona G, Calogero A. The inhibition of KCa_v3.1 channels activity reduces cell motility in glioblastoma derived cancer stem cells. *PLoS One* 2012;**7**: e47825.
153. Cuddapah VA, Turner KL, Seifert S, Sontheimer H. Bradykinin-induced chemotaxis of human gliomas requires the activation of KCa_v3.1 and ClC-3. *J Neurosci* 2013;**33**: 1427–40.
154. Turner KL, Honasoge A, Robert SM, McFerrin MM, Sontheimer H. A proinvasive role for the Ca²⁺-activated K⁺ channel KCa_v3.1 in malignant glioma. *Glia* 2014;**62**: 971–81.
155. Catacuzzeno L, Franciolini F. Role of KCa_v3.1 Channels in Modulating Ca²⁺ Oscillations during Glioblastoma Cell Migration and Invasion. *Int J Mol Sci* 2018;**19**.
156. Ganzer K, Stransky N, Abed T, Quintanilla-Martinez L, Gonzalez-Menendez I, Naumann U, Koch P, Krueger M, Ruth P, Huber SM, Eckert F. K(Ca) channel targeting impairs DNA repair and invasiveness of patient-derived glioblastoma stem cells in culture and orthotopic mouse xenografts which only in part is predictable by K(Ca) expression levels. *Int J Cancer* 2024;**155**: 1886–901.

157. Grimaldi A, D'Alessandro G, Golia MT, Grössinger EM, Di Angelantonio S, Ragozzino D, Santoro A, Esposito V, Wulff H, Catalano M, Limatola C. KCa3.1 inhibition switches the phenotype of glioma-infiltrating microglia/macrophages. *Cell Death Dis* 2016;**7**: e2174.
158. Ohya S, Matsui M, Kajikuri J, Kito H, Endo K. Downregulation of IL-8 and IL-10 by the Activation of Ca(2+)-Activated K(+) Channel K(Ca)3.1 in THP-1-Derived M(2) Macrophages. *Int J Mol Sci* 2022;**23**.
159. Yang J, Pu Z, Tao X, Liu J, Li K, Shi J, Qiao H, Fan X. Expression of KCNN4 in adult-type diffuse gliomas and its correlations with clinicopathological features and patient prognosis. *Transl Oncol* 2024;**44**: 101947.
160. Stegen B, Butz L, Klumpp L, Zips D, Dittmann K, Ruth P, Huber SM. Ca2+-Activated IK K+ Channel Blockade Radiosensitizes Glioblastoma Cells. *Mol Cancer Res* 2015;**13**: 1283–95.
161. Stransky N, Ganser K, Naumann U, Huber SM, Ruth P. Tumoricidal, Temozolomide- and Radiation-Sensitizing Effects of K(Ca)3.1 K(+) Channel Targeting In Vitro Are Dependent on Glioma Cell Line and Stem Cell Fraction. *Cancers (Basel)* 2022;**14**.
162. Lehrer S, Rheinstein PH. Increased KCNN4 Expression Is Correlated With Poor Survival in Lower Grade Glioma. *Cancer Diagn Progn* 2023;**3**: 428–32.
163. Guéguinou M, Chantôme A, Fromont G, Bougnoux P, Vandier C, Potier-Cartereau M. KCa and Ca(2+) channels: the complex thought. *Biochim Biophys Acta* 2014;**1843**: 2322–33.
164. Sforza L, Megaro A, Pessia M, Franciolini F, Catacuzzeno L. Structure, Gating and Basic Functions of the Ca2+-activated K Channel of Intermediate Conductance. *Curr Neuropharmacol* 2018;**16**: 608–17.
165. Mohr CJ, Gross D, Sezgin EC, Steudel FA, Ruth P, Huber SM, Lukowski R. KCa3.1 Channels Confer Radioresistance to Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 2019;**11**.
166. Gibhardt CS, Roth B, Schroeder I, Fuck S, Becker P, Jakob B, Fournier C, Moroni A, Thiel G. X-ray irradiation activates K+ channels via H2O2 signaling. *Sci Rep* 2015;**5**: 13861.
167. Roth B, Gibhardt CS, Becker P, Gebhardt M, Knoop J, Fournier C, Moroni A, Thiel G. Low-dose photon irradiation alters cell differentiation via activation of hK channels. *Pflugers Arch* 2015;**467**: 1835–49.
168. Klumpp D, Misovic M, Sztayn K, Shumilina E, Rudner J, Huber SM. Targeting TRPM2 Channels Impairs Radiation-Induced Cell Cycle Arrest and Fosters Cell Death of T Cell Leukemia Cells in a Bcl-2-Dependent Manner. *Oxid Med Cell Longev* 2016;**2016**: 8026702.
169. Voos P, Fuck S, Weipert F, Babel L, Tandl D, Meckel T, Hehlhans S, Fournier C, Moroni A, Rodel F, Thiel G. Ionizing Radiation Induces Morphological Changes and Immunological Modulation of Jurkat Cells. *Front Immunol* 2018;**9**: 922.
170. Eckert F, Schilbach K, Klumpp L, Bardoscia L, Sezgin EC, Schwab M, Zips D, Huber SM. Potential Role of CXCR4 Targeting in the Context of Radiotherapy and Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol* 2018;**9**: 3018.
171. Kandasamy SB, Howerton TC, Hunt WA. Reductions in calcium uptake induced in rat brain synaptosomes by ionizing radiation. *Radiat Res* 1991;**125**: 158–62.
172. Todd DG, Mikkelsen RB. Ionizing radiation induces a transient increase in cytosolic free [Ca2+] in human epithelial tumor cells. *Cancer Res* 1994;**54**: 5224–30.
173. Wojewodzka M, Walicka M, Sochanowicz B, Szumiel I. Calcium antagonist, TMB-8, prevents the induction of adaptive response by hydrogen peroxide or X-rays in human lymphocytes. *International journal of radiation biology* 1994;**66**: 99–109.
174. Yoshida S. Effects of X-irradiation on the calcium channel of the mouse oocyte. *Life sciences* 1997;**60**: 1377–83.
175. Teshima K, Yamamoto A, Yamaoka K, Honda Y, Honda S, Sasaki T, Kojima S. Involvement of calcium ion in elevation of mRNA for gamma-glutamylcysteine synthetase (gamma-GCS) induced by low-dose gamma-rays. *International journal of radiation biology* 2000;**76**: 1631–9.
176. Klumpp D, Frank SC, Klumpp L, Sezgin EC, Eckert M, Edalat L, Bastmeyer M, Zips D, Ruth P, Huber SM. TRPM8 is required for survival and radioresistance of glioblastoma cells. *Oncotarget* 2017;**8**: 95896–913.

177. Stegen B, Klumpp L, Misovic M, Edalat L, Eckert M, Klumpp D, Ruth P, Huber SM. K⁺ channel signaling in irradiated tumor cells. *Eur Biophys J* 2016;**45**: 585–98.
178. Calaf GM, Ardiles LN, Crispin LA. Role of Calcium in an Experimental Breast Cancer Model Induced by Radiation and Estrogen. *Biomedicines* 2024;**12**.
179. Guo XW, Zhang H, Huang JQ, Wang SN, Lu Y, Cheng B, Dong SH, Wang YY, Li FS, Li YW. PIEZO1 Ion Channel Mediates Ionizing Radiation-Induced Pulmonary Endothelial Cell Ferroptosis via Ca²⁺/Calpain/VE-Cadherin Signaling. *Front Mol Biosci* 2021;**8**: 725274.
180. Hoorelbeke D, Decrock E, De Smet M, De Bock M, Descamps B, Van Haver V, Delvaeye T, Krysko DV, Vanhove C, Bultynck G, Leybaert L. Cx43 channels and signaling via IP(3)/Ca²⁺, ATP, and ROS/NO propagate radiation-induced DNA damage to non-irradiated brain microvascular endothelial cells. *Cell Death Dis* 2020;**11**: 194.
181. Short B. X rays activate T cell calcium signaling. *J Gen Physiol* 2022;**154**.
182. Zhu Y, Dai J, Song B, Zhang Y, Yang T, Xu H, Xu X, Gao Y, Yan T, Shen W, Zhang W, Zhang S, et al. Connexin 43 Prevents Radiation-Induced Intestinal Damage via the Ca²⁺-Dependent PI3K/Akt Signaling Pathway. *Radiat Res* 2024;**201**: 294–303.
183. Proudfoot JM, Murrey MW, McLean S, Greenland EL, Barden AE, Croft KD, Galano JM, Durand T, Mori TA, Pixley FJ. F2-isoprostanes affect macrophage migration and CSF-1 signalling. *Free Radic Biol Med* 2018;**126**: 142–52.
184. Palme D, Misovic M, Schmid E, Klumpp D, Salih HR, Rudner J, Huber SM. Kv3.4 potassium channel-mediated electrosignaling controls cell cycle and survival of irradiated leukemia cells. *Pflugers Arch* 2013;**465**: 1209–21.
185. Palme D, Misovic M, Ganser K, Klumpp L, Salih HR, Zips D, Huber SM. hERG K(+) Channels Promote Survival of Irradiated Leukemia Cells. *Front Pharmacol* 2020;**11**: 489.
186. Steudel FA, Mohr CJ, Stegen B, Nguyen HY, Barnert A, Steinle M, Beer-Hammer S, Koch P, Lo WY, Schroth W, Hoppe R, Brauch H, et al. SK4 channels modulate Ca²⁺ signalling and cell cycle progression in murine breast cancer. *Mol Oncol* 2017;**11**: 1172–88.
187. Coultrap SJ, Bayer KU. CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci* 2012;**35**: 607–18.
188. Heise N, Palme D, Misovic M, Koka S, Rudner J, Lang F, Salih HR, Huber SM, Henke G. Non-selective cation channel-mediated Ca²⁺-entry and activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II contribute to G2/M cell cycle arrest and survival of irradiated leukemia cells. *Cell Physiol Biochem* 2010;**26**: 597–608.
189. Masumoto K, Tsukimoto M, Kojima S. Role of TRPM2 and TRPV1 cation channels in cellular responses to radiation-induced DNA damage. *Biochim Biophys Acta* 2013;**1830**: 3382–90.
190. Nishino K, Tanamachi K, Nakanishi Y, Ide S, Kojima S, Tanuma S, Tsukimoto M. Radiosensitizing Effect of TRPV1 Channel Inhibitors in Cancer Cells. *Biol Pharm Bull* 2016;**39**: 1224–30.
191. Kim W, Lee S, Seo D, Kim D, Kim K, Kim E, Kang J, Seong KM, Youn H, Youn B. Cellular Stress Responses in Radiotherapy. *Cells* 2019;**8**.
192. Sui X, Geng JH, Li YH, Zhu GY, Wang WH. Calcium channel alpha2delta1 subunit (CACNA2D1) enhances radioresistance in cancer stem-like cells in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Manag Res* 2018;**10**: 5009–18.
193. Wang H, Mao X, Ye L, Cheng H, Dai X. The Role of the S100 Protein Family in Glioma. *J Cancer* 2022;**13**: 3022–30.
194. Gorsler T, Murzik U, Ulbricht T, Hentschel J, Hemmerich P, Melle C. DNA damage-induced translocation of S100A11 into the nucleus regulates cell proliferation. *BMC Cell Biol* 2010;**11**: 100.
195. Murzik U, Hemmerich P, Weidtkamp-Peters S, Ulbricht T, Bussen W, Hentschel J, von Eggeling F, Melle C. Rad54B targeting to DNA double-strand break repair sites requires complex formation with S100A11. *Mol Biol Cell* 2008;**19**: 2926–35.
196. Foertsch F, Szambowska A, Weise A, Zielinski A, Schlott B, Kraft F, Mrasek K, Borgmann K, Pospiech H, Grosse F, Melle C. S100A11 plays a role in homologous recombination and

- genome maintenance by influencing the persistence of RAD51 in DNA repair foci. *Cell Cycle* 2016;**15**: 2766–79.
197. Foertsch F, Melle C. Analysis of S100A11 in DNA Damage Repair. *Methods Mol Biol* 2019;**1929**: 447–60.
 198. Baek KH, Yu HV, Kim E, Na Y, Kwon Y. Calcium influx-mediated translocation of m-calpain induces Ku80 cleavage and enhances the Ku80-related DNA repair pathway. *Oncotarget* 2016;**7**: 30831–44.
 199. Bente MS, Reinicke KE, Bey EA, Spitz DR, Boothman DA. Calcium-dependent modulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair. *J Biol Chem* 2006;**281**: 33684–96.
 200. Diaz-Hernandez JI, Moncada S, Bolaños JP, Almeida A. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects neurons against apoptosis induced by oxidative stress. *Cell Death Differ* 2007;**14**: 1211–21.
 201. Yang L, Lu P, Yang X, Li K, Chen X, Zhou Y, Qu S. Downregulation of annexin A3 promotes ionizing radiation-induced EGFR activation and nuclear translocation and confers radioresistance in nasopharyngeal carcinoma. *Exp Cell Res* 2022;**418**: 113292.
 202. Brown BM, Pressley B, Wulff H. KCa3.1 Channel Modulators as Potential Therapeutic Compounds for Glioblastoma. *Curr Neuropharmacol* 2018;**16**: 618–26.
 203. Ataga KI, Smith WR, De Castro LM, Swerdlow P, Sauntharajah Y, Castro O, Vichinsky E, Kutlar A, Orringer EP, Rigdon GC, Stocker JW. Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia. *Blood* 2008;**111**: 3991–7.
 204. Ataga KI, Stocker J. Senicapoc (ICA-17043): a potential therapy for the prevention and treatment of hemolysis-associated complications in sickle cell anemia. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;**18**: 231–9.
 205. Massenzio F, Cambiaghi M, Marchiotto F, Boriero D, Limatola C, D'Alessandro G, Buffelli M. In vivo morphological alterations of TAMs during KCa3.1 inhibition-by using in vivo two-photon time-lapse technology. *Frontiers in cellular neuroscience* 2022;**16**: 1002487.
 206. Lanzetti L, Palamidessi A, Areces L, Scita G, Di Fiore PP. Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature* 2004;**429**: 309–14.
 207. Haas AK, Fuchs E, Kopajtich R, Barr FA. A GTPase-activating protein controls Rab5 function in endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 2005;**7**: 887–93.
 208. Fuchs E, Haas AK, Spooner RA, Yoshimura S, Lord JM, Barr FA. Specific Rab GTPase-activating proteins define the Shiga toxin and epidermal growth factor uptake pathways. *J Cell Biol* 2007;**177**: 1133–43.
 209. Haas AK, Yoshimura S, Stephens DJ, Preisinger C, Fuchs E, Barr FA. Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells. *J Cell Sci* 2007;**120**: 2997–3010.
 210. Palamidessi A, Frittoli E, Ducano N, Offenhauser N, Sigismund S, Kajiho H, Parazzoli D, Oldani A, Gobbi M, Serini G, Di Fiore PP, Scita G, et al. The GTPase-activating protein RN-tre controls focal adhesion turnover and cell migration. *Curr Biol* 2013;**23**: 2355–64.
 211. Witoelar A, Rongve A, Almdahl IS, Ulstein ID, Engvig A, White LR, Selbæk G, Stordal E, Andersen F, Brækhus A, Saltvedt I, Engedal K, et al. Meta-analysis of Alzheimer's disease on 9,751 samples from Norway and IGAP study identifies four risk loci. *Sci Rep* 2018;**8**: 18088.
 212. Avanzato D, Pupo E, Ducano N, Isella C, Bertalot G, Luise C, Pece S, Bruna A, Rueda OM, Caldas C, Di Fiore PP, Sapino A, et al. High USP6NL Levels in Breast Cancer Sustain Chronic AKT Phosphorylation and GLUT1 Stability Fueling Aerobic Glycolysis. *Cancer Res* 2018;**78**: 3432–44.
 213. Ma T, Liu H, Liu Y, Liu T, Wang H, Qiao F, Song L, Zhang L. USP6NL mediated by LINC00689/miR-142-3p promotes the development of triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* 2020;**20**: 998.
 214. Sun K, He SB, Yao YZ, Qu JG, Xie R, Ma YQ, Zong MH, Chen JX. Tre2 (USP6NL) promotes colorectal cancer cell proliferation via Wnt/ β -catenin pathway. *Cancer Cell Int* 2019;**19**: 102.

215. Ma T, Wang M, Wang S, Hu H, Zhang X, Wang H, Wang G, Jin Y. BMSC derived EVs inhibit colorectal Cancer progression by transporting MAGI2-AS3 or something similar. *Cell Signal* 2024;**121**: 111235.
216. Mohammed MA, Soffar AA, Yousef AI, Salama M, Ibrahim FAR, El-Sewedy T, Elmetwalli A. USP6NL knockdown suppresses colorectal cancer progression by inducing CASP9-Mediated apoptosis and disrupting FOXC2/SNAI1-Driven EMT and angiogenesis. *Funct Integr Genomics* 2025;**25**: 153.
217. Basirat Z, Taghehchian N, Abbaszadegan MR, Moghbeli M. USP6NL and MSX2 as the novel diagnostic markers in gastric cancer patients. *Cancer Treat Res Commun* 2025;**44**: 100977.
218. Lanzetti L, Rybin V, Malabarba MG, Christoforidis S, Scita G, Zerial M, Di Fiore PP. The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature* 2000;**408**: 374–7.
219. Martinu L, Santiago-Walker A, Qi H, Chou MM. Endocytosis of epidermal growth factor receptor regulated by Grb2-mediated recruitment of the Rab5 GTPase-activating protein RNTre. *J Biol Chem* 2002;**277**: 50996–1002.
220. Su IC, Su YK, Chuang HY, Yadav VK, Setiawan SA, Fong IH, Yeh CT, Huang HC, Lin CM. Ubiquitin-Specific Protease 6 n-Terminal-like Protein (USP6NL) and the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling Axis Regulates Ubiquitin-Mediated DNA Repair and Temozolomide-Resistance in Glioblastoma. *Biomedicines* 2022;**10**.
221. Jiang D, Li Y. Unraveling the immunosuppressive microenvironment of glioblastoma and advancements in treatment. *Front Immunol* 2025;**16**: 1590781.
222. Burger MC, Zhang C, Harter PN, Romanski A, Strassheimer F, Senft C, Tonn T, Steinbach JP, Wels WS. CAR-Engineered NK Cells for the Treatment of Glioblastoma: Turning Innate Effectors Into Precision Tools for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2019;**10**: 2683.
223. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010;**17**: 98–110.
224. Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, deCarvalho AC, Lyu S, Li P, Li Y, Barthel F, Cho HJ, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* 2017;**32**: 42–56.e6.
225. Park AK, Kim P, Ballester LY, Esquenazi Y, Zhao Z. Subtype-specific signaling pathways and genomic aberrations associated with prognosis of glioblastoma. *Neuro Oncol* 2019;**21**: 59–70.
226. Ma H, Zhao C, Zhao Z, Hu L, Ye F, Wang H, Fang Z, Wu Y, Chen X. Specific glioblastoma multiforme prognostic-subtype distinctions based on DNA methylation patterns. *Cancer Gene Ther* 2020;**27**: 702–14.
227. Zhang P, Xia Q, Liu L, Li S, Dong L. Current Opinion on Molecular Characterization for GBM Classification in Guiding Clinical Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Front Mol Biosci* 2020;**7**: 562798.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen im Labor *Molekulare Radioonkologie* unter Betreuung von apl. Prof. Dr. Stephan Huber und Mitbetreuung von apl. Prof. Dr. Franziska Eckert durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Stephan Huber und Franziska Eckert. Sämtliche Versuche mit Ausnahme der Patch-Clamp-Experimente und der RNA-Sequenzierung (Transkriptomanalyse) wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Dr. Katrin Ganser und Dr. Nicolai Stransky von mir eigenständig durchgeführt. Die Patch-Clamp-Ableitungen wurden unter meiner Zuarbeit und Assistenz von Stephan Huber durchgeführt und die elektrophysiologischen Daten unter Anleitung von Stephan Huber analysiert. Die RNA-Sequenzierung wurde extern durch IMGM Laboratories GmbH, München-Martinsried, Deutschland, durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie eigenständig.

Ich versichere, das Manuskript nach Anleitung und sprachlicher Korrektur durch Stephan Huber und nochmaliger Rechtschreibkorrektur durch Nicolai Stransky selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 20. 11. 2025

A handwritten signature in black ink, reading 'T. Abed' in a cursive script.

Tayeb Abed

8 Veröffentlichungen

Themen einzelner Kapitel der Einleitung wurden in folgendem Übersichtsartikel veröffentlicht:

Abed T, Ganser K, Eckert F, Stransky N, Huber SM. Ion channels as molecular targets of glioblastoma electrotherapy. *Front Cell Neurosci* 2023;**17**: 1133984.

Das heterogene Antwortverhalten individueller patientenstämmiger Glioblastom-Stammzellkulturen *in vitro* und im orthotopen Glioblastom-Mausmodell auf kombinierte Bestrahlung und K_{Ca}-Kanal-„Targeting“ zeigt folgende Originalarbeit:

Ganser K, Stransky N, **Abed T**, Quintanilla-Martinez L, Gonzalez-Menendez I, Naumann U, Koch P, Krueger M, Ruth P, Huber SM, Eckert F. K(Ca) channel targeting impairs DNA repair and invasiveness of patient-derived glioblastoma stem cells in culture and orthotopic mouse xenografts which only in part is predictable by K(Ca) expression levels. *Int J Cancer* 2024;**155**: 1886–901.

9 Danksagung

Zuerst möchte ich meiner Familie danken für ihre Liebe, Geduld und dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben. Ihr habt mir den Raum gegeben, mich voll auf diese Arbeit zu konzentrieren, und dafür bin ich unendlich dankbar.

Ein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater, apl. Prof. Dr. Stephan Huber. Trotz seines wohlverdienten Ruhestands hat er sich immer Zeit für mich genommen, mich fachlich unterstützt und mit wertvollen Impulsen durch die gesamte Arbeit begleitet, dafür bin ich ihm sehr dankbar.

Ebenso danke ich Dr. Katrin Ganser und Dr. Nicolai Stransky für die Hilfe bei der Einarbeitung, die konstruktive Zusammenarbeit, für ihr hilfreiches Feedback und ihre inspirierenden Gespräche. Nikolai danke ich zudem für die finale Rechtschreibkorrektur der Arbeit.

Und natürlich danke ich dem gesamten Team der Klinik für Radioonkologie, für die angenehme Atmosphäre, die Motivation und die vielen Momente, die diese Doktorarbeit nicht nur möglich, sondern auch bereichernd gemacht haben.