

**Universitätsmedizin
Rostock**

**Universität
Rostock**



Traditio et Innovatio

Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie
Gertrudenstraße 9
18057 Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Köhling

Galvanotaktische Migration von Glioblastomzellen im Vergleich zu Metastasezellen im Gehirn

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von:

Daria Shams Esfand Abady
geboren am 03.03.1998 in Bielefeld

Rostock 2023

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004854

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Timo Kirschstein
Oscar Langendorff Institut für Physiologie - Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Thomas M. Freiman
Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie - Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. med. Cor de Wit
Institut für Physiologie - Universität zu Lübeck

Jahr der Einreichung: 2023

Jahr der Verteidigung: 2024

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	4
1.1 GLIOBLASTOM - EINE KURZE VORSTELLUNGSRUNDE	4
1.1.1 PRIMÄRES UND SEKUNDÄRES GLIOBLASTOM	5
1.1.2 TUMORHETEROGENITÄT	6
1.1.3 PATHOGENESE	6
1.1.4 INVASION UND MIGRATION	9
1.2 GALVANOTAKTISCHE MIGRATION	10
1.3 FRAGESTELLUNGEN DIESER ARBEIT	12
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 MATERIAL	14
2.1.1 LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN ZUR BEHANDLUNG HUMANER ZELLEN	14
2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	14
2.1.3 GERÄTE UND SOFTWARE	14
2.1.4 ZELLKULTUREN	15
2.2 METHODEN	17
2.2.1 ZELLEN KULTIVIEREN	17
2.2.2 AGAROSEBRÜCKEN	17
2.2.3 GLEICHSTROM-STIMULATIONSKAMMER	17
2.2.4 ZELLEN AUSSÄHEN	18
2.2.5 GALVANOTAXIS	19
2.2.6 MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN	19
2.2.7 BILDBEARBEITUNG UND AUSWERTUNG	19
2.2.8 VERSUCHSVARIATIONEN	21
2.2.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG UND DIAGRAMME	21
3. ERGEBNISSE	22
3.1 MIGRATION VON GLIOBLASTOMZELLEN IM GLEICHSTROMFELD	22
3.2 VERHALTEN VON METASTASEZELLEN IM GLEICHSTROMFELD	27
3.3 VERGLEICH VON GLIOBLASTOMZELLEN MIT METASTASEZELLEN	29
3.4 EINFLUSS DER PHARMAKOLOGISCHEN BEEINFLUSSUNG DES EGF-REZEPTORS UND DES PI3K/AKT-SIGNALWEGS AUF DIE GALVANOTAKTISCHE MIGRATION	32
4. DISKUSSION	39
4.1 GROBE HETEROGENITÄT DER GLIOBLASTOMZELLEN	39
4.2 GERICHTETE MIGRATION	41
4.2.1 AUSWIRKUNGSMÖGLICHKEITEN DES ELEKTRISCHEN FELDES	42
4.2.2 EINE MÖGLICHE ROLLE DES EGF-REZEPTORS	44
4.2.3 EINFLUSSMÖGLICHKEITEN DES PI3K/AKT-SIGNALWEGS	46
5. ZUSAMMENFASSUNG	49

6. THESEN	50
7. BIBLIOGRAFIE	51
8. ANHANG	64
8.1 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	64
8.2 LEBENSLAUF	64
8.3 VORABVERÖFFENTLICHUNG DER DISSERTATION	64
8.4 DANKSAGUNG	65
8.5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	66
8.6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	68
8.7 TABELLENVERZEICHNIS	69

1. Einleitung

1.1 Glioblastom - eine kurze Vorstellungsrunde

Bei einem Glioblastom handelt es sich um den häufigsten und verheerendsten primären bösartigen intrinsischen Gliatumor bei Erwachsenen [Cheray 2017; Fernandes 2017; Vleeschouwer 2017]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO, *world health organization*) teilte ihn, aufgrund seiner Eigenschaften, zu den WHO Grad IV (nach WHO-Klassifikation 2016) und ZNS WHO Grad 4 (nach WHO-Klassifikation 2021) [Weller 2022] Tumoren ein.

Dieser Tumor stellte 16 % aller Neoplasien des zentralen Nervensystems (ZNS) dar [Thakkar 2014; Ostrom 2013], womit das Glioblastom den größten Anteil der circa 240.000 weltweit jährlich diagnostizierten Hirntumore bildete [Cheray 2017]. Er trat vorrangig bei Patienten im höheren Alter auf, zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren sie im Median 64 Jahre alt [Ostrom 2013; Chakrabarti 2005] (der Durchschnitt lag bei 55 Jahren [Wilson 2014]). Das höchste Risiko, daran zu erkranken, bestand statistisch gesehen zwischen dem 75. und 84. Lebensjahr und sank nach dem 85. Lebensjahr [Ostrom 2013]. Bei einem sekundären Glioblastom war das durchschnittliche Diagnosealter mit 40 Jahren tendenziell niedriger als bei der primären Variante [Wilson 2014]. Eine Erkrankung im Kindes- oder Jugendalter gilt als ungewöhnlich beziehungsweise selten [Ostrom 2013] und obwohl es ähnliche Desoxyribonukleinsäure-Methylierungsmuster für die pädiatrische und die erwachsene Gruppe gab, unterschieden sie sich in einigen Clustern [Tamimi 2017; Sturm 2014]. Ein Glioblastom im pädiatrischen Gebiet ist also nicht direkt mit einem primären Glioblastom vergleichbar, weshalb Studienergebnisse für Tumore im Kindesalter nicht komplikationslos übertragbar sind.

Die genaue Herkunft des Glioblastoms steht zum jetzigen Zeitpunkt noch zur Diskussion. Als Ursprungszellen wurden bislang Astrozyten [Kleihues 1995], also differenzierte Gliazellen, gliale Vorläuferzellen [Louis 2016], Stamm- oder neuronale Vorläuferzellen [Bachoo 2002; Dai 2001] betrachtet. Es trat vor allem in den supratentoriellen Regionen auf [Chakrabarti 2005], selten im Kleinhirn [Tamimi 2017] und noch seltener im Rückenmark [Adams 2013; Engelhard 2010]. Hier waren die ungewöhnlicheren Lokalisationen, Studien zufolge, häufiger bei jüngeren Patienten zu finden [Tamimi 2017].

Aufgrund der hohen Aggressivität des Glioblastoms erhalten die Patienten eine schlechte Prognose [Cheray 2017]. Die mediane Überlebenszeit ohne Therapie lag bei gerade einmal drei Monaten [Malmström 2012] und selbst mit aggressiver multidisziplinärer Therapie betrug die mittlere Überlebenszeit nur 15 Monate [Koshy 2012; Stupp 2005], bei einer Zwei-Jahres-Überlebensrate von 20-33 % [Gilbert 2013; Stupp 2005] und einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von sogar nur 1-3 % [Cheray 2017]. Die aktuelle *lege artis* Therapie besteht aus einer maximalen sicheren operativen Resektion, Strahlentherapie, Chemotherapie mit Temozolid [Perry 2012] und zielgerichteter molekularer Therapie [Stupp 2015; Cheng 2011; Stupp 2005]. Diese Therapie ist, wie an der niedrigen Überlebensrate erkennbar, nicht kurativ und bei allen Patienten kam es zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Tumorprogression mit nahezu universeller Sterblichkeit [Cheray 2017]. Die diffuse infiltrative Natur des Glioblastoms sowie seine signifikante molekulare und zelluläre Heterogenität führten zu seiner Therapieresistenz und vermehrten Tumorrezidiven [Stupp 2005]. Die zelluläre Heterogenität, Infiltrationsfähigkeit [Cheray 2017] und seine Strahlenresistenz sorgten für eine begünstigte Schadensantwort [Liu 2006; Dean 2005]. Bei Glioblastomen war die Chemoresistenz

oftmals die Folge einer Überexpression der O₆-Metylguanin-Methyltransferase und Apoptoseinhibitoren [Liu 2006; Dean 2005]. All diese Faktoren trugen dafür Sorge, dass eine vollständige Resektion in vielen Fällen nicht möglich war [Cheray 2017] und verbliebene Zellen des Tumors von den Behandlungsversuchen verschont blieben [Xie 2014].

Aufgrund der allgemein schlechten Prognose und der aktuell unzureichenden Therapiemöglichkeiten hält man nun Ausschau nach einer zielgerichteten Therapie, die ihren Vorteil in der selektiven Tumorzelltötung hätte [Perry 2012] und so auf die Tumorerogenität und die Invasivität individuell eingehen könnte. Diese individuellen Kombinationstherapien nach einer Resistenztestung werden vermehrt notwendig, da die inter- und intratumorale Heterogenität eine einheitliche Therapie bisher verhinderte. Um dies zu ermöglichen, ist nicht nur eine genaue Differenzierung der Zellen im Vorfeld sinnvoll [Lombardi 2017], sondern auch eine Unterscheidung der Tumorentitäten von Bedeutung.

1.1.1 Primäres und sekundäres Glioblastom

Hirntumore können allgemein in primäre, also im Gehirn entstandene, wie das Glioblastom, und sekundäre, die als Metastase eines extracerebralen Tumors entstanden sind, eingeteilt werden. Geprägt wurden die Begriffe des primären und sekundären Glioblastoms 1940 vom Neuropathologen Hans Joachim Sherer [Kleihues 1999]. Diese Differenzierung zweier unterschiedlicher Krankheitsentitäten, die zwar histologisch nicht unterscheidbar waren [Lombardi 2017; Mansouri 2017], sich jedoch aus verschiedenen genetischen Vorläufern entwickelten und so unterschiedliche charakteristische genetische Veränderungen aufwiesen [Brennan 2013; Ohgaki 2004], ist entscheidend. Dies hängt damit zusammen, dass es sich bei beiden zwar um von Natur aus diffuse Tumore handelt, sie jedoch durch unterschiedliche molekulare Pfade ein funktionell zu differenzierendes Tumorverhalten gegenüber den Behandlungsstrategien zeigten und so zu verschiedenen klinischen Ergebnissen führten [Ohgaki 2007; Ohgaki 2004]. Die Isocitratdehydrogenase-Mutation ist für die Differenzierung von besonderem Interesse. Sie ist ein frühes Ereignis bei der Gliomgenese und veränderte sekundär weitere Endpunkte (wie beispielsweise durch den Verlust von Tumorsuppressorgen wie dem für den Tumorsuppressor p53 und dem Retinoblastom-Gen 1) [Mansouri 2017].

Primären Glioblastomen geht keine vorherige Tumordiagnose voran und sie machten 90 % der Glioblastome aus [Ohgaki 2013]. Sie kamen zumeist bei älteren Patienten vor [Ohgaki 2004]. Eine Amplifikation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) zeigten 35 % der primären Glioblastome und 24 % eine Mutation in dem Phosphatase und Tensin homologon (PTEN)-Gen [Costello 1997]. Die EGFR-Amplifikation war meist eine der Variante III (EGFRvIII), durch die ein schwaches, aber konstitutiv aktiviertes Rezeptorsignal entstand [Hatanpaa 2010; van den Bent 2007], dies sorgte für verstärkte Proliferation und Überleben der Tumorzellen [Crespo 2011]. In fast ausschließlich fortgeschrittenen Stadien kam es dann zu einer PTEN-Deletion beziehungsweise Mutation [Crespo 2011].

Sekundäre Glioblastome entstanden als Weiterentwicklung niedriggradiger Astrozyten- oder Oligodendrozytentumoren (WHO-Grad II oder III) [Ohgaki 2013] und sie hatten ähnliche klinische Merkmale wie ihre Ursprungstumore [Mansouri 2017]. Insgesamt waren sie deutlich seltener [Mullins 2013b] und die Betroffenen waren im Durchschnitt 17 Jahre jünger als Patienten mit einem primären Glioblastom [Ohgaki 2004; Dropcho 1996]. Der klinische Verlauf stellte sich länger dar, da

der Tumor oft ein deutlich weniger aggressives Verhalten zeigte [Nobusawa 2009; Ohgaki 2005; Ohgaki 2004].

1.1.2 Tumorheterogenität

Primäre Glioblastome weisen eine signifikante genetische Heterogenität auf, sodass eine weitere Unterteilung in Tumorsubtypen mit verschiedenen genetischen Veränderungen, die eine wichtige prognostische Bedeutung hatten, sinnvoll wurde [Kleihues 1999]. In einem einzigen Tumor war zudem ein heterogener Satz an Tumorzellen zu finden [Sturm 2014], diese unterschieden sich nicht nur morphologisch voneinander, sondern die Zellen übernahmen während der Tumorgenese auch verschiedene Rollen [Yuan 2004], was oft für eine Variabilität in den Beobachtungen sorgte und eine korrekte Identifizierung des Tumorsubtyps zunehmend erschwerte [Kim 2014; Scott 1995]. Dem Tumor erlaubte diese Heterogenität, auf selektiven Druck zu reagieren und sie trug so zu seiner Aggressivität, seinem Wachstum und an vielen Stellen auch zum Therapieversagen bei [Yap 2012].

Es scheinen im Wesentlichen zwei Mechanismen von größerer Relevanz zu sein, wenn es um die Frage geht, wie es zu dieser hohen Heterogenität kommen könnte. Zum einen wiesen die Krebszellen einen unterschiedlichen Grad der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in verschiedene Zelltypen auf und die koloniale Evolution erhöhte die genetische Vielfalt innerhalb des betroffenen Gewebes. Diese Heterogenität im Tumor zeichnete sich durch eine räumliche Definierung vom Tumorkern bis zur Peripherie aus [Stieber 2013; Gerlinger 2012]. Zum anderen hingen die Diffusions- und Invasioneigenschaften eng mit den wandernden Gliom-Stammzellen zusammen [Brabletz 2005]. Abhängig davon, aus welchem Tumorquadranten eine Probe zur Untersuchung entnommen wurde, konnten dementsprechend unterschiedliche molekulare Subtypen differenziert werden [Sottoriva 2013].

Ohne ein verallgemeinerbares Konzept für die Heterogenität in einem Tumor wird es schwer sein, ein festes Ziel für die Therapie zu finden. Der Tumor wird in Folge dessen durch die Therapie nie vollständig getroffen, sodass das Risiko für weitere Infiltration, Rezidive und allgemeines Therapieversagen erheblich ist [Vleeschouwer 2017]. Trotz dieser Heterogenität scheint es einige Signalwege zu geben, die sich bereits in der Vergangenheit für das Glioblastom als wichtig herausgestellt haben. Es ist also ersichtlich, welche zentrale Rolle der Pathogenese bei dem primären Glioblastom zukommt.

1.1.3 Pathogenese

Das primäre Glioblastom konnte in mehrere Abstammungslinien der Tumorentstehung differenziert werden [Chen 2012; Wang 2010; Pollard 2009]. Seine hohe Sterblichkeit wurde oftmals auf eine sehr komplexe Pathobiologie zurückgeführt, welche mit einer hoher Zellularität, Neovaskularisation, Hypoxie oder Nekrosen, Infiltration von Immunzellen und lokaler Invasion einherging [Vartanian 2014].

Bei der Tumorentstehung stehen im Wesentlichen zwei Modelle zur Diskussion. Es wird zwischen einem stochastischen und einem hierarchischen Tumormodel unterschieden. Bei dem stochastischen Modell geht man davon aus, dass alle Tumorzellen eine vergleichbare proliferative, wandernde und infiltrative Eigenschaft hätten und zufällig aus genetisch beeinträchtigten Gliazellen

1.1.3.1 EGF-Rezeptor

Bei dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor handelt es sich um ein Transmembranprotein [Jorissen 2003], das als Mitglied der Rezeptorfamilien der humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (ErbB/HER, *human epidermal growth factor receptor*) unterschiedliche epidermale Wachstumsfaktoren bindet. Er liegt als inaktives Monomer vor und erfährt dann klassischerweise eine Liganden-induzierte Dimerisierung zweier benachbarter Rezeptoren, die dann zu einer Konformationsverschiebung führt. Schlussendlich aktiviert dies die Kinasefunktion der Rezeptor-Tyrosin-Kinase und ermöglicht die Kreuzphosphorylierung der Tyrosinreste. Damit bildet sie die Vorbereitung für nachgeschaltete Signalkaskaden [Lombardi 2017]. Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*) hat normalerweise eine Signalfunktion bei der Proliferation, Migration, Differenzierung und dem Überleben aller Zellarten des zentralen Nervensystems [Nicholas 2006]. Neben dem PI3K/AKT-Signalweg, der im Folgenden näher beschrieben wird, aktiviert der EGF-Rezeptor ebenfalls *signal transducers and activators of transcription* (STAT, Transkriptionsfaktoren) [Schrump 2001; Silvennoinen 1993] und die Signalweiterleitung über das *rat fibrosarcom protein* (RAF, eine Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen), mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen (MEK, *mitogen activated/extracellular signal-activated kinase kinase*) und *extracellular signal regulated kinase* (ERK, eine Serin/Threonin-Kinase) [Yap 2011; Lewis 1998].

Bei Glioblastomen war die EGFR-Signalisierung entweder durch Überexpression des Rezeptors, seiner Liganden oder durch Amplifikation des EGFR-Locus gestört [Huang PH 2009]. Diese Mutation resultierte in einem verkürzten Proteinprodukt [Carpten 2007] und führte somit zu einer konstitutiven Aktivierung und unkontrollierten Zunahme der Phosphorylierung, wobei unterschiedliche Variationen in einem Tumor möglich waren [Lombardi 2017]. Eine EGFR-Amplifikation sprach im Schnitt für eine hochgradige Malignität, die mit einer schlechteren Prognose und kürzeren Überlebenszeit des Patienten einherging [Jeuken 2009]. Die Variante III des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors aktivierte das *RAS related C3 botulinum toxin substrate 1* (RAC1, eine RHO-GTPase), welches für die Bildung von Vorsprüngen an der Vorderkante der Zelle wichtig war und die Migration von Zellen durch die Tyrosinproteinkinase SRC (SRC)-abhängige *dedicator of cytokinesis 1* (DOCK 180, ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor)-Phosphorylierung vorantrieb [Feng 2012; Feng 2011].

1.1.3.2 PI3K/AKT-Signalweg und PTEN

Die Phosphoinositid-3-Kinase wird an die Zelloberfläche rekrutiert und anschließend durch den EGF-Rezeptor aktiviert. Sie wandelt durch Phosphorylierung Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) um [Mansouri 2017; Oh 2014], dies induziert weiter nachgeschaltete Moleküle wie die Proteinkinase B [LoPiccolo 2008]. Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs sorgt dann, durch die Herunterregulierung vom Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 1B, für eine erhöhte Zellproliferation und führt zu einer Beeinflussung der Zellzyklusprogression [Narita 2002]. Zudem inaktiviert es proapoptotische Gene [Datta 1997] sowie die Transkription von Pro-Überlebens-Genen unter dem Einfluss von dem *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NFκB, ein spezifischer Transkriptionsfaktor) [Ozes 1999].

Am zweithäufigsten bei allen Tumorarten war das Tumorsuppressorgen verändert, welches für PTEN verantwortlich ist [Stokoe 2001]. Diese Veränderungen befanden sich auch in 40 % der Glioblastome, überwiegend in den primären Glioblastomen [Tohma 1998]. PTEN ist normalerweise

der Negativregulator der Phosphoinositid-3-Kinase und beendet das PIP₃-Signal durch seine Dephosphorylierung, sodass die Proteinkinase B und das *mammalian target of rapamycin* (mTOR, eine Serin/Threonin-Kinase) im Anschluss nicht wie zuvor aktiviert werden [LoPiccolo 2008]. In „normalen“ Zellen spielen diese eine zentrale Rolle bei der Hemmung der Zellproliferation und der Regulierung der Fähigkeit von Zellen zur Migration und Invasion [Tamura 1998]. Seine Inaktivierung führte zu einer erhöhten PI3K-Verfügbarkeit, in deren Folge eine vermehrte Signalübertragung stattfand [Lombardi 2017]. In Verbindung gebracht wurde dies mit einer erhöhten Pathogenität des Glioblastoms [Koul 2008]. Eine Mutation in der Proteinkinase B, dem bereits angesprochenen nachgeschalteten Effektor der Phosphoinositid-3-Kinase, der zur Zellproliferation und Hemmung der Apoptose führt, war in Gliomen nicht üblich [Mansouri 2017]. In anderen Tumoren zeigten sich hier jedoch durch Inhibition mit Capivasertib, einem hoch potenten *pan*-AKT-Inhibitor, vielversprechende Ergebnisse bei der Hemmung der Tumorpheriferation [Andrikopoulou 2022]. Diese soeben angesprochenen Signalwege könnten Einfluss auf das Migrations- und Invasionsverhalten des Glioblastoms nehmen, welches sich ebenfalls von entscheidender Bedeutung für die Tumorpheriferation und den Verlauf der Erkrankung zeigten.

1.1.4 Invasion und Migration

Die Tumorzellinvasion und -migration sind charakteristisch für die Ausbreitung des Glioblastom [Johansen 2016]. Die invasive Natur war so nicht nur für die lokale Zerstörung von gesundem Gewebe verantwortlich, sondern auch für die Rezidivhäufigkeit [Demuth 2004]. Der Außenrand der Tumorzellverbreitung war in bildgebenden Verfahren schlecht bis gar nicht zu beurteilen, denn einzelne infiltrative Gliomzellen konnten sich weit vom soliden Tumorrand entfernen [Lorenzo 2017]. Sie wanderten sogar bis in die kontralaterale Hemisphäre, sodass sie eine vollständige Resektion inklusive aller Ausläufer unmöglich machten [Armento 2017; Zhang 2012; Bellail 2004; Bernstein 1995]. Durch die Heterogenität in der Tumormikroumgebung entzogen sie sich zudem zum Teil auch der Bestrahlung und Chemotherapie [Armento 2017; Zhang 2012]. Die Lokalrezidive traten in 80 % der Fälle im Randbereich von 2.5 cm um die ursprüngliche Resektionshöhle auf, obwohl die zurückgelegten Entfernungen von Tumorzellen deutlich größer sein konnten [Wernicke 2016]. Die Herkunft dieser Invasions- und Migrationseigenschaften, an der die bereits beschriebenen Möglichkeiten der Signalweiterleitung beteiligt sein könnten (s. 1.1.3 Pathogenese), erschienen deshalb von großer Bedeutung.

Die Zellen reagierten auf verschiedene Migrationshinweise wie beispielsweise Chemokine und induzierten eine direkte Migration durch Chemotaxis [Munson 2013], sodass endogene elektrische Felder vermutlich einen Einfluss auf die Migration hatten [Huang 2016]. Ionenkanäle spielten nicht nur bei der elektrischen Signalweiterleitung, sondern auch bei der Zellmigration und Metastasierung von Tumorzellen eine Rolle [Sontheimer 2008]. Das elektrische Feld könnte im Gehirn durch die Gewebepolarität der Gehirnmakrostrukturen sowie der lokalen Feldpotentiale, die aus den abgefeuerten Aktionspotentialen der Neuronen aufgebaut wurden, entstehen [Hales 2014]. Der schwache endogene Strom stellte sich in Studien mit Mäusen als Anhaltspunkt für die Migration von Neuroblasten aus der subventrikulären Zone dar [Cao 2013]. Dies gab Grund zur Annahme, dass physiologische, elektrische Felder eine wichtige Rolle bei der Tumordinvasion und -entstehung spielten [Tsai 2020; Sun 2018; Huang 2017; Huang 2016] und einen Einfluss auf die Migration der Zellen haben könnten.

1.2 Galvanotaktische Migration

Alle Zellen besitzen ein elektrisches Potential über ihre Plasmamembran hinweg [Payne 2019]. Ist das Zytoplasma relativ zum extrazellulären Raum positiver geladen, gilt die Zelle als depolarisiert. Ist das Zytoplasma negativer als der extrazelluläre Raum, spricht man von einer hyperpolarisierten Zelle, sie hat ein stärker negatives Membranpotential. Das Membranpotential beschreibt den elektrochemischen Gradienten über eine Membran und wird durch Ionenkanalexpression, Ionenzusammensetzung des extrazellulären Raumes und bioelektrische Gradienten, wie beispielsweise einem elektrischen Feld, reguliert [Wright 2004]. Das wohl bekannteste Beispiel dafür sind Neuronen, aber auch andere Zellen waren befähigt, bioelektrische Signale zu empfangen und zu erzeugen [Funk 2015; Levin 2018].

Vor ungefähr 175 Jahren berichtete Emil du Bois-Reymond über das Vorhandensein von elektrischen Feldern in der Haut von Froschwunden [du Bois-Reymond 1848]. Beinahe 100 Jahre später demonstrierte Burr, dass Spannungsmessungen verwendet werden konnten, um einen Tumor *in vivo* zu erkennen und lieferte den Hinweis darauf, dass sich die bioelektrischen Eigenschaften des tumorösen Gewebes von denen des „normalen“ Gewebes unterscheiden [Burr 1941]. 1970 wies Cone nach, dass Veränderungen im Membranpotential und dem Ionenfluss die Mitose steuerten, wodurch die Verbindung zu den bösartigen Modulationen entstand [Cone 1974; Cone 1971; Cone 1970]. Eben diese Unterschiede in der biologischen Impedanz von Krebszellen im Gegensatz zum umliegenden Gewebe wurden im Laufe der Jahre immer weiter zum Ziel von Forschung und Therapie [Cuzick 1998; Faupel 1997].

Bioelektrische Felder entstehen immer dort, wo eine elektrische Potentialdifferenz zwischen zwei Punkten herrscht, die zum Beispiel durch polarisierten Ionentransport und Stromfluss erzeugt wurde [Messerli 2011]. Die Galvanotaxis stellt hierbei das kollektive Ergebnis verschiedener Mechanismen dar, einschließlich asymmetrischer Ioneneinflüsse [Mycielska 2004] sowie der bevorzugten Aktivierung spannungsgesteuerter Kanäle und der elektrophoretischen Umverteilung von Membrankomponenten [Allen 2013]. Als Elektrotaxis wird die Beeinflussung der Zellbewegung in eine bestimmte Richtung durch Hinzugabe einer geringen Voltzahl in einem gleichgerichteten elektrischen Feld bezeichnet [Lyon 2019; Zhao 2009], aber ebenso eine endogene Reaktion auf physiologische elektrische Felder zwischen 3 und 500 V/m, zum Beispiel bei der Wundheilung, der neuronalen Entwicklung und der Tumorinvasion [Chernet 2013; Stock 2013; Mycielska 2004; Song 2004; Borgens 1981]. Typische elektrische Felder in *in vitro*-Studien der Elektrotaxis mit Glioblastomzellen, neuronalen Stammzellen und anderen soliden Tumorzellen lagen deswegen in einem Bereich von 100-300 V/m [Feng 2017; Huang 2017; Zhao 2015; Tsai 2013]. Es wurde beobachtet, dass im Gleichstromfeld verschiedene Zellarten und -typen in unterschiedliche Feldrichtungen wanderten [Mycielska 2004]. In Forschungen mit den U87-Zellen (verewigte Glioblastomzellen) zeigte sich im elektrischen Feld eine starke anodische Wanderung, während die Zellen ohne Gleichstromfeld ungerichtet migrierten [Huang 2016]. Metastatisch aktivere Zellen zeigten derweil eine stärkere kathodische Tendenz [Huang CW 2009; Pu 2007; Fraser 2005].

Dem ErbB-Signalweg wurde ebenfalls eine Relevanz für die Elektrotaxis zugesprochen. Seine EGFR-Expression korrelierte mit seinem Ansprechen auf das elektrische Feld bei Brustkrebszellen [Wu 2013; Pu 2007; Zhao 2002]. Bei Patienten mit einer bestimmten Punktmutation am epithelialen Wachstumsfaktorrezeptor konnte diese Wanderungstendenz mit einer onkogenen Aktivität in

Verbindung gebracht werden, beziehungsweise wurde ihr zumindest eine gewisse Vorhersagekraft zugesprochen [Lee 2006]. Die Tumore sprachen beispielsweise nicht auf Afatinib, einen Tyrosin-Kinase-Inhibitor der ersten Generation an, dafür aber auf Inhibitoren der zweiten Generation [Jänne 2015]. Bei dem Glioblastom muss dies noch genauer untersucht werden, besonders wenn man betrachtete, dass eine Inhibition der ERK zu einer erhöhten Zelldirektionalität führte.

Dabei spielte die Elektrotaxis längst nicht mehr nur in der Grundlagenforschung bei der Charakterisierung des Metastasierungspotentials eine Rolle [Djamgoz 2001], sondern es wurde auch an einem neuen Therapieansatz, den sogenannten „*tumor treating fields*“ gearbeitet [Kirson 2007]. Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass Teile des PI3K-Weges, der zuvor schon als Mediator für Keratinozyten, Neutrophile und neurale Progenitor-Zell-Elektrotaxis erkannt wurde und auch die Chemotaxis regulierte [Meng 2011; Zhao 2006], verstärkt waren [Lyon 2019]. Dies ist vor allem dann interessant, wenn man die Elektrotaxis als andere Form der Chemotaxis betrachtet [Lyon 2019]. Die Elektrotaxis würde so die Elektrophorese extrazelluläre Moleküle darstellen, die dann zu einem chemotaktischen Signalgradienten führen [Lyon 2019]. So schien sie nicht nur wichtig für die Produktion, sondern auch für die Erhaltung des intrazellulären Signalgradienten zu sein und Teile des Signals zu steuern, welches die Richtung der Zelle vorgab [Lyon 2019].

Eine PI3K-Hemmung schwächte die Richtungsantwort der Zellen bei der Wundheilung, ohne die Motilität zu beeinflussen, die Stärke dieses Effekts war vom Zelltyp abhängig [Zhao 2006]. Dass weiterhin eine Wanderung von Brustkrebszellen zur Anode erfolgte [Pu 2007] sprach für mehrere oder zumindest einen parallel ablaufenden Mechanismus. Die Migrationshinweise könnten über den PI3K/AKT- und RAF/MEK/ERK-Signalweg durch Umlagerungen im Zytoskelett veranlasst worden sein. Diese erweckten jedoch den Eindruck, einen Teil des PI3K-Signalweges zu benötigen [Lyon 2019; Meng 2011; Zhao 2006]. Die Phosphoinositid-3-Kinase diente in Studien möglicherweise dem Zwischenhalt vom elektrischen Gleichstromfeld zur persistierenden und gerichteten Migration [Lyon 2019] und wies eine starke Beteiligung bei der Elektrotaxis von unterschiedlichsten Zellen auf [Li 2013; Arocena 2010; Yao 2008]. Die Studie von Lyon zeigte eine Aufhebung der Elektrotaxis der U87-Glioblastomzellen durch Inhibition von mTOR, *mammalian target of rapamycin complex 1/2* (mTORC1/2, Poteinkomplexe) und *pan*-AKT [Lyon 2019]. Eine Inhibition von mTOR steigerte das äußere Wachstum und änderte die Bewegung signifikant, es beeinflusste jedoch nicht die Richtung in U87-Glioblastomzellen [Lyon 2019]. Die pharmakologische Inhibition oberhalb der Phosphoinositid-3-Kinase hatte keinen Einfluss auf die Elektrotaxis [Lyon 2019], dies machte den PI3K/AKT-Signalweg zu einem besonders interessanten Forschungsziel. Für diese, von der Zell- und Feldstärke abhängigen, Reaktionen gibt es bis zum aktuellen Zeitpunkt noch keine generalisiert anwendbaren Mechanismen [Cortese 2014; Liu 2014]. Die damit verbundene Streuungsverhinderung oder zumindest die Kontrolle der Streuung könnte ein besseres Management des Tumors für die Therapie bedeuten [McCaig 2009; Funk 2006] und das Tumorverständnis verbessern.

1.3 Fragestellungen dieser Arbeit

Trotz jahrelanger Bemühungen konnte die Überlebensrate von Patienten mit einem Glioblastom nur um einen Monat pro Jahrzehnt Forschungsarbeit erhöht werden [Stupp 2005]. Als Grund für die schlechte Prognose und Ursache für die begrenzte Wirksamkeit von aktuellen Therapien wurde das diffuse Infiltrationsverhalten von Glioblastomzellen in das tumorumgebende Gewebe gesehen [Vollmann-Zwerenz 2020], dessen mögliche treibende Kraft die galvanotaktische Migration der Zellen im bioelektrischen Feld darstellen könnte.

Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, den Einfluss eines elektrischen Gleichstromfeldes auf niedrig-passagierte Glioblastomzellen zu untersuchen. Neben dem Vorliegen eines galvanotaktischen Migrationsphänotyps war vor allem ihre bevorzugte Migrationsrichtung von großem Interesse. Weiterhin stellte sich die Frage, ob die Ergebnisse dann auf alle Tumore im neuronalen Netzwerk übertragen werden könnten. Inwiefern also Metastasezellen, deren primäre Tumore außerhalb des zentralen Nervensystems lagen, einen ähnlichen Migrationsphänotyp aufweisen würden wie die Glioblastomzellen. Und ob sie aufgrund ihrer Metastasierung in einem erhöht bioelektrischen System ebenfalls einer galvanotaktischen Migration unterliegen, oder sich Glioblastom und Metastasen in ihrer polarorientierten Wanderung grundsätzlich unterscheiden würden.

Sollte das erzeugte elektrische Gleichstromfeld von Bedeutung für die Glioblastomzellen sein, stellte sich weitergehend die Frage, wie sein Einfluss auf die entsprechenden Zellen unterbrochen werden könnte. Der EGF-Rezeptor und sein stromabwärtsgelegener PI3K/AKT-Signalweg schienen bisher eine besondere Rolle für die Wahrnehmung einzunehmen. So könnte die pharmakologische Störung des EGF-Rezeptors und des PI3K/AKT-Signalwegs, die galvanotaktische Migration und der Einfluss vorhandener Mutationen in diesem Netzwerk von erhöhtem Interesse sein.

Die genannten Überlegungen können an dieser Stelle in drei zentrale Forschungsfragen zusammengefasst werden (Abb. 2):

1. Zeigen niedrig passagierte Glioblastomzellen im elektrischen Gleichstromfeld einen einheitlichen Migrationsphänotyp?
2. Ähneln das Migrationsverhalten von Metastasen, deren Primärtumor außerhalb des zentralen Nervensystems lag, dem der Glioblastomzellen - handelt es sich also bei der galvanotaktischen Migration um ein allgemein ausgeprägtes Verhalten von Tumoren im neuronalen Netzwerk?
3. Kann die galvanotaktische Migration durch pharmakologische Beeinflussung des EGF-Rezeptors und des stromabwärts liegenden PI3K/AKT-Signalweges verändert werden?

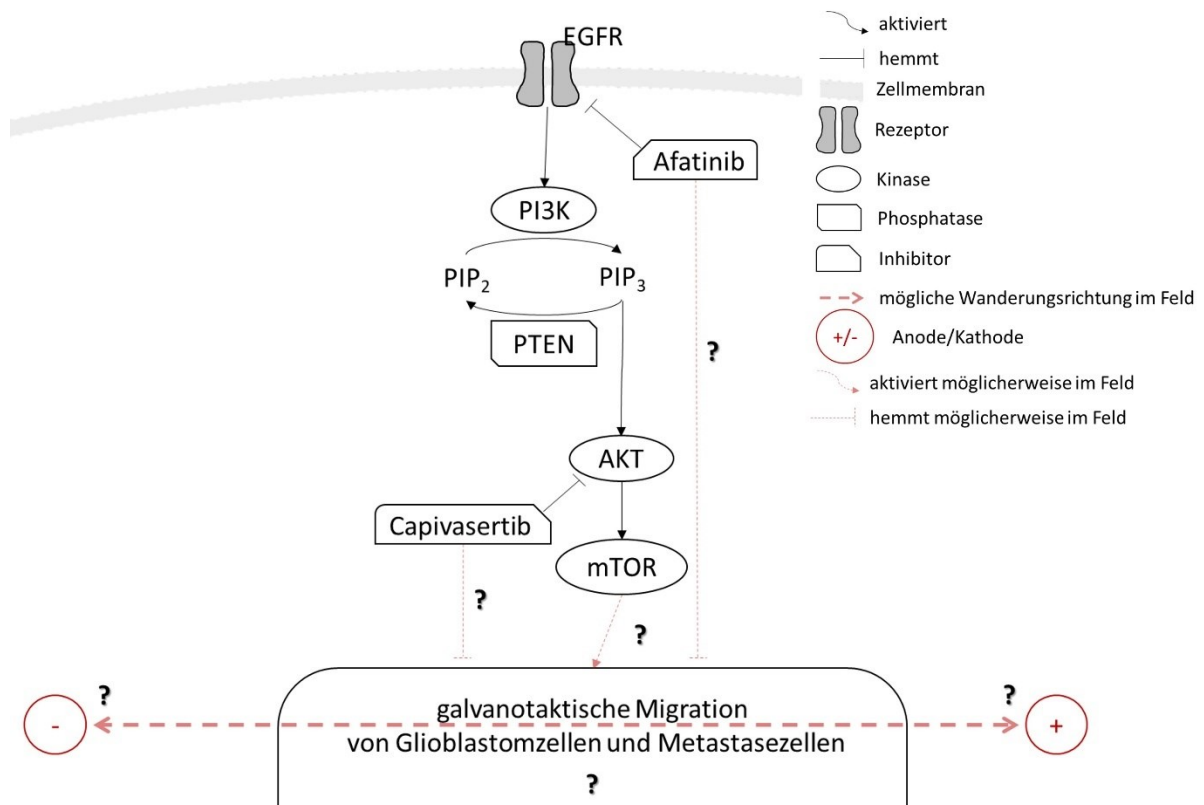


Abb. 2: Möglicher Einfluss des elektrischen Gleichstromfeldes (rot). Ungeklärt war, ob in Glioblastomzellen und Metastasezellen unter Einfluss einer Gleichstromstimulation eine galvanotaktische Migration stattfinden würde und ob dieser eine Richtungsorientierung (Anode oder Kathode) zugeordnet werden könnte. Weiterführend stand die Auswirkungen eines EGFR-Inhibitors (Afatinib) und eines AKT-Inhibitors (Capiasertib) auf die Zellreaktion auf das elektrische Feld offen, um möglicherweise Rückschlüsse auf die Relevanz des EGFR/PI3K/AKT-Signalweg ziehen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Lösungen, Puffer und Medien zur Behandlung humaner Zellen

Tab. 1: Lösungen, Puffer und Medien zur Behandlung humaner Zellen

Produkt	Hersteller
Afatinib	Selleck Chemicals GmbH, Planegg, DEU
Agarose (TopVision)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Capivasertib	Selleck Chemicals GmbH, Planegg, DEU
DMEM/F12	Merck Millipore, Darmstadt, DEU
DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU
Essiglösung 0.1 %	J.T Baker/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FCS Gold ADD	Bio&SELL, Feucht, DEU
Kollagen I	Advance Biomatrix, San Diego, USA
DPBS (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -frei)	PAN-Biotech, Aidenbach, DEU
Ringerlösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DEU
Trypanblau 0.4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom GmbH, Berlin, DEU

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Deckglas 24x60mm	Menzel, Braunschweig, DEU
Filtertip	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, DEU
Myco Alert Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Basel, CHE
Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Silber	World precision Instruments Inc., Sarasota, USA
Silikon (Korasilion Paste M-S 2-200)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU

2.1.3 Geräte und Software

Tab. 3: Geräte und ihre Software

Gerät	Hersteller
Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, DEU
Mikroskop (Leica DMI 6000)	Leica, Wetzlar, DEU
+ Software (LAS X-Software)	Leica, Wetzlar, DEU
+ Software (Leica Application Suit v.2.0.0.13332)	Leica, Wetzlar, DEU
Niederspannungs-Netzteil (Standard Power Pack P25)	Biometra, Göttingen, DEU
Strommessgerät (Voltcraft VC220)	Conrad Electronic, Wollerau, CHE
Zählkammer	Neubauer, Marienfeld, DEU
Zellkammer aus Polyetherketon	Universität Rostock, Rostock, DEU
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, DEU

Tab. 4: Software

Software	Hersteller	Anwendung
ImageJ 1.52a	Wayne Rasbach National Institutes of Health, Washington, USA	Bildbearbeitung und Quantifizierung
GIMP 2.10.20	Free Software Foundation, Boston, USA	Bildbearbeitung
Word 2021	Microsoft Corporation, Redmont, USA	Textverarbeitung
Excel 2021	Microsoft Corporation, Redmont, USA	Tabellenkalkulation
PowerPoint 2021	Microsoft Corporation, Redmont, USA	Abbildungen
SigmaPlot 14.0	Systat Software GmbH, Erkrath, DEU	Statistik und Diagramme
Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CHE	Zitierprogramm

2.1.4 Zellkulturen

Bei den verwendeten Zellkulturen handelte es sich um Zellen, die in der Klinik und Poliklinik der Neurochirurgie der Universität Rostock zwischen August 2009 und August 2011 gewonnen wurden. Die Patienten wurden zuvor informiert und gaben schriftlich ihr Einverständnis zur Nutzung ihrer Gewebeproben zu Forschungszwecken. Alle Verfahren wurden im Vorfeld von der Ethikkommission an der medizinischen Fakultät der Universität Rostock in Anlehnung an allgemein anerkannte Richtlinien zur Verwendung von humanen Zellen genehmigt (Referenznummer A2009/34). Die Zellen wurden im Rahmen einer, unabhängig von diesem Versuch stehenden, *lege artis* Operation entnommen.

Vor dem Beginn dieser Studie wurden die Glioblastom-Zelllinien aus primären Hirntumorproben, die im Folgenden immer mit HROG abgekürzt werden, bereits etabliert und genauer beschrieben [Mullins 2013b].

Die beiden im Folgenden mit HROGBM abgekürzten Zelllinien der Metastasen wurden ebenso wie die Glioblastomzellen behandelt, es sei denn, es wurde separat explizit beschrieben.

Tab. 5: Übersicht der Patientendaten.

	Zelllinie	Subtyp	Lokalisation	Patient
Glioblastom	HROG 02	proneural	parietooccipital, re	m 68
	HROG 05	mesenchymal	temporal, li	w 60
	HROG 15	mesenchymal	parietal, re	m 56
	HROG 17	mesenchymal	parietooccipital, li	m 70
	HROG 24	proneural	occipital, li	w 73
Metastase	HROBML 01	aus einem Lungenkarzinom	Cerebrum	m 67
	HROBMC 01	aus einem Colonkarzinom	Cerebrum	w 60

HROG 02

Es handelte sich um einen 68-jährigen männlichen Patienten mit einem primären, rechts parietooccipitalen Glioblastom vom proneuralen Subtyp. Der Patient verstarb sieben Monate nach der Entnahme des unbehandelten Tumors.

HROG 05

Der 60-jährigen weiblichen Patientin wurde ein links temporales Glioblastomrezidiv vom mesenchymalen Subtyp nach der Chemotherapie entfernt. Sie verstarb drei Monate nach dem Eingriff.

HROG 15

Bei diesem 56-jährigen männlichen Patienten mit rechts parietalem Glioblastomrezidiv vom mesenchymalen Subtyp blieb der Primärtumor unbehandelt. Er verstarb 23 Monate nach der Operation.

HROG 17

Die Zellen des links parietooccipital liegenden Rezidivs eines Glioblastoms wurden einem 70-jährigen männlichen Patienten entnommen. Der Patient verstarb drei Monate nach der Operation.

HROG 24

Es handelte sich um die Zellen eines unbehandelten primären, links occipitalen Glioblastoms vom proneuralen Subtyp bei einer 73-jährigen weiblichen Patientin. Diese verstarb zehn Monate nach der Operation.

HROBML 01

Bei dem 67-jährigen männlichen Patienten handelte es sich um eine Metastase im Cerebrum eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms.

HROBMC 01

Hierbei handelte es sich um Zellen einer niedrig passagierten Metastase eines Colonkarzinoms im Cerebrum bei einer 60-jährigen weiblichen Patientin.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellen kultivieren

Vor dem Versuch wurden die Zelllinien bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden sie dann aufgetaut und im Medium, bestehend aus 10 % fetalem Kälberserum und dem synthetischen Nährmedium „DMEM/F12“, aus *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, ein synthetisches Nährmedium) und *Ham's tissue culture medium* (Ham's F12, ein synthetisches Nährmedium), bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellkulturen mit dem „*MycoAlert Mycoplasma Detection Kit*“ auf Mykoplasmaverunreinigungen getestet. Alle Versuche wurden mit Zellen mit niedriger Passage durchgeführt.

2.2.2 Agarosebrücken

Für die Anfertigung der Agarosebrücken wurde 2.5 % Agarose in Ringerlösung gelöst. Die Formschläuche aus Silikon wurden halbmondförmig in ein Becherglas gesetzt. Im Anschluss wurde die Agarose heiß mit einer Transferpipette in die Schläuche gefüllt. Nach 10-20 min waren sie fest und wurden bis zur Weiterverwendung in Ringerlösung aufbewahrt.

2.2.3 Gleichstrom-Stimulationskammer

Bei der verwendeten Gleichstrom-Stimulationskammer (Abb. 3) handelte es sich um eine modifizierte Form nach Yang [Yang 2014]. Hergestellt wurde sie aus biokompatiblen Kunststoff. Der obere Anteil wurde über eine Nut mit dem unteren Anteil verbunden und konnte über zwölf Schrauben zusätzlich abgedichtet werden. Die Kammer bestand aus einem inneren Reservoir, in dem sich die Zellen befanden und einem getrennten äußeren Reservoir, in dem die Silberchloridspulen lagen. Ihr Aufbau wurde bereits detailliert von Rohde beschrieben [Rohde 2019].

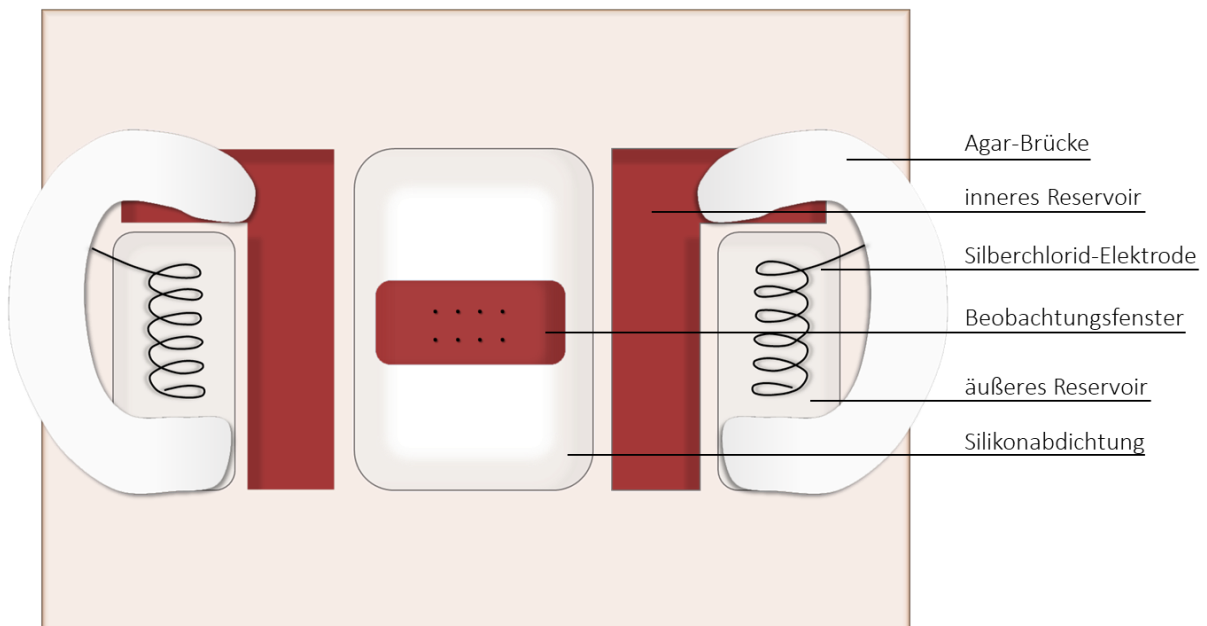


Abb. 3: Aufbau der Gleichstrom-Stimulationskammer in Anlehnung an Rohde [Rohde 2019].

2.2.4 Zellen aussähen

2.2.4.1 Vorbereitung der Kammer

Vor jeder Nutzung wurden die Kammern mit 70 % Alkohol gereinigt. Anschließend wurden alle Komponenten mit einem milden Reinigungsmittel gewaschen und mit destilliertem Wasser abgespült. Um die Umwelteinflüsse auf die Zellen vonseiten der Zellkammer zu minimieren, wurde alles zum Abschluss autoklaviert. Das 24 mm Deckglas, das sich in einer Nut zwischen den beiden Teilen der Kammer befand, wurde mit acht Punkten in gleichmäßigem Abstand an der Unterseite markiert. Diese dienten bei der späteren Bildzuordnung als Orientierungspunkte. Dann wurde das Deckglas mit Silikon versiegelt und beide Teile der Kammer miteinander verschraubt.

Um die Oberflächenspannung herabzusetzen, wurde die gesamte Kammer im Bereich der Zellen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung nach Dulbecco (DPBS, *dulbecco's phosphate buffered saline*) gespült. Danach gab man 0.1 % Essiglösung und Kollagen I für 20 min auf das Deckglas, um eine bessere Haftung zu erzielen. Nach Entfernen der Kollagenlösung wurde das Kammersystem erneut dreimal mit DPBS gewaschen und im Anschluss wurden die vorbereiteten Zellen in die Kammer eingesät.

2.2.4.2 Zellen vorbereiten und passagieren

Die Zellen wurden aus dem Brutschrank entnommen und zunächst mit DPBS mindestens zweimal gereinigt. Das überschüssige Medium wurde nach kurzem Einwirken im Anschluss nach jeder Wäsche abgesaugt. Dies war notwendig, um nicht anhaftende, tote Zellen aus dem alten, verbrauchten Medium und dem Behältnis zu entfernen. Anschließend wurde in den Inhalt der Kulturflasche, in dem die Zellen zuvor kultiviert worden waren, 2 ml Trypsinlösung (0.25 %-ig in DPBS) einpipetiert, um die adhärenen Zellen von dem Boden der Flasche zu trennen und so eine Passagierung in die Kammer zu ermöglichen. Es wurde dann 4 min abtrypsinisiert.

Zur Herstellung eines Pellets wurde mindestens die dreifache Menge an Medium hinzugegeben und in die Zentrifuge bei 110 g für 3 min eingesetzt. Der Überstand wurde abgesaugt und dann mit Medium (ca. 1 ml) resuspendiert. Nun wurde Trypanblau (1:1 Verdünnung) einer kleinen Menge der Suspension beigemischt. Trypanblau ist bei abgestorbenen, perforierten oder anderweitig geschädigten Zellen membrangängig und notwendig, um eine Zellzahlbestimmung vornehmen zu können. Damit konnte im Verlauf sichergestellt werden, dass die Zellzahl in den Kammern über die Versuche hinweg konstant blieb. Die Auswertung erfolgte sofort nach der Beimischung, da Trypanblau zytotoxisch ist, wofür das Gemisch auf die Zählkammer aufgetragen wurde. Es wurden nun vier nicht benachbarte Quadrate ausgezählt.

Die Berechnung der Zellen pro 0.1 µl erfolgte dann wie folgt (Gl. 1):

$$\frac{\Sigma \text{Zählzahl}}{2} = \text{Zellen in 0.1} \quad (\text{Gl. 1})$$

Pro Zellkammer wurden dann 6×10^3 Glioblastomzellen beziehungsweise 8×10^3 Metastasezellen benötigt (Erwartungswert), diese wurden dann in 700 µl Medium in die vorbereiteten Zellkammern eingebracht. Der zentrale Anteil der Kammer wurde dann mit einem Deckglas verschlossen und für ungefähr 24 h inkubiert.

2.2.5 Galvanotaxis

Nach der Inkubation wurden die Deckgläser wieder entfernt und die Zellkammern mit frischem Medium gespült. Dadurch wurden erneut die nicht adhärenen Zellen entfernt und das verbrauchte Medium getauscht. Nun wurden frische, sterile Deckgläser darauf gegeben, die unten und oben mit Silikon abgedichtet wurden. Es erfolgte, wie unten detaillierter ausgeführt, die ersten mikroskopischen Aufnahmen (s. 2.2.6 Mikroskopische Aufnahmen). Anschließend wurde in jeder Zellkammer die Hauptkammer rundherum auf der Oberseite des Deckglases mit Silikon abgedichtet. Die zweite L-förmige Nebenkammer wurde dann mit 7 ml Medium befüllt. Dabei musste auf die Durchlässigkeit zur Hauptkammer geachtet werden.

Die Silberchlorid-Elektrode wurde auf der Seite der Anode eingesetzt. Die Silberspule brachte man in das Reservoir auf der Seite der zukünftigen Kathode ein. Die zuvor angefertigten Agarosebrücken bildeten die Verbindung zwischen Spulen-Nebenkammer und L-förmiger Nebenkammer, die sie mit der Hauptkammer verbanden. Der Stromfluss gelangte so über die Agarosebrücke in die eigentliche Zellkammer. Die beiden Spulen wurden über Krokodilklemmen mit einer steuerbaren Gleichstromquelle verbunden. Die Spannung von durchschnittlichen 200 V/m (136-334 V/m) wurde während des gesamten Versuchsablaufs konstant gehalten. Diese Stromstärken lagen in dem Bereich, der zuvor bereits in anderen Studien [Clancy 2021; Huang 2016] als wirksam für die Migration erachtet wurde.

Der gesamte Aufbau befand sich während der Versuchszeit im Brutschrank, lediglich die Stromquelle wurde außerhalb deponiert. Zu Beginn und Schluss des Versuchs erfolgte die Messung der Stromspannung mit einem Multimeter am Rand des zentralen Zellkammeranteils in einem Abstand von 25 mm. Zu Beginn und nach insgesamt sechs Stunden wurden Zeit und Stromstärke protokolliert und eine weitere mikroskopische Aufnahme erfolgte.

2.2.6 Mikroskopische Aufnahmen

Die Zellkammern wurden einzeln unter das Mikroskop gelegt. Für jedes wurden acht Sichtfelder benötigt, in deren Ausschnitt einzeln liegende Zellen zu erkennen waren und die über die Versuchszeit konstante Merkmale aufwiesen (Abb. 4). Als Orientierung dienten hier in erster Linie die Markierungen, die zu Beginn auf die Unterseite des ersten Deckglases aufgebracht wurden. Die Positionen wurden im System hinterlegt und die Bilder für den Zeitpunkt t_1 abgespeichert. Diese Positionen konnten nach Ablauf der Galvanotaxis (ca. 6 h) erneut aufgesucht und mikroskopiert werden, man erhielt das Bild für den Zeitpunkt t_2 .

2.2.7 Bildbearbeitung und Auswertung

Eine exakte Überlagerung der beiden Bildaufnahmen wurde durch GIMP, einem pixelbasiertes Bildbearbeitungsprogramm, sichergestellt. Für diesen Zweck legte man die Fotos vom Zeitpunkt t_1 und t_2 an ihren signifikanten Merkmalspunkten übereinander (Abb. 5). Die Bewertung der Migration erfolgte mit Hilfe von ImageJ, einem Programm zur Bildanalyse. Pro Sichtfeld wurden maximal fünf Zellen mit allen Zellverlängerungen und zentrierendem Zellkörper beurteilt (Abb. 4) und vermessen (Abb. 5).

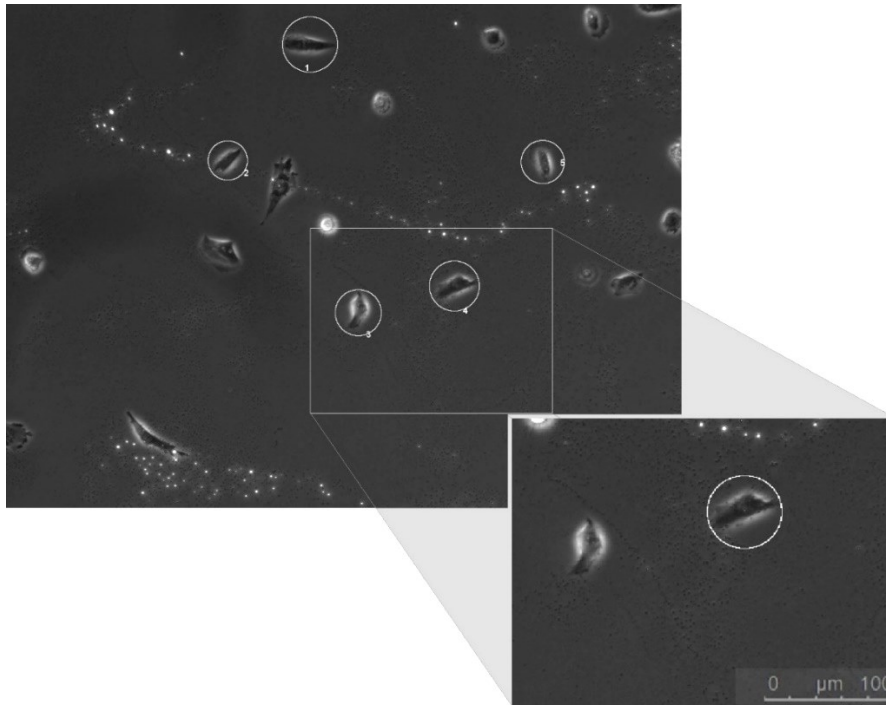


Abb. 4: Mikroskopische Aufnahme der Glioblastomzellen zum Zeitpunkt t_1 (09.09.2022, HROG 17, Zellkasten 05, Bild Nr. 6).

Dazu wurden sie eingekreist und der Kreismittelpunkt (x_t/y_t) zu beiden Zeitpunkten ermittelt (Abb. 5). All diese Vorgänge erfolgten doppelt verblindet.

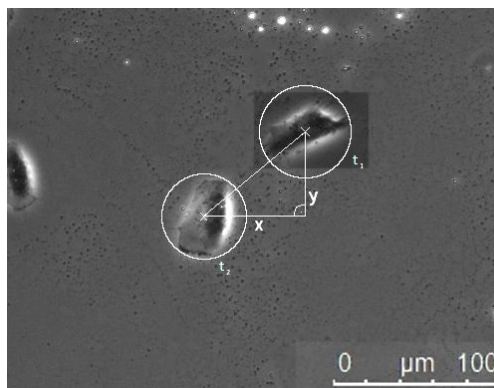


Abb. 5: Überlagerung zum Zeitpunkt t_1 und t_2 mit Umkreisung und eingezeichnetem Mittelpunkt der Zelle 4 (09.09.2022, HROG 17, Zellkasten 05, Bild Nr. 6).

Im Anschluss konnten die notierten Koordinaten des Kreismittelpunktes vom Start- und Endbild nach circa sechs Stunden verglichen werden (Abb. 5). Die gesamte zweidimensionale Migrationsdistanz errechnete sich aus den einzelnen Migrationen in jeder Dimension wie folgt (Gl. 2):

$$\text{Migrationsdistanz} = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2} \quad (\text{Gl. 2})$$

Die Umrechnung von px in μm erfolgte mit Hilfe eines zuvor durch Bildvermessung bestimmten Quotienten. Ein Messstreifen mit festgelegten Markierungsabständen wurde unter dem Mikroskop fotografiert und die Abstände auf gleiche Weise, wie die Zellen, vermessen. 108.2333 px entsprachen hier 100 μm . Aus diesen Koordinaten konnten die Vektoren erhoben werden (Gl. 3).

$$\alpha = \arccos \frac{\left(\frac{(x_1 - x_2)^2 + d^2 - (y_1 - y_2)^2}{2(x_1 - x_2)d^2} \right)}{180\pi} \quad (\text{Gl. 3})$$

Auf diese Weise wurden bis zu 45 Zellen pro Gleichstromzellkammer ausgewertet, die also aus biologischen Replikaten bestanden (Tab. 6). Alle n-Nummern, die im Folgenden verwendet werden, beziehen sich auf die Replikationszahl. Der Anzahl der ausgewerteten Kammern folgt in einzelnen Fällen die Anzahl der vermessenen Einzelzellen.

Tab. 6: Ausschnitt der Tabelle vom 09.09.2020, HROG 17, Zellkasten 05, zu Bild Nr.6.
09.09.2020 HROG 17

ZK05 Bild Nr.6 Zelle	Kreis- Mittelpunkt- Koordinaten t ₁		Kreis- Mittelpunkt- Koordinaten t ₂		Wanderung in X-Richtung		Wanderung in Y-Richtung		Gesamt Distanz			
	x ₁ (px)	y ₁ (px)	x ₂ (px)	y ₂ (px)	x ₁ -x ₂ (px)	x ₁ -x ₂ (µm)	y ₁ -y ₂ (px)	y ₁ -y ₂ (µm)	Distanz (px)	Distanz (µm)	sinα	α
1	626	83	544	90	82	76	-7	-6	82,3	76,0	0	5
2	456	322	486	307	-30	-28	15	14	33,5	31,0	0	153
3	725	636	624	629	101	93	7	6	101,2	93,5	0	4
4	923	582	828	669	95	88	-87	-80	128,8	119,0	-1	42
5	1105	325	1070	269	35	32	56	52	66,0	61,0	1	58

108,2333px=100µm

2.2.8 Versuchsvariationen

2.2.8.1 Ermittlung des Einflusses des elektrischen Gleichstromfeldes auf HROG-Zelllinien

In der ersten Versuchsreihe erfolgte eine Gegenüberstellung von Glioblastomzellen unter dem Einfluss des elektrischen Feldes und Zellen ohne Stromeinfluss. Dabei wurde in etwa die Hälfte der Kammern an die Gleichstromquelle angeschlossen. Die zweite Hälfte als Kontrollgruppe wurde nicht angeklemt.

2.2.8.2 Ermittlung des Einflusses des elektrischen Gleichstromfeldes auf HROBM-Zelllinien

In einer weiteren Versuchsreihe mit Zellen, die als Metastase eines anderen Tumors entstanden, erfolgten der identische Aufbau und Ablauf mit verringerter Zellzahl (6000 Zellen) mit den Zellreihen der HROBML 01 und HROBMC 01.

2.2.8.3 Versuche mit Afatinib, Capiasertib und DMSO

Im Anschluss wurde anhand der Ergebnisse eines zeitgleich stattfindenden Versuchs [Lange 2022] die Dosis für die Versuche mit Afatinib und Capiasertib ausgewählt. Dabei wurde sich anhand der Ergebnisse (s. 3.1 Migration von Glioblastomzellen im Gleichstromfeld) aus dem in 2.2.8.1 beschriebenen Versuchs auf die Zelllinien HROG 02, HROG 15 und HROG 17 konzentriert, die alle zuvor einen anodalen Phänotyp präsentierten. Es wurden nun die Versuche mit Afatinib 5 µM und Capiasertib 10 µM in Dimethylsulfoxid (DMSO) wiederholt. Zum Vergleich lief zeitgleich eine Kontrollgruppe mit DMSO mit, um einen rein von DMSO herrührenden Effekt ausschließen zu können.

2.2.9 Statistische Auswertung und Diagramme

Die Berechnung der Statistik und Erstellung der Diagramme erfolgte mit Hilfe von Sigma Plot. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Alle p-Werte kleiner oder gleich 0.001 wurden mit drei „***“ oder „°°°“ markiert, bei einem p-Wert von 0.01 oder kleiner mit zwei „**“ oder „°°“ und bei Werten von 0.05 oder kleiner mit einem „*“ oder „°“. Ein „*“ stellte immer den Vergleich zwischen der Kontrollgruppe ohne und der Versuchsgruppe mit Strom der gleichen Art dar und ein „°“ symbolisierte den Vergleich zwischen zwei Kontrollgruppen oder zwei Versuchsgruppen unterschiedlicher Art.

3. Ergebnisse

3.1 Migration von Glioblastomzellen im Gleichstromfeld

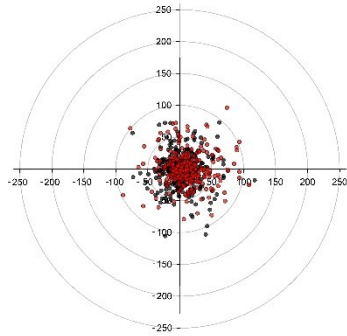
Zunächst betrachteten wir die Migration der niedrig passagierten Glioblastomzellen im Gleichstromfeld. Wie im Abschnitt 2.1.4 Zellkulturen beschrieben, wählten wir hier fünf verschiedene Zelllinien aus, die zwar eine hohe morphologische Ähnlichkeit aufwiesen, sich jedoch in ihrem Glioblastomsubtyp und der Lokalisation unterschieden. Zum Vergleich diente immer eine Gruppe ohne elektrisches Feld als Kontrollgruppe.

Anhand der Einzelzellwolken in Abbildung 6 a-e ist zu erkennen, dass unter dem elektrischen Gleichstromfeld viele Zellen in einem größeren Entfernungsradius von ihrer Ursprungsposition lagen. Der Mittelpunkt des Fadenkreuzes stellt den Ursprungsort der Zelle dar und jeder Punkt eine Zelle zum Zeitpunkt des Versuchsabschlusses, also nach sechs Stunden. Die Zellen, die unbeeinflusst ihrer Wanderung nachgingen, entsprechend ohne ein elektrisches Feld, sind schwarz gekennzeichnet, während diejenigen aus der Versuchsgruppe mit dem Gleichstromfeld rot gekennzeichnet sind. Hier unterschieden sich die Zelllinien stark in ihrer Streuung. Bei HROG 17 wanderten 34 % der Zellen weiter als 50 μm , während bei HROG 02 sich nach sechs Stunden nur 17 % weiter als 50 μm vom Ursprungsort entfernten (Abb. 6 a, d). In Abbildung 6 b bei HROG 05 stellt sich optisch die größte räumliche Streuung unter Gleichstromfeldbedingungen dar, obwohl hier insgesamt im Verhältnis nur 25 % der Zellen mehr als 50 μm zurücklegten. Es machte den Anschein, dass es sich bei dieser Verteilung im Raum um zelllinienspezifische Eigenschaften handelte, die womöglich auf die Heterogenität innerhalb der Zelllinien, beziehungsweise des Tumors, zurückzuführen sind.

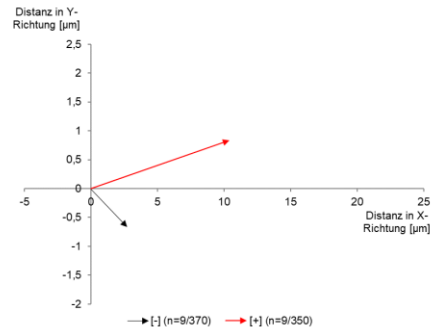
Spannend war zu beobachten, dass alle ausgewählten Glioblastom-Zelllinien einen Migrationsphänotyp aufwiesen. Sie besaßen also eine Grundmigration, auch wenn diese anscheinend ungerichtet stattfand und in deren Ausmaß sich die Zelllinien voneinander unterschieden. Im Gleichstromfeld änderte sich das Ausmaß in den meisten Fällen, wie man anhand der Summenvektoren (Abb. 6 f-j) erkennen kann. Hier implizieren positive Werte immer eine Wanderung in Richtung der Anode, während negative Werte eine Wanderung der Zellen zur Kathode darstellen. Ausgenommen von HROG 05 ließ sich im Gleichstromfeld eine anodale Tendenz feststellen, dahingegen war für die Zellen ohne elektrischen Strom keine eindeutige Aussage zu treffen (Abb. 6 f-j).

Wie zuvor schon an den Einzelzellwolken zu erahnen war, lässt sich auch anhand der Summenvektoren erkennen, dass in den meisten Fällen die durchschnittlich zurückgelegte Distanz in den sechs Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne elektrisches Gleichstromfeld stieg, dort war die Strecke im Mittel um 170 % der Ausgangsdistanz vergrößert. Auch hier wurde unabhängig von den vielen Gemeinsamkeiten zwischen den Zellen ersichtlich, dass sich die Zelllinien voneinander unterschieden, es sich also um ein zelllinienspezifisches Verhalten im elektrischen Gleichstromfeld handelte. Zurückführen lässt sich dies womöglich auf einen gemeinsamen Ursprungsmechanismus, der jedoch unterschiedlich stark in den Zelllinien ausgeprägt oder unterschiedlich häufig vertreten sein könnte.

HROG 02

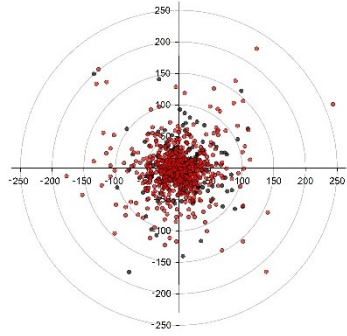


a

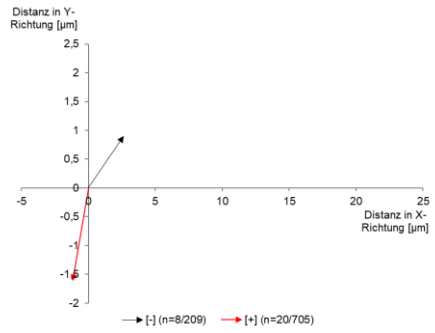


f

HROG 05

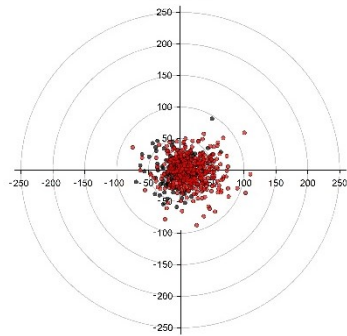


b

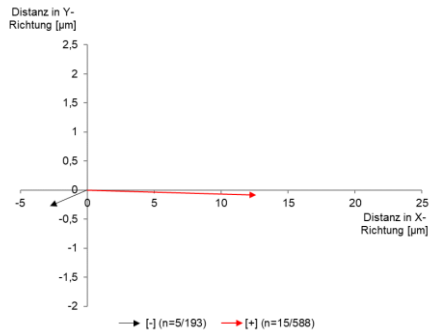


g

HROG 15

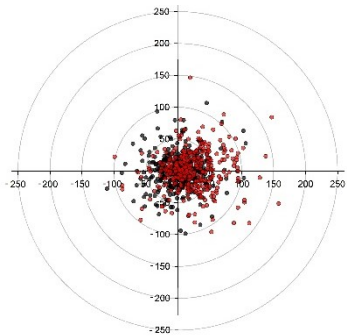


c

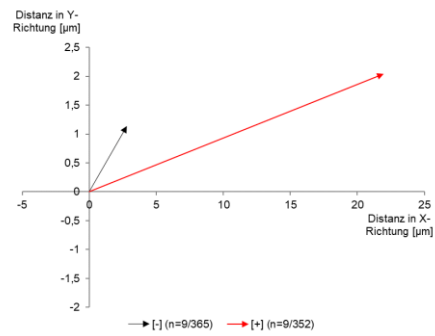


h

HROG 17

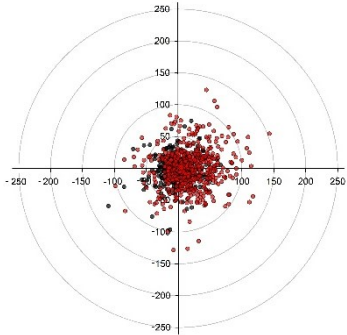


d

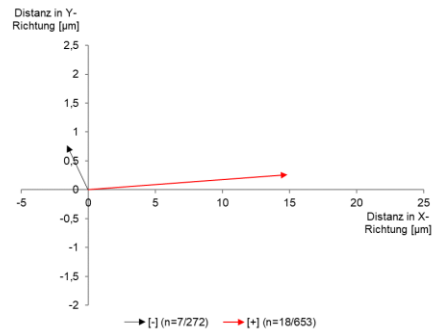


i

HROG 24



e



j

Abb. 6: Migration von Glioblastomzellen (HROG 02, HROG 05, HROG 15, HROG 17, HROG 24) nach 6 h im elektrischen Gleichstromfeld (rot) und der Kontrollgruppe (schwarz) als Einzelzellen (a-e) und als Summenvektor (f-j) im Verhältnis zur Position zu Beginn (t_1). (Positive X-Werte implizieren eine Wanderung zur Anode.)

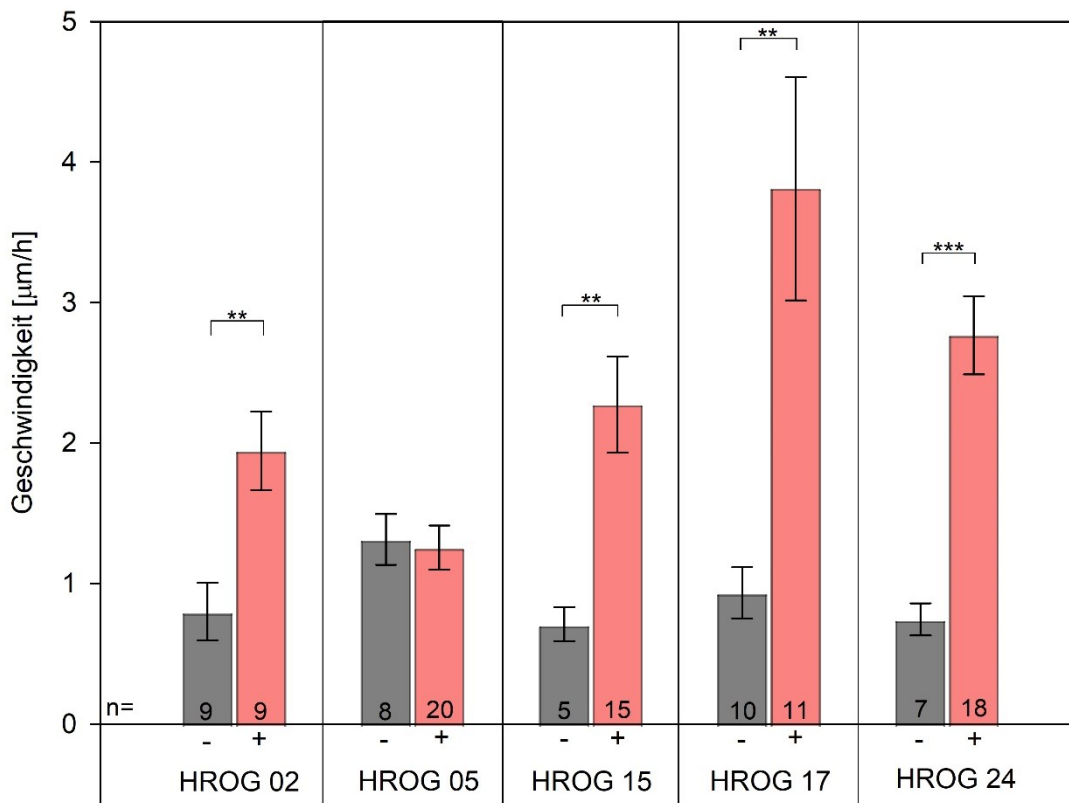
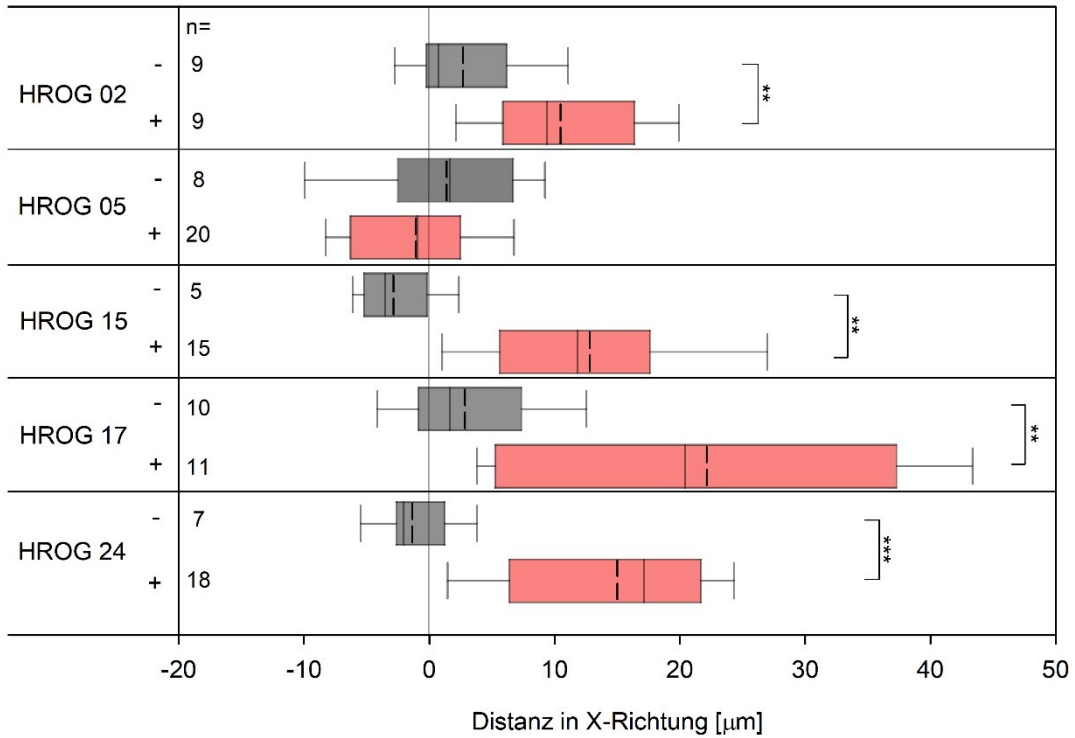


Abb. 7: Geschwindigkeit der Glioblastom-Zelllinien (HROG 02, HROG 05, HROG 15, HROG 17, HROG 24) mit (rot) und ohne (schwarz) Gleichstromfeld, dargestellt als Mittelwert \pm SD. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney U-Test).

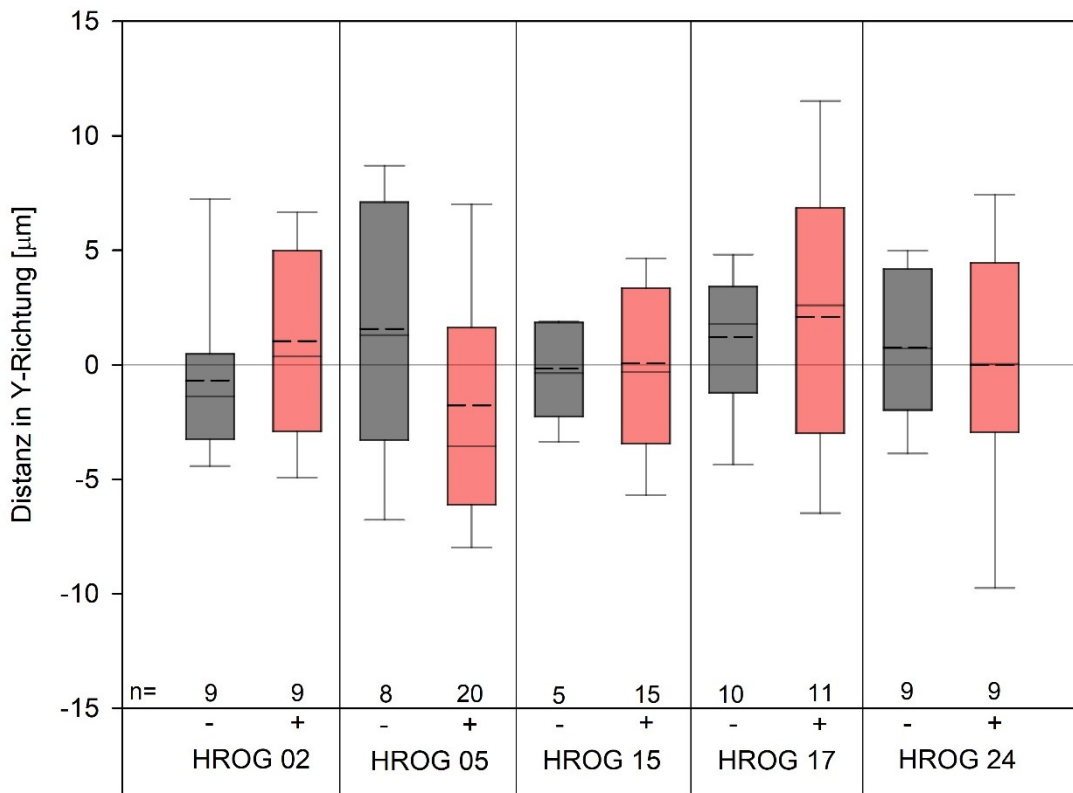
Um den Ursachen für diese Unterschiede weiter auf den Grund zu gehen, betrachteten wir im nächsten Schritt die durchschnittlichen Geschwindigkeiten der Zelllinien unter den Versuchsbedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In den Zelllinien HROG 02, HROG 15, HROG 17 und HROG 24 erhöhte sich die Geschwindigkeit im Gleichstromfeld signifikant, im Durchschnitt um fast das Vierfache des Kontrollwertes, auch hier wieder in schwarz dargestellt (Abb. 7). HROG 05 wies zwar die höchste Grundgeschwindigkeit in der Kontrollgruppe auf, diese sank jedoch um 4 % im elektrischen Gleichstromfeld. Hierbei handelte es sich, trotz der großen Versuchsgruppe, um keinen signifikanten Unterschied und sie stand so im starken Kontrast zu allen anderen Glioblastomzellen unseres Versuchs. Eine mögliche Begründung könnte in ihrer Amplifikation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) liegen. Den geringsten verstärkenden Effekt zeigte das elektrische Feld auf HROG 02, hier stieg die Geschwindigkeit von 0.8 $\mu\text{m/h}$ auf 1.9 $\mu\text{m/h}$, wohingegen HROG 15 mit der niedrigsten Grundgeschwindigkeit einen signifikanten Anstieg um einen Anteil von 220 % aufwies. Der größte Effekt des elektrischen Gleichstromfeldes stellte sich bei HROG 17 dar, hier steigerte sich die Geschwindigkeit von 0.9 $\mu\text{m/h}$ auf 3.8 $\mu\text{m/h}$ (Abb. 7).

Es ist also ersichtlich, dass eine hohe Grundgeschwindigkeit nicht gleichbedeutend mit einer hohen Geschwindigkeitssteigerung unter Gleichstromfeldbedingungen war. Dennoch ließ sich eindeutig ein geschwindigkeitssteigernder Effekt in den meisten der hier getesteten Zelllinien nachweisen. Das Ausmaß und auch das Vorhandensein dieses Effektes könnte von zelllinienspezifischen Eigenschaften gesteuert oder zumindest beeinflusst werden.



a



b

Abb. 8: Effekt des Gleichstromfeldes (rot) auf die Polarorientierung der Migration von Glioblastom-Zelllinien (HROG 02, HROG 05, HROG 15, HROG 17, HROG 24) im Vergleich zur unbeeinflussten Kontrollgruppe (schwarz) (a). (Positive X-Werte implizieren eine Wanderung zur Anode.) Im Gegensatz dazu die ungerichtete Wanderung in Y-Richtung (b). ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$ (Mann-Whitney U-Test). Weiterhin dargestellt sind der Median (graue Linie), Mittelwert (gestrichelte Linie) und die Nulllinie (grau) als Ursprungsstartpunkt der Zellen sowie das 10 % und 90 % Quantil.

Um nun unsere Vermutung aus den Summenvektoren, die Zellen könnten sich im Gleichstromfeld bevorzugt in Richtung der Anode bewegt haben (Abb. 6 f-j), zu bestätigen oder zu revidieren, trennten wir die zuvor bestimmte Gesamtdistanz in ihre X- und Y-Anteile auf. Abbildung 8 a zeigt die durchschnittliche Wanderung der Zelllinien in X-Richtung, diese würde für eine Ausrichtung der Migration zur anodalen oder kathodalen Seite des Feldes sprechen. Abbildung 8 b stellt analog die Migration in Y-Richtung, die das Ausmaß der unabhängigen Migration zeigen würde, dar. Dadurch war nun festzustellen, ob es eine bevorzugte Migrationsrichtung gab und anschließend auszuschließen, dass es sich hierbei um einen ausschließlich ungerichteten Effekt handelte, der unabhängig von der Feldrichtung vorlag. In der Kontrollgruppe war deutlich zu erkennen, dass die Wanderung in X-Richtung bei allen Zelllinien nahe der Nulllinie lag, während bei Betrachtung der Zellen im Gleichstromfeld auffiel, dass es sich vorzugsweise um eine anodale Wanderung handelte (Abb. 8 a). Lediglich HROG 05 wies keine bevorzugte Wanderungsrichtung auf und ließ nur eine leichte, nicht signifikante kathodale Tendenz vermuten. Die Werte lagen hier jedoch trotz hoher Versuchszahl sehr nahe um die Nulllinie. Es war also nicht möglich, bei dieser Zelllinie die zurückgelegte Gesamtdistanz im elektrischen Feld zweifelsfrei auf eine Richtungsorientierung zurückzuführen, womit sich auch in diesem Aspekt die HROG 05 von den anderen hier betrachteten Zelllinien unterschied.

Bei HROG 02 stieg die anodale Distanz von 2.7 μm auf 10.5 μm . Hierbei handelte es sich um einen im Vergleich zu den im Gleichstromfeld richtungsorientiert wandernden HROG-Zelllinien verhältnismäßig niedrigen Anstieg. Die größte Steigerung um 996 % zum Ausgangswert war bei HROG 24 zu erkennen. Bei HROG 15 sah man beinahe eine Umkehrung der Wanderung der Kontrollgruppe, die ohne das elektrische Feld eher in die Richtung ging, in der ansonsten die Kathode angeschlossen gewesen wäre, während im Gleichstromfeld eine signifikante anodale Wanderung vorlag. Die Strecke vergrößerte sich also nicht nur, sondern es erfolgte eine Richtungsumkehr von 2.8 μm in die „kathodale Richtung“ auf 12.8 μm in die anodale Richtung. Die größte Wanderungsdifferenz legte HROG 17 zurück, die Differenz lag hier bei 19.3 μm bei einem Steigerungsfaktor um das durchschnittlich 6.81-fache. Im Gleichstromfeld zeigten hier 76.7 % der Zellen eine anodale Wanderungstendenz auf, an dieser Stelle handelte es sich um den höchsten Zellanteil unter Gleichstrombedingungen, wenn man die Zelllinien miteinander verglich (Abb. 8 a).

Die Distanz in Y-Richtung zeigte, die möglicherweise vorhandene erratische Migration unabhängig vom elektrischen Feld, deren Stärke sich zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe mit elektrischem Feld in keiner der Zelllinien signifikant unterschied. Die Zellen zeigten eine regelmäßige Streuung, bei ihrer Migration in Y-Richtung, um die Ursprungsposition (Abb. 8 b). Im Umkehrschluss deutet dies darauf hin, dass es sich bei der Wanderung in X-Richtung im elektrischen Gleichstromfeld nicht um eine zufällige Verteilung der Geschwindigkeitssteigerung (Abb. 7) handelte, sondern die Glioblastomzellen gerichtet den elektrischen Feldlinien folgten und in Richtung der Anode nun eine erhöhte Distanz zurücklegten (Abb. 8 a). Dabei könnte es sich möglicherweise um ein Phänomen handeln, dass alle im Gehirn befindlichen Tumore umfasst, sodass also unabhängig vom Glioblastom eine Elektrotaxis auch in Metastasen anderer Tumore in dem zentralen Nervensystem vorkommen könnte.

3.2 Verhalten von Metastasezellen im Gleichstromfeld

Im Folgenden ließ sich, wie im Material- und Methodenteil, unter 2.2.8.2 Ermittlung des Einflusses des elektrischen Gleichstromfeldes auf HROBM-Zelllinien, bereits beschrieben, das Wanderungsverhalten im elektrischen Gleichstromfeld von Fernmetastasen im Gehirn aus einem Colonkarzinom (HROBMC 01) und aus einem Lungenkarzinom (HROBML 01) beobachten. Zum Vergleich diente auch hier immer eine Kontrolle ohne Gleichstromfeld.

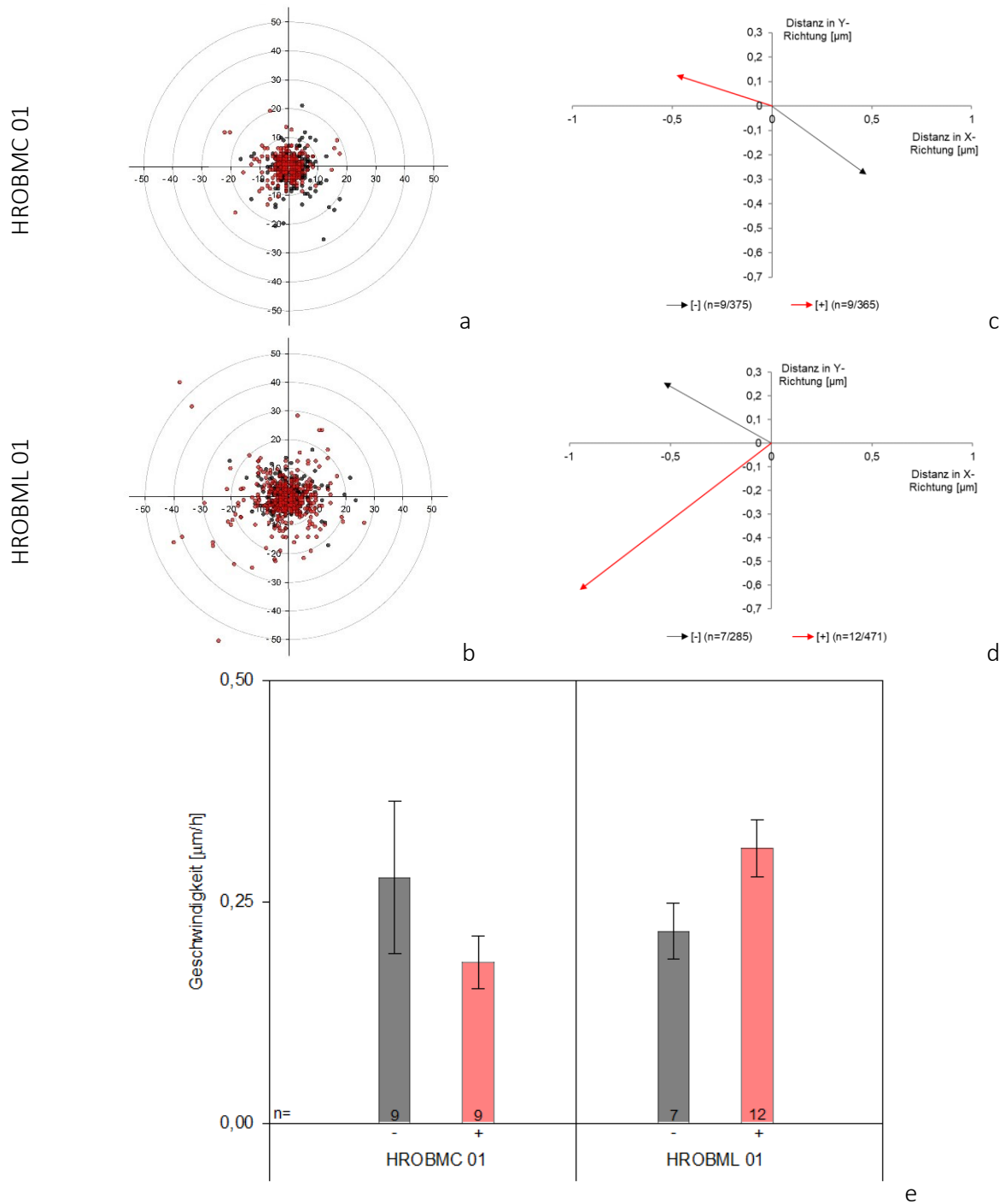


Abb. 9: Migration von Metastasezellen im Gehirn aus einem Colonkarzinom (HROBMC 01) und einem Lungenkarzinom (HROBML 01) nach 6 h im elektrischen Gleichstromfeld (rot) und der Kontrollgruppe (schwarz) als Einzelzellen (a, b) und als Summenvektor (c, d) im Verhältnis zur Position zu Beginn (t_1). (Positive X-Werte implizieren die Wanderung zur Anode.) Die Geschwindigkeit der beiden Metastase-Zelllinien (HROBMC 01, HROBML 01) mit Gleichstromfeld (rot) und als Kontrollgruppe (schwarz), dargestellt als Mittelwert \pm SD (e). Man beachte die veränderten Maßstäbe in allen Grafiken.

Bei einem ersten Blick auf die Zellwolken (Abb. 9 a, b), welche die Position nach sechs Stunden im Verhältnis zur Ursprungsposition darstellen, ließ sich eine geringe Grundmigration erkennen, sowohl mit als auch ohne Gleichstromfeld. Bei HROBMC 01 verließen nur 6 % der Zellen einen Radius von 10 μm um ihre Ursprungsposition im Gleichstromfeld (Abb. 9 a), bei HROBML 01 waren es 21.66 % (Abb. 9 b), worin sich eine unterschiedlich ausgeprägte Heterogenität zwischen den Zelllinien vermuten lassen könnte. Insgesamt fiel an dieser Stelle auf, dass beide untersuchten Zelllinien einen Migrationsphänotyp aufwiesen, sowohl mit als auch ohne Gleichstromfeld. Sie legten jedoch nur eine geringe Distanz zurück (Abb. 9 c, d). Der allgemein geringen Grundmigrationsgeschwindigkeit der Metastasen folgte keine signifikante Veränderung der Geschwindigkeit im Gleichstromfeld (Abb. 9 e). Bei HROBMC 01 sank sie leicht von 0.28 $\mu\text{m}/\text{h}$ auf 0.18 $\mu\text{m}/\text{h}$ und bei HROBML 01 stieg sie geringfügig um 0.09 $\mu\text{m}/\text{h}$. Diese Werte zeigten also lediglich eine leichte Tendenz an. Die Überprüfung der Distanz in X-Richtung, um eine bevorzugte Migrationsrichtung im elektrischen Gleichstromfeld festzustellen, ließ bei HROBMC 01 eine kathodale Wanderung erkennen. Es entstand eine Richtungsänderung bei annähernder Halbierung der Distanz in X-Richtung von durchschnittlich 0.97 μm auf -0.47 μm , die Werte lagen alle in der Nähe der Ursprungsposition. HROBML 01 zeigte hier keine signifikante Richtungsänderung, es deutete sich jedoch eine Bevorzugung der kathodalen Richtungstendenz an (Abb. 10 a). Bei der Überprüfung der Wanderung in Y-Richtung war, wie auch bereits bei den Glioblastom-Zelllinien zu erkennen, dass es keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe gab. Die Werte lagen hier nahe der Ursprungsposition (Abb. 10 b).

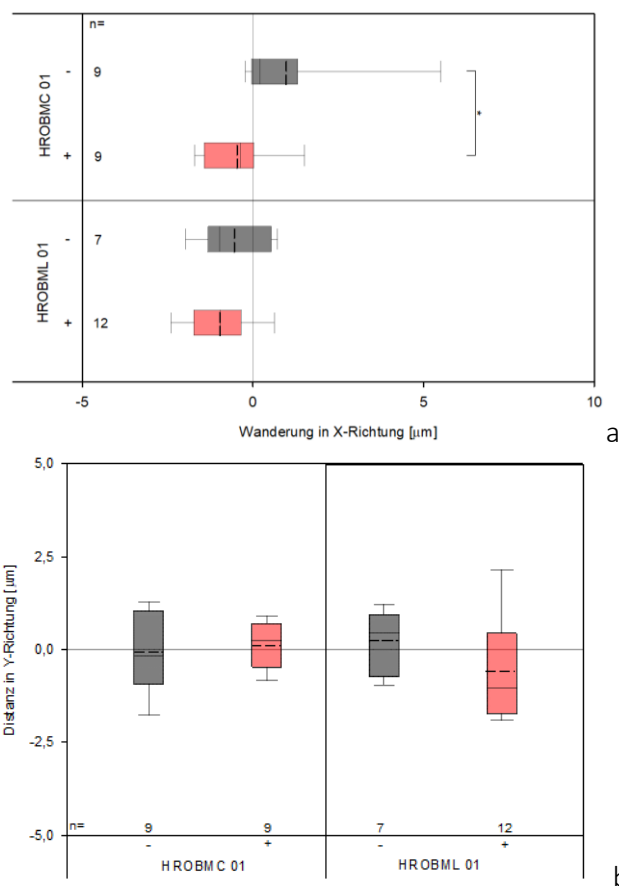


Abb. 10: Effekt des Gleichstromfeldes (rot) auf die Polorientierung der Migration der Metastasezellen (HROBMC 01 und HROBML 01) im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarz) (a). (Positive X-Werte implizieren eine Wanderung zur Anode.) Im Gegensatz dazu gezeigt, die ungerichtete Wanderung in Y-Richtung (b). * $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney U-Test). Weiterhin sind der Median (graue Linie), Mittelwert (gestrichelte Linie), die Nulllinie (grau) als Ursprungsstartpunkt der Zellen sowie das 10 % und 90 % Quantil dargestellt. Man beachte die Veränderung der Maßstäbe in allen Grafiken.

3.3 Vergleich von Glioblastomzellen mit Metastasezellen

Anhand unserer zuvor erzielten Ergebnisse war es nun möglich, die Glioblastomzellen mit den Zelllinien sekundärer Hirntumore zu vergleichen. Die aus den Mittelwerten erstellten Vergleiche zeigten, dass die durchschnittliche Glioblastom-Zelllinie einen deutlich stärker ausgeprägten Grundmigrationsphänotyp als die durchschnittliche Metastase-Zelllinie aufwies (Abb. 11 a, b). Im Gleichstromfeld stieg die Geschwindigkeit der mittelwertigen Glioblastom-Zelllinie signifikant von 0.9 $\mu\text{m}/\text{h}$ auf 2.41 $\mu\text{m}/\text{h}$ um das 2.68-fache, während bei den Metastasezellen lediglich ein Unterschied von 0.37 % im Vergleich zur Kontrolle ohne Gleichstromfeld festzustellen war. Die Glioblastomzellen unterschieden sich jedoch nicht nur signifikant von ihrer Kontrollgruppe, sondern ebenfalls signifikant von der Vergleichsgruppe der Metastasen (Abb. 11 c).

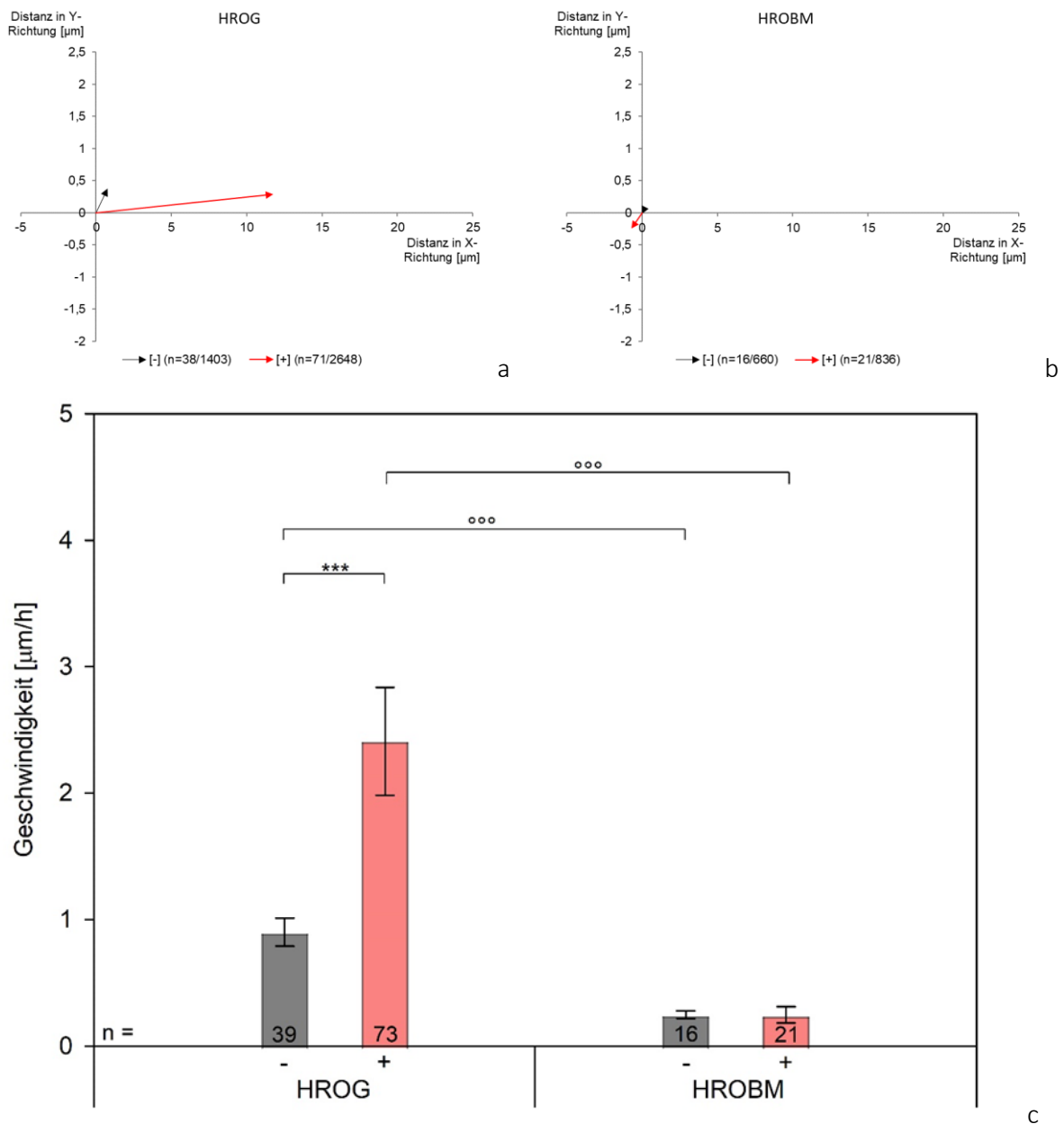
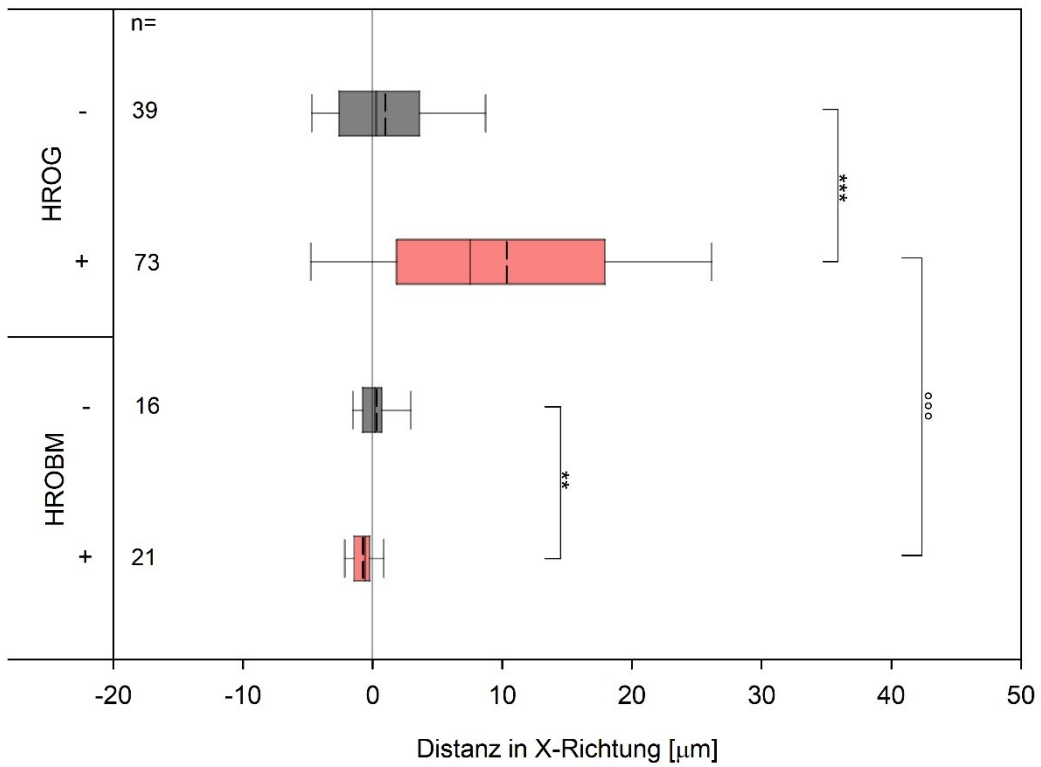


Abb. 11: Durchschnittliche Migration von Glioblastomzellen (a) und Metastasezellen (b) als Summenvektoren und Geschwindigkeit (c), dargestellt als Mittelwert \pm SD nach 6 h im elektrischen Gleichstromfeld (rot) und der Kontrollgruppe (schwarz) im Verhältnis zur Position zu Beginn (t_1). (Positive X-Werte implizieren die Wanderung zur Anode.) Im Vergleich zur Kontrollgruppe *** $p \leq 0.001$ und zwischen Glioblastom und Metastase ooo $p \leq 0.001$ (Mann-Whitney U-Test).

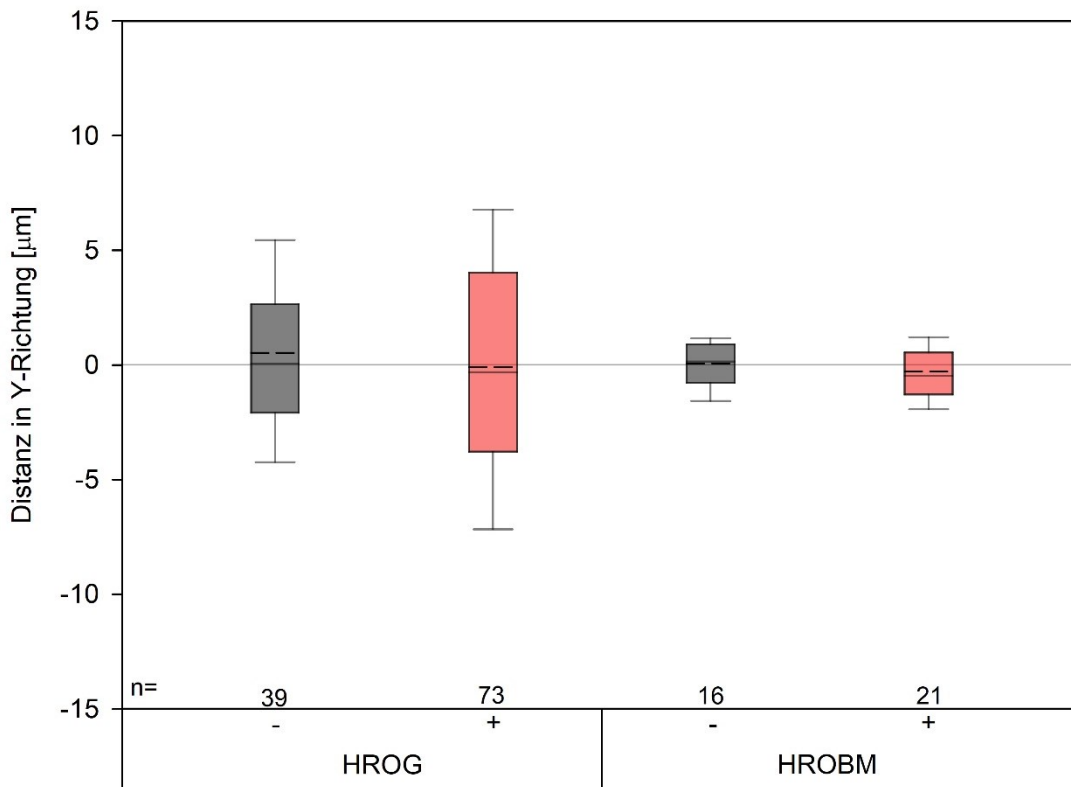
Bei einer Gegenüberstellung der Durchschnittswerte der beiden Tumorentitäten waren so eindeutige Unterschiede im Wanderungsverhalten erkennbar (Abb. 11 c). Es zeigte sich eine insgesamt signifikant höhere Geschwindigkeit von Glioblastomzellen im Vergleich zu den Metastasezellen, sowohl in den Kontrollen als auch in den entsprechenden Gleichstromfeldgruppen, hier war in der Kontrolle eine Glioblastomzelle etwa 3.64-mal so schnell wie eine Metastasezelle und im Gleichstromfeld stieg dieser Faktor sogar auf das 9.79-fache an (Abb. 11 c).

Eine erneute Aufspaltung der durchschnittlichen Distanzen in ihren X- und Y-Anteil, um eine Wanderungsrichtungstendenz festlegen zu können, zeigte in den Glioblastomzellen durchschnittlich eine signifikante anodale Wanderung im Verhältnis zur Kontrolle. Bei der durchschnittlichen Metastase erfolgte hingegen eine signifikante, wenn auch nur geringe, kathodale Wanderung im Gleichstromfeld, durchschnittlich von $-0.71 \mu\text{m}$ im Vergleich zu $0.21 \mu\text{m}$ in der Kontrolle (Abb. 12 a). Dieser Unterschied zwischen der Kontrolle und der Gleichstromstimulation war in der Geschwindigkeit noch nicht zu erkennen (Abb. 11 c). Nicht nur im Hinblick auf die Richtung, sondern auch auf die Veränderung der Distanz unterschied sich das Glioblastom von den Metastasen. Es erfolgte eine Distanzsteigerung in X-Richtung zwischen der Kontrolle und der Bewegung im Gleichstromfeld von $2.23 \mu\text{m}$ auf $12.8 \mu\text{m}$ um durchschnittlich 452.23% beim Glioblastom. Währenddessen sank bei den Metastasen der Wert von $1.52 \mu\text{m}$ auf $1.43 \mu\text{m}$ um durchschnittlich -5.6% im Verhältnis zum Ausgangswert.

Im Gegensatz zu der Geschwindigkeit, die, wie in Abbildung 11 c zu erkennen, zwischen den Zellarten in den Kontrollgruppen noch signifikant zu unterscheiden waren, blieb dies in X-Richtung nicht erhalten (Abb. 12 a). Die beiden Kontrollen, von jeweils Glioblastom und Metastasen ohne Gleichstromfeld, bewegten sich beide nahe der Ursprungsposition und es lag kein signifikanter Unterschied zwischen ihnen vor. Dies könnte ebenfalls für eine ungerichtete Migration ohne elektrisches Feld sprechen. Im Gleichstromfeld blieb der signifikante Unterschied bei den Durchschnittswerten von Glioblastomen und Metastasen erhalten, was darauf hinweisen könnte, dass nicht alle Tumore des zentralen Nervensystems die gleichen galvanotaktischen Migrationseigenschaften aufweisen. Wie bereits auch die Gesamtdistanz vergrößert war, so legten Glioblastome in X-Richtung das 8.58-fache der Strecke der Metastasen zurück. Im Gegensatz dazu zeigte auch hier die Wanderung in Y-Richtung keine signifikanten Unterschiede, sondern lediglich eine gleichmäßige Streuung um die Ursprungsposition herum (Abb. 12 b).



a



b

Abb. 12: Vergleich des durchschnittlichen Effekts des Gleichstromfeldes (rot) auf die Polarorientierung der Migration der Glioblastom-Zelllinien und Metastase-Zelllinien auch im Verhältnis zur jeweiligen Kontrollgruppe (schwarz) (a). (Positive X-Werte implizieren eine Wanderung zur Anode.) Im Gegensatz dazu steht die ungerichtete Wanderung in Y-Richtung (b). Im Vergleich zur Kontrollgruppe $**p \leq 0.01$ $***p \leq 0.001$ und im Vergleich von Glioblastom und Metastase $^{\circ\circ\circ} p \leq 0.001$ (Mann-Whitney U-Test). Weiterhin sind der Median (graue Linie), Mittelwert (gestrichelte Linie), die Nulllinie (grau) als Ursprungstartpunkt der Zellen sowie das 10 % und 90 % Quantil dargestellt.

3.4 Einfluss der pharmakologischen Beeinflussung des EGF-Rezeptors und des PI3K/AKT-Signalwegs auf die galvanotaktische Migration

Abschließend hatten wir uns zum Ziel gesetzt, ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Galvanotaxis bei Glioblastomen zu erlangen. Dafür konzentrierten wir uns auf drei der Zelllinien, diese präsentierten auf der einen Seite in unseren vorangegangenen Experimenten alle einen Phänotyp mit anodaler Migration im elektrischen Gleichstromfeld (s. 3.1 Migration von Glioblastomzellen im Gleichstromfeld). Auf der anderen Seite unterschieden sie sich auf molekularer Ebene in ihrem Phosphatase und Tensin homologon (PTEN)-Genstatus. HROG 02 wies keine PTEN-Alteration auf, während die anderen beiden ausgewählten Glioblastom-Zelllinien Alterationen in Hotspotregionen des PTEN-Gens aufwiesen. HROG 15 zeigte eine Alteration auf PTEN S 170 und HROG 17 an PTEN R 130 [Mullins 2013a], diese führten beide zu einer beeinträchtigten Phosphataseaktivität [Han 2000]. Bei der Auswahl der Inhibitoren wurde sich auf mögliche Schlüsselpunkte fokussiert. Der Einfluss einer Inhibition der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und der Proteinkinase B (AKT) auf die Galvanotaxis wurde bereits in vorhergehenden Studien gezeigt [Li 2013; Zhao 2006], darum entschieden wir uns für Capivasertib, einen ATP-kompetitiven AKT-Inhibitor (Abb. 2). Der Einfluss des Rezeptors, der den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*) bindet, erscheint bisher noch unklar. Um seine Relevanz für die Migration und Richtungsbestimmung zu überprüfen, testeten wir den Einfluss von Afatinib, einem EGF-Rezeptor Antagonist, auf die drei ausgewählten Glioblastom-Zelllinien (Abb. 2).

Wir betrachteten immer die Zelllinie mit und ohne Gleichstromfeld unter dem jeweiligen Einfluss von Afatinib oder Capivasertib. Als Kontrolle wurde hier eine Gruppe der jeweiligen Zelllinie nur unter Einfluss von Dimethylsulfoxid (DMSO) genutzt, die ebenfalls jeweils mit und ohne Gleichstromfeld getestet wurde, diese diente als Anlehnung an die vorherigen Versuche.

In Abbildung 13 sind die Summenvektoren aus den Start- und Endpunkten der Versuche mit HROG 02, HROG 15 und HROG 17, wie in 2.2.8.3 Versuche mit Afatinib, Capivasertib und DMSO beschrieben, zu erkennen. In schwarz gekennzeichnet ist immer die Kontrollgruppe mit der gleichen Substanz ohne elektrisches Gleichstromfeld, in rot jeweils der Versuch mit dem Feld. Die gestrichelten Linien symbolisieren den jeweiligen Kontrollversuch mit Dimethylsulfoxid, die gestrichelte schwarze Linie stellt hier ebenfalls den Versuch ohne elektrisches Gleichstromfeld dar, während die gestrichelte rote Linie die Ergebnisse des Versuchs mit Gleichstromfeld und Dimethylsulfoxid markieren.

Im Vergleich zu den Werten der jeweiligen Versuche ohne Dimethylsulfoxid ließ sich kein signifikanter Unterschied erkennen, weshalb er hier als Kontrollversuch dienen konnte, da Afatinib und Capivasertib darin gelöst waren und ein allein durch Dimethylsulfoxid hervorgerufener Effekt so auszuschließen war. Anhand der Summenvektoren fiel sofort auf, dass unabhängig von Dimethylsulfoxid alle drei Zelllinien weiterhin einen Migrationsphänotyp mit und ohne Gleichstromfeld auch unter dem Einfluss von Afatinib und Capivasertib aufwiesen. Dieser machte jedoch den Anschein sich unter dem Einfluss der Inhibitoren unterschiedlich stark zelllinienspezifisch von der Kontrollmigration mit DMSO zu verändern (Abb. 13). Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen war eine erhöhte Migrationsdistanz im Vergleich zwischen der entsprechenden Kontrolle und der Einwirkung des Feldes zu erkennen.

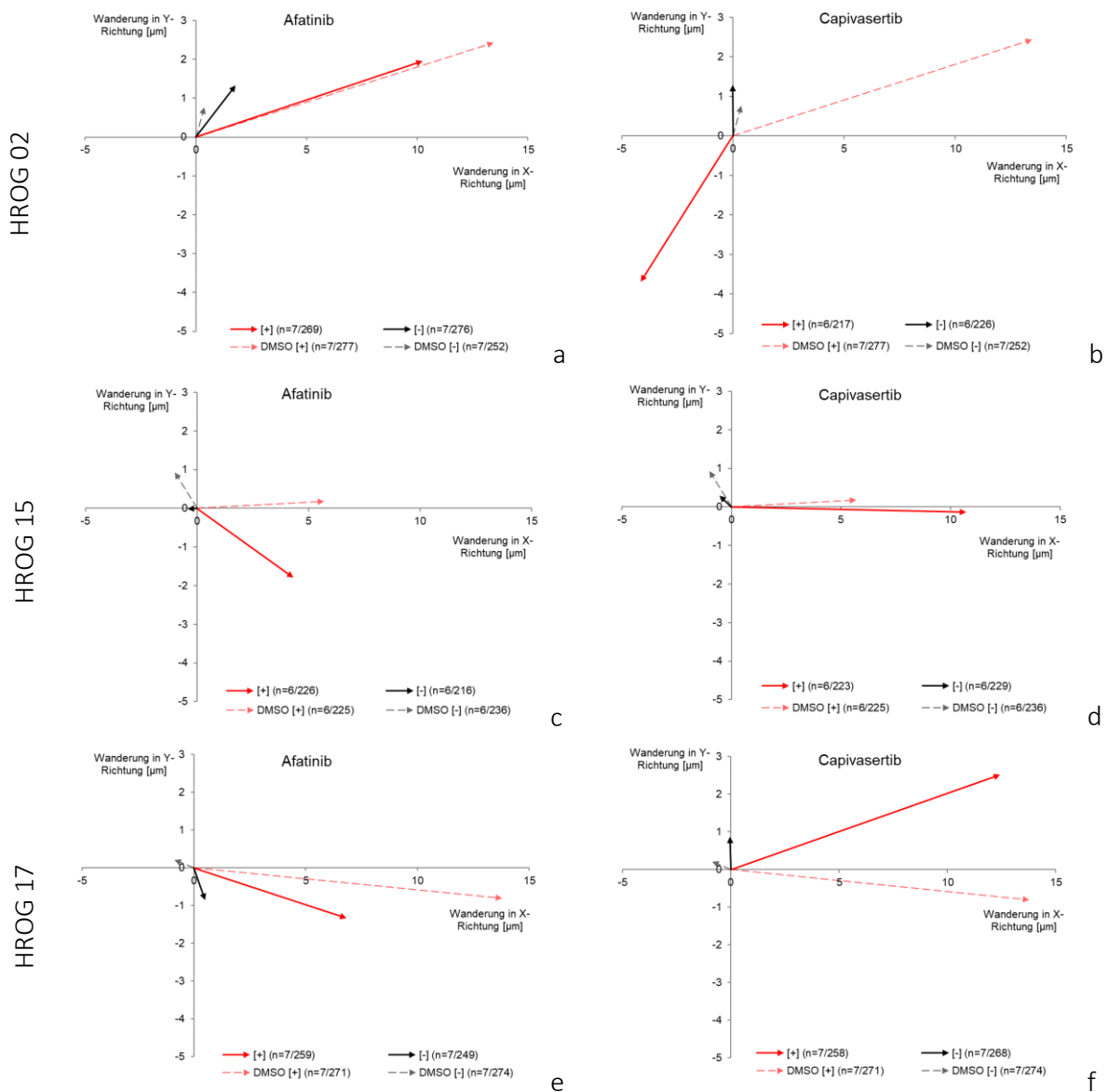


Abb. 13: Migration von Glioblastom-Zelllinien (HROG 02, HROG 15, HROG 17) nach 6 h im elektrischen Gleichstromfeld (rot) und der Kontrollgruppe, ohne elektrisches Feld (schwarz) unter Behandlung mit DMSO als Kontrollgruppe (gestrichelte Linien) und unter Afatinib (a, c, e) und Capiwasertib (b, d, f) im Verhältnis zur Position zu Beginn (t_1) als Summenvektor. (Positive X-Werte implizieren eine Wanderung zur Anode.)

Bei HROG 02 vergrößerte sich die Distanz in Dimethylsulfoxid signifikant von $3.56 \mu\text{m}$ auf $13.88 \mu\text{m}$. Diese signifikante Veränderung blieb unter Afatinib-Beeinflussung mit einem kleineren Faktor erhalten. Die Werte vergrößerten sich hier um $6.78 \mu\text{m}$, also dem 1.38-fachen des Wertes ohne Gleichstromfeld, während die Vergrößerung in den DMSO-Proben dem 2.9-fachen der durchschnittlichen Distanz in den entsprechenden Proben ohne Feld entsprach. In Capiwasertib bestand hier kein signifikanter Unterschied zwischen der Gleichstromstimulation und seiner Kontrolle, aber ebenso kein Unterschied zu den entsprechenden DMSO-Kontrollen. Während unter DMSO-Einfluss die Geschwindigkeit noch um $1.72 \mu\text{m/h}$ stieg, tat sie das unter Capiwasertib um lediglich $0.39 \mu\text{m/h}$ (Abb. 14 a). Im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien war hier der Effekt des elektrischen Feldes am wenigsten ausgeprägt.

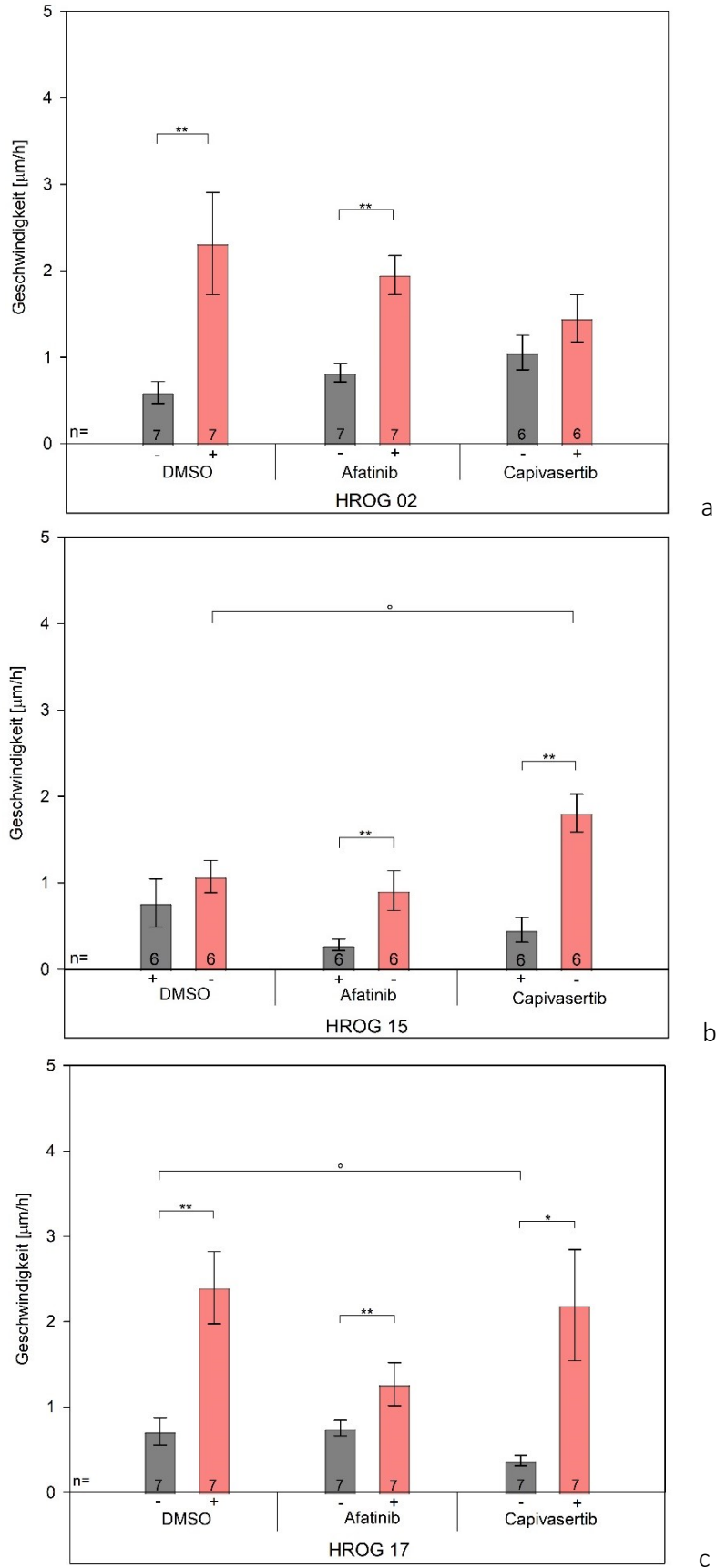


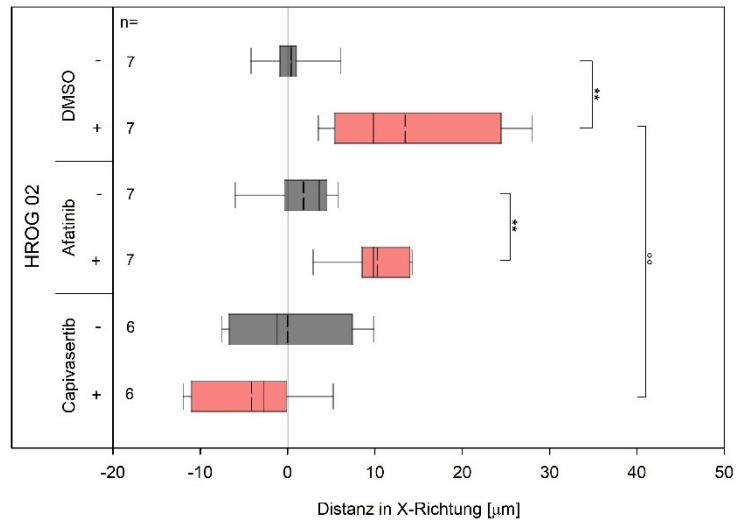
Abb. 14: Effekt von Afatinib und Capivasertib auf die galvanotaktische Migrationsgeschwindigkeit mit (rot) und ohne (schwarz) elektrisches Gleichstromfeld von HROG 02 (a), HROG 15 (b) und HROG 17 (c). Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Gleichstromfeld * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ und im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DMSO $^{\circ}p \leq 0.05$ (Mann-Whitney U-Test).

HROG 15 wies sowohl einen signifikanten Unterschied in den Geschwindigkeiten der Zellen unter Einfluss von Afatinib als auch von Capivasertib im elektrischen Feld zu den entsprechenden Kontrollen ohne ein Gleichstromfeld auf. Hier war die zurückgelegte Distanz der Zellen unter Capivasertib 395.4 % und die der unter Afatinib-Einfluss stehenden Zellen 324.1 % größer als die jener Zellen aus den Kontrollgruppen ohne elektrisches Feld. Die durchschnittliche Zelle in den Capivasertib-Zellkästen mit einem Gleichstromfeld zeigte einen signifikanten Unterschied zu ihrer DMSO-Kontrolle. Die Geschwindigkeit stieg hier bei der Gruppe unter Capivasertib-Einfluss um 1.35 $\mu\text{m}/\text{h}$ an. Ohne die Stimulation war sie von ihrer DMSO-Kontrolle nicht signifikant zu unterscheiden. Während in den anderen beiden Zelllinien die Distanz unter dem Einfluss des AKT-Inhibitors im Vergleich zur DMSO-Kontrolle sank, stieg sie bei HROG 15 um 4.4 μm (Abb. 14 b).

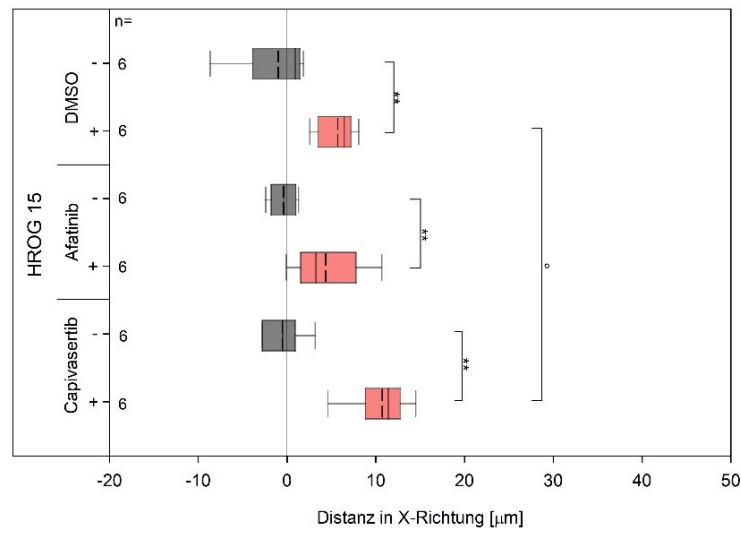
Betrachtete man nun HROG 17, halbierte Afatinib beinahe die Geschwindigkeit im elektrischen Feld, während sie sich bei einem Vergleich der beiden entsprechenden Kontrollen nur geringfügig unterschieden. Die Distanz lag bei Dimethylsulfoxid noch bei 14.39 μm und betrug unter Afatinib-Einfluss lediglich 7.6 μm , sie stieg hier auf 168.36 % des Ausgangswertes ohne die Stimulation. Alle drei Gruppen wiesen weiterhin einen signifikanten Unterschied zwischen dem elektrischem Gleichstromfeld und der Kontrolle ohne Feldeinfluss auf. Obwohl ein signifikanter Unterschied in der Geschwindigkeit zwischen den Kontrollen von Dimethylsulfoxid und Capivasertib mit Dimethylsulfoxid bestand, blieb dieser unter Gleichstromfeldbedingungen nicht erhalten. Die Vergrößerung der Distanz lag bei Capivasertib bei einem 4.89-fachen Faktor des Ausgangswertes. Im Vergleich dazu entsprach der Anstieg in der DMSO-Probe dem 2.35-fachen des Ausgangswertes in der entsprechenden Vergleichsgruppe, dies entsprach somit weniger als der Hälfte. Entgegengesetzt verhielt es sich bei dem Vergleich der Kontrolldistanz von Dimethylsulfoxid, diese lag bei 4.3 μm und die unter Capivasertib bei 2.23 μm (Abb. 14 c).

Afatinib verringerte die Migrationsdistanz in allen Zelllinien im Gleichstromfeld im Vergleich zur Kontrolle mit Dimethylsulfoxid um durchschnittlich 26.2 %, der Effekt war jedoch in keiner der Zelllinien signifikant. Der Anstieg unter Afatinib im Vergleich zu seiner Kontrolle ohne Stimulation blieb signifikant. Bei Capivasertib zeigte sich, in einer der Zelllinien (HROG 15) ein signifikanter Unterschied im Gleichstromfeld und in einer anderen (HROG17) bei dem Vergleich ihrer Kontrolle im Verhältnis zur den entsprechenden DMSO-Gruppen (Abb. 14 b, c), während sich die Zelllinie HROG 02 nicht mehr von ihrer Kontrolle unterschied (Abb. 14 a). Ein solcher signifikanter Geschwindigkeitsunterschied könnte die Wichtigkeit des PI3K/AKT-Signalweges unterstreichen, ebenso wie die Divergenz zwischen den Zelllinien.

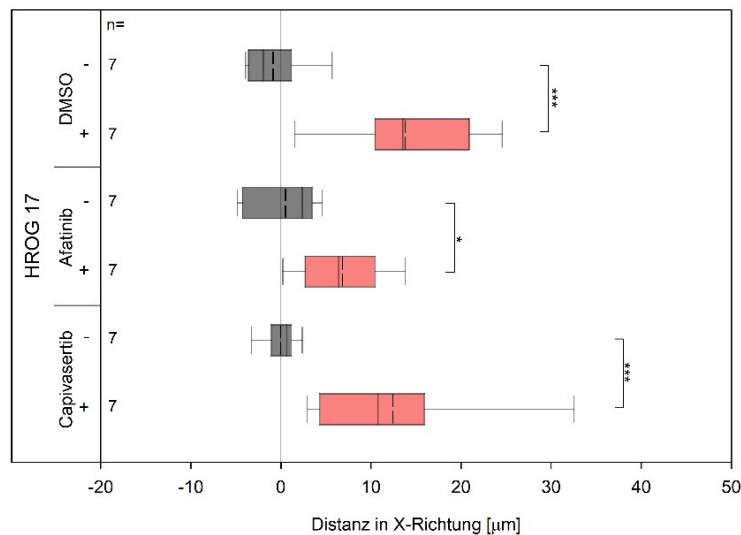
Auch an dieser Stelle betrachteten wir die X- und Y-Anteile, um eine Richtungstendenz festmachen zu können. Die Y-Werte wiesen wie bereits zuvor schon keine Signifikanzen auf und lagen nahe der Ursprungsposition.



a



b



c

Abb. 15: Effekt von Afatinib und Capivasertib auf die Polarorientierung der galvanotaktischen Migration im Gleichstromfeld (rot) und ohne (schwarz) von HROG 02 (a), HROG 15 (b) und HROG 17 (c) dargestellt als Mittelwert \pm STABW. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Gleichstromfeld * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$ und im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DMSO * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney U-Test). (Positive X-Werte implizieren eine Wanderung zur Anode.) Weiterhin wird der Median (graue Linie), Mittelwert (gestrichelte Linie) die Nulllinie (grau) als Ursprungsstartpunkt der Zellen sowie das 10% und 90% Quantil dargestellt.

Bei HROG 02 war in X-Richtung eine signifikante anodale Migration im elektrischen Gleichstromfeld unter Einfluss von Afatinib und in der Kontrolle mit Dimethylsulfoxid festzustellen, die jeweils den Hauptanteil der zuvor gemessenen Distanzerhöhung ausmachte. In der Versuchsgruppe mit Capivasertib zeigte sich hier eine Beeinflussung der Wanderungsrichtung und so trat, anstelle der anodalen Wanderung von 13.44 μm , die in der Kontrollgruppe mit Dimethylsulfoxid zu beobachten war, nun eine kathodale Wanderung von -4.15 μm auf. Unter Einfluss von Capivasertib wanderten 55.76 % der Zellen im Feld in die Richtung der Kathode, während unter Afatinib-Einfluss 74.35 % der Zellen eine anodale Tendenz aufwiesen. Die Distanz der Zellen im Gleichstromfeld mit Capivasertib war nicht signifikant im Vergleich zu ihrer Kontrolle ohne das elektrische Feld, wie man es bereits an den Geschwindigkeiten erkennen konnte (Abb. 14 a). In X-Richtung dann jedoch signifikant zur entsprechenden Kontrolle mit Dimethylsulfoxid (Abb. 15 a). Die Richtungsänderung der Zellen in der Gleichstromstimulation könnte so zu Lasten der Geschwindigkeitssteigerung gewesen sein oder in einer veränderten Wahrnehmung beziehungsweise Weiterleitung des Feldes begründet liegen.

Die HROG 15 Zellen zeigten in jeder der Versuchskonstellationen, im Vergleich zu ihrer Kontrolle ohne Gleichstromfeld, einen signifikanten Anstieg der Distanz in die anodale Richtung. Unter Einfluss von Afatinib stieg die Distanz in X-Richtung im elektrischen Feld auf 4.33 μm , während die Zellen der DMSO-Gruppe durchschnittlich 5.71 μm zurücklegten. Der zuvor bereits bei der Geschwindigkeit festgestellte signifikante Unterschied zwischen den Gleichstromfeld-Gruppen mit Capivasertib und Dimethylsulfoxid blieb auch in X-Richtung erhalten. Im elektrischen Feld zeigten 76.68 % der Zellen im Versuch mit Capivasertib eine Wanderungstendenz zur Anode. HROG 15 verhielt sich entgegengesetzt zu HROG 02, hier blieb der Unterschied zur behandelten Kontrollgruppe unter Capivasertib-Behandlung signifikant und im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe im Gleichstromfeld stieg die anodale Wanderung von durchschnittlich 5.71 μm auf 10.71 μm um das 1.88-fache der Kontrolle (Abb. 15 b).

Betrachtete man nun die HROG 17 Zelllinie, so stellte man hier weiterhin einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen im Gleichstrom und ihren Kontrollen fest. Ebenso bestand hier in allen Reihen die anodale Richtungswanderung. Unter Afatinib-Einfluss stieg der Anteil der Zellen, die im Gleichstromfeld in die Richtung der Anode wanderten, um weniger als 5 % im Vergleich zu dem Anteil, der zuvor ohne Feld in die entsprechende Richtung wanderte. Der Anteil erhöhte sich von 53.82 % auf 58.3 %. Im Vergleich dazu änderte sich der Anteil in der Gruppe der Zellen, die nur mit Dimethylsulfoxid behandelt wurden, von 48.54 %, ohne elektrisches Gleichstromfeld, auf 74.94 %, mit elektrischer Gleichstromstimulation. Während die die Distanz in X-Richtung unter Dimethylsulfoxid noch auf 13.78 μm stieg, erreichten die Zellen unter Einfluss von Capivasertib nur noch 12.47 μm und jene mit Afatinib sogar nur 6.81 μm , das entspricht weniger als der Hälfte der DMSO-Kontrolldistanz (Abb. 15 c).

Unter DMSO-Behandlung stellte sich also weiterhin in X-Richtung ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ohne Gleichstromfeld dar, ebenso wie bereits in den Versuchen zu Beginn ohne Dimethylsulfoxid (s. 3.1 Migration von Glioblastomzellen im Gleichstromfeld). Auch Afatinib wies diesen Unterschied weiterhin signifikant in allen Zelllinien auf und hatte dementsprechend keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Wanderungsrichtung. Es sorgte jedoch anscheinend für eine allgemeine Verringerung der anodalen Wanderungsdistanz in allen drei Zelllinien, um im Durchschnitt 32.85 %.

Capivasertib hatte nicht nur, wie zuvor anhand der Geschwindigkeiten festgestellt, einen hemmenden Effekt auf die Migrationsdistanzsteigerung im elektrischen Feld, weitergehend führte es auch zu einer Umkehrung der Migration bei HROG 02 (Abb. 15 a). Der Unterschied in der Reaktion könnte durch den veränderten PTEN-Genstatus begründet werden. So schien der Effekt des Capivasertib beim Normaltyp (HROG 02) am größten und eine eingeschränkte Phosphataseaktivität den Effekt abzuschwächen (HROG 15, HROG 17) beziehungsweise vollständig auszulöschen (Abb. 16).

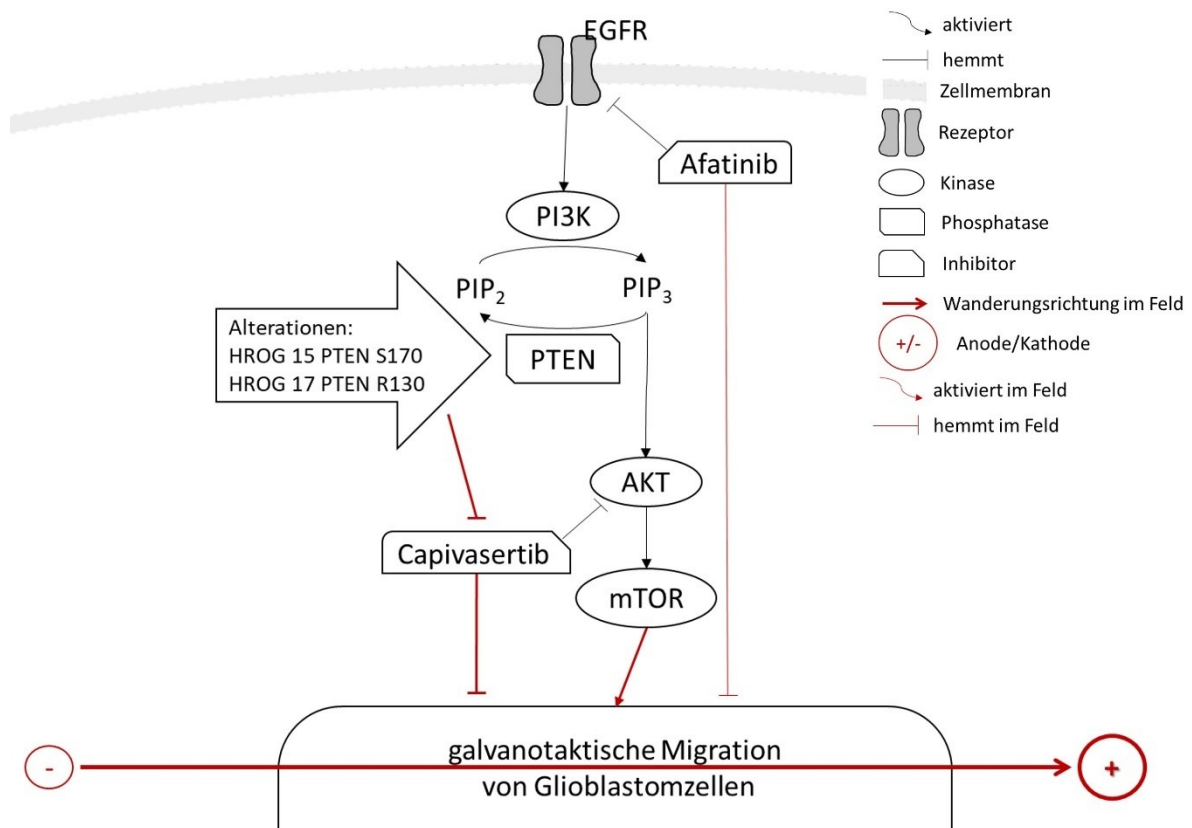


Abb. 16: Einfluss der elektrischen Gleichstromstimulation auf unsere Glioblastomzellen. Ausschnitt aus dem scheinbar relevanten EGF-Rezeptor und PI3K/AKT-Signalwegen mit den Angriffsorten der Inhibitoren Afatinib und Capivasertib. Es stellt in rot den Einfluss des elektrischen Feldes auf die Migration in unseren Ergebnissen, in Abhängigkeit der Signifikanz (je größer die Linienstärke dargestellt ist, desto niedriger war der p-Wert) dar.

4. Diskussion

4.1 Große Heterogenität der Glioblastomzellen

Anhand unserer Versuche ließ sich eine große interindividuelle und intratumorale Heterogenität feststellen. Jede Zelle unserer Zelllinien wies ein individuelles Wanderungsverhalten auf. Sodass, wie in den Ergebnissen in 3.1 Migration von Glioblastomzellen im Gleichstromfeld bereits beschrieben, unabhängig davon, ob ein elektrisches Feld vorhanden war oder nicht, eine große Streuung um unsere Ursprungsposition zu erkennen war. Dabei stellte es sich so dar, als würde es sich bei dieser Verteilung im Raum um eine zelllinienspezifische Eigenschaft handeln. Dieses allgemein zu beobachtende Phänomen wurde bereits auf genomischer [Sottoriva 2013] und Genexpressionsebene beschrieben [Patel 2014; Carro 2009; Galli 2004], wie beispielsweise durch Einzelzell-Ribonukleinsäure-Sequenzierungsstudien belegt wurde [Patel 2014; Verhaak 2010]. Es ermöglichte eine Einteilung in unterschiedliche Phänotypen mit voneinander zu differenzierendem Verhalten und einem Einfluss auf die prognostische Bedeutung [Kleihues 1999].

Die beachtenswerten Unterschiede innerhalb einer Zellgruppe sowie die diversen wichtigen Einflussfaktoren, wie beispielsweise die zentrale Rolle der Tumormikroumgebung [Vollmann-Zwenz 2020] erschwerten eine vollständige Erfassung der beteiligten Mechanismen und sorgten nicht nur für eine große Variabilität in den Beobachtungen [Kim 2014; Scott 1995], sie verhinderten zudem auch an vielen Stellen die korrekte Identifizierung eines Tumorphänotyps [Cheray 2017]. Es wurde bereits beschrieben, dass Tumore einzelner Patienten aus verschiedenen Subpopulationen bestanden [Aubry 2014; Sturm 2014], die neben ihrer Grundmutation noch zusätzliche Alterationen aufwiesen [Loeb 2011] und so unterschiedliche Aufgaben während der Tumorgenese erfüllten [Yuan 2004]. Es könnte also möglich sein, dass der Entnahmeort Einfluss auf das zu erwartende Ergebnis hat. Einige Studien beschrieben bereits verschiedene molekulare Subtypen in einer Tumormprobe in Abhängigkeit davon, aus welchem Quadranten diese Probe stammte [Sottoriva 2013]. So zeigten Biopsien aus Kern- und Grenzflächen höhere genomische Veränderungen, als solche aus der peripheren Zone des Gehirns [Lombardi 2017]. Dies erlaubte dem Tumor auf selektiven Druck zu reagieren und trug so zu seiner Aggressivität und seinem Wachstum bei, führte aber ebenso zu einem erhöhten Therapieversagen [Yap 2012]. Es ist also von großer Bedeutung für die ganzheitliche Therapie, mögliche Gemeinsamkeiten zwischen den Subpopulationen zu finden, wie beispielsweise eine gerichtete Migration.

Neben den vorerwähnten molekularen Subtypen von Tumorzellen ist auch der Ursprung der Entstehung und ebenso die Entwicklung des Tumors noch nicht vollständig geklärt. Hieraus würde sich ein weiterer Ansatz für die weite Streuung und immense Heterogenität ergeben. Krebszellen wiesen in Studien bereits eine unterschiedlich starke Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie Differenzierung in verschiedene Zelltypen auf, ebenso wie auch eine hohe Variabilität in ihrer klonalen Evolution welche die genetische Vielfalt innerhalb des betroffenen Gewebes weiter unterstützten [Stieber 2013; Gerlinger 2012]. Zurückführen lassen könnte sich dies auf eine genetische Instabilität und damit verbundene erhöhte Mutation sowie einer Selektion nach Darwin [Gerlinger 2010].

In der Diskussion stehen weiterhin jedoch auch zwei verschiedene Tumormodelle. Während das lange bestehende stochastische Modell besagt, dass alle Tumorzellen die gleiche Mutation aufwiesen und ihre Heterogenität somit nur das Ergebnis intrinsischer und extrinsischer Faktoren wäre

[Cheray 2017], deutete das hierarchische Modell darauf hin, dass Zellen sich in ihrem Differenzierungsstadium unterscheiden [Cheray 2017] und nur einzelne kleine Untergruppen die Tumorprogression initiieren könnten [Catalano 2011]. Diese Subpopulation wurde vermehrt als Ursache der Tumorentstehung und -rezidivierung sowie der Resistenzbildung gesehen [Clancy 2021]. Eine abschließende Aussage lässt sich anhand unserer Versuchsergebnisse nicht treffen, da hier immer nur eine Probe von jedem Patienten untersucht wurde, deren genaue Lokalisation im Tumor nicht bekannt war. Jedoch könnte es künftig interessant sein, von Patienten mehr als eine Probe an unterschiedlichen Stellen des Tumors zu entnehmen und so verschiedene Versuchsreihen für jeden Patienten zu erproben.

Weit besser als die Tumorursache ist die epigenetische Regulation untersucht. Sie hatte einen ständigen Einfluss auf die Heterogenität und das Verhalten unserer Zellen. Die Zellidentitätsveränderungen sind stark koordinierte Mechanismen der Genexpression, die eine große Rolle bei der Tumorgenese, Entstehung von Metastasen und Rezidiven und somit ein großes Angriffsziel in der Therapie darstellen [Cheray 2017]. Der veränderte Gleichgewichtszustand einer Zelle ist immer als Reaktion auf innere und äußere Einflüsse, wie zum Beispiel ein elektrisches Feld, zu betrachten [Cheray 2017]. Es ist also von großem Interesse, die Möglichkeiten der Anpassung an Umwelteinflüsse durch mögliche Kommunikationsmechanismen mit der Mikroumgebung zu beobachten [Cheray 2017].

Genau dieses Bild vermittelten auch unsere Glioblastomzellen. In der Gesamtheit bildeten sie eine Richtungstendenz, was man als Indikation für einen oder mehrere gemeinsame Signalwege sehen könnte, die für die Erfassung des Feldes zuständig waren (näher erläutert im Abschnitt 4.2.1 Auswirkungsmöglichkeiten des elektrischen Feldes). Man konnte jedoch nicht vom durchschnittlichen Verhalten der Zellpopulation auf die Migration der einzelnen Zelle schlussfolgern, was wiederum darauf hinweisen könnte, dass es selbst innerhalb einer Zelllinie Unterschiede in der Signalgebung gab, die einen Einfluss darauf hatten, welches Migrationsverhalten die Zelle aufwies. Auch in weiteren Tumorarten ließ sich diese Heterogenität im elektrischen Feld wiederfinden, sodass, obwohl viele Tumorzelltypen eine Elektrotaxis durchlaufen konnten, ihre Reaktion je nach Tumorart und Metastasierungspotential unterschiedlich war [Pu 2007; Fraser 2003; Djamgoz 2001].

Da wir jedoch beobachteten, dass das Streuverhalten unserer Zellen in vielen Fällen abnahm, sobald ein elektrisches Feld bestand, ist zu vermuten, dass dieser Umstand Einfluss auf die bevorzugte Signalgebung gehabt haben könnte und so in der Summe die Heterogenität der Zellen aufgrund von Umwelteinflüssen moduliert werden könnte. Wie bereits zu Beginn dieser Arbeit erwähnt, könnte die Einschränkung auf bestimmte Mechanismen und so der Heterogenität, beziehungsweise der damit assoziierten Faktoren, welche die Streuung bestimmen, einen wichtigen Einfluss auf ein besseres Tumormanagement und bessere Therapieergebnisse haben [McCaig 2009; Funk 2006]. Es ist schwer, ohne ein verallgemeinerbares Konzept für die Heterogenität in einem Tumor festgelegt zu haben, ein definiertes Ziel für die Therapie auszumachen, sodass der Tumor durch die Therapien womöglich nie vollständig getroffen werden kann und somit weiterhin ein erhöhtes Risiko für weitere Infiltration, Rezidive und ein allgemeines Therapieversagen besteht [Vleeschouwer 2017]. Die Modulation einer gerichteten Migration durch Einflussfaktoren, wie beispielsweise ein elektrisches Feld, könnte also von Bedeutung für die Heterogenität eines Tumors und so für die Therapie und den Patienten sein.

4.2 Gerichtete Migration

Wie bereits in den Ergebnissen (s. 3.1 Migration von Glioblastomzellen im Gleichstromfeld) geschildert, erkannten wir ohne elektrisches Gleichstromfeld keine gerichtete Migration, während unter seinem Einfluss die Zellen (abgesehen von denen der HROG 05) vermehrt in die Richtung der Anode wanderten, dies zeigten auch bereits vorherige Studien [Clancy 2021; Pu 2007]. Die Ausprägung dieser Wanderung unterschied sich zwischen den Zelllinien und könnte auf einen gemeinsamen Signalweg hindeuten, dessen Nutzungsfrequenz beziehungsweise Signalstärke sich zwischen den Zelllinien unterschied. Auch an anderer Stelle wurde bereits beobachtet, dass Glioblastomzellen anscheinend hochgradig koordiniert wanderten [Ridley 2003]. Es drängte sich nun die Frage auf, wie dies möglich war und von welchen Faktoren diese Migration beeinflusst wurde.

Die Diffusions- und Invasioneigenschaften von astrozytären Tumoren wirken so, als würden sie eng mit denen der wandernden Gliom-Stammzellen zusammenhängen [Brabletz 2005]. Dementsprechend erfolgte bereits eine Unterteilung in verschiedene Subtypen anhand einer Genclusteranalyse von Anomalien in dem Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor A, der Isocitratdehydrogenase-1, dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) und Neurofibromin 1 [Verhaak 2010]. In dieser Einteilung zeigte der mesenchymale Subtyp ein stärkeres Invasionspotential im Vergleich zu den anderen Entitäten [Verhaak 2010]. Man könnte dies also insgesamt darin begründet sehen, dass eine bestimmte Kanal-Anomalie-Zusammensetzung eines Subtyps zu einem definierten Wanderungsverhalten führen könnte. Jedoch wurde auch schon in einem ähnlichen Versuch beschrieben, dass die Expression vieler Ionenkanäle zwar mit einem metastatischen Phänotyp verbunden war, die Aktivität der exprimierten funktionellen Kanäle jedoch ihre Nettowirkung auf die Zellmigration und -invasion bestimmte [Payne 2019].

Ebenso verhielt es sich auch in dem Versuch, denn Zellen mit ähnlichem Mutationsmuster unterschieden sich zwar in ihrer Geschwindigkeit, die Migrationsrichtung, beziehungsweise die Tatsache, dass sie überhaupt migrierten, blieb jedoch konstant. Besonders bei einem Vergleich der Glioblastom-Zelllinien an dieser Stelle im Gegensatz zu den im Gehirn sekundär metastasierten Zelllinien war zu erkennen, dass diese keine ausgeprägte Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit unter der Gleichstromstimulation aufwiesen. Es scheint sich also um ein spezifisches Verhalten des Glioblastom zu handeln, dessen Ursprungsmechanismus in seinen Zelleigenschaften begründet liegen müsste. Es drängt sich hier der Verdacht auf, dass Metastasen anderer, nicht im Gehirn entstandener Tumore, obwohl sie auch im Gehirn wachsen, sich grundlegend in ihren Eigenschaften von Tumoren unterscheiden, die sich primär dort gebildet haben.

An dieser Stelle muss betont werden, dass verschiedene Aspekte noch unsicher sind und methodisch bedingt Probleme entstanden, die auch in anderen Arbeiten bislang ungelöst blieben. Wie bereits in vielen Fällen beobachtet, ist die Migration von Zellen selten linear. Es kommt immer auch zu einer erratischen Migration. Ebenso wie bei Astrozyten [Tabata 2022] ließ sich auch bei den Glioblastomzellen nicht ausschließen, dass immer auch eine Wanderung ungeachtet der Anode und Kathode stattfand. Unabhängige Einflussfaktoren erschweren die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse weiter, denn Glioblastome entstehen in einem Körper, sie konnten also Gewebearrrieren überwinden, indem sie nicht nur ihr eigenes Zytoskelett umbauten, sondern auch die umliegende extrazelluläre Matrix [Cuddapah 2014]. Zudem konnten sie an benachbarten Zellen, wie beispielsweise Neuronen, Astrozyten oder Endothelzellen, haften [Vollmann-Zwerenz 2020]. All diese

Einflüsse lassen sich nur schwer in einem Labor nachstellen und so sind nicht nur unsere Forschungsergebnisse später nicht direkt bei Patienten anwendbar, sondern insgesamt schien es trotz steigendem Verständnis der Invasion problematisch, die Laborergebnisse direkt in die Praxis zu bringen [Perrin 2019]. Dennoch sind hochauflösende Analysen auf Einzelebenen wichtig, da sie relevante molekulare Ereignisse besser darstellten [Suvà 2019]. Es gilt also zunächst Modelle, wie an dieser Stelle beispielsweise für die Migration, zu entwerfen und Ideen für die „kleineren Bausteine“ zu entwickeln und diesen dann später die Reintegration in die Praxis zu ermöglichen.

Weiterhin konnte eine Einteilung in unterschiedliche Invasionsmuster erfolgen [Friedl 2012; Friedl 2009], die abhängig von genetischen Programmen [Cheung 2013] und der Mikroumgebung [Vitorino 2008] waren. Stimuliert könnten diese von „brain tumor initiating cells“ (Hirntumor initialisierende Zellen) [Alieva 2019; Sanai 2005] sowie von differenzierten Zellen werden [Nevo 2014; Friedl 2011]. Man unterschied zwischen der Einzelzellinvasion [Tsuji 2009; an Claes 2007] und der kollektiven Invasion, die vor allem auch bei soliden Tumoren zu finden war [Friedl 2012; Wolf 2006; Friedl 2003]. In unserem Versuch betrachteten wir ausschließlich die Einzelzellinvasion, hier wurden in anderen Fällen bereits lamellipodiale Ausdehnungen beschrieben [Payne 2019], die wir auch in der Tat in der vorliegenden Arbeit in den mikroskopischen Aufnahmen unserer Zellen vermehrt erkennen konnten. Die Auswertung der Morphologie war zwar nicht Teil der vorliegenden Arbeit, könnte aber in folgenden Arbeiten einen Hinweis über die Fortbewegungsweise der Glioblastomzelle bieten. Für diese Theorie könnte auch die Tatsache sprechen, dass sowohl neurale Vorläuferzellen als auch Glioblastomzellen typischerweise eine uni- oder bipolare Morphologie aufwiesen, die den Wachstumskegeln auswachsender Axone ähnlich sahen [Lowery 2009]. Auch bei der Migration von Glioblastomzellen entlang der Bahnen der weißen Substanz und den perivaskulären Regionen im Gehirn zeigten sich Veränderungen in dem Zytoskelett der nun polarisierten Zelle [Paw 2015; Lefranc 2005; Demuth 2004]. Interessant wäre an dieser Stelle also neben den Auswirkungen des elektrischen Feldes auf die Migration ebenfalls, wie diese Morphologie von einer solchen Stimulation beeinflusst werden könnte.

4.2.1 Auswirkungsmöglichkeiten des elektrischen Feldes

Die bioelektrische Signalübertragung ist ein wichtiger Kontrollfaktor für die Zellwanderung, deren Rolle man bei vielen Krebsarten langsam zu entdecken beginnt. Auch wenn die Hauptfunktion der Ionenkanäle darin besteht, die zelluläre Homöostase aufrecht zu erhalten, sind sie auch Regulatoren höherer Ordnung vieler nachgeschalteter Signalwege [Payne 2019]. Es ist allgemein bekannt, dass Ionen- und Spannungsgradienten funktionell an der Steuerung der Zelldifferenzierung, -migration und -proliferation beteiligt sind und eine wichtige instruktive Rolle während der Regeneration und Remodellierung spielten [McLaughlin 2017; Levin 2014; Sundelacruz 2013].

Die zentrale Rolle der Ionenkanäle wurde weiterhin dadurch unterstützt, dass viele Tumorzellen deutliche Unterschiede nicht nur in der Expression von Kanälen aufwiesen, wie Mikroarray-Expressionsprofilierung von Ionenkanalgenen in Patienten-Primärtumoren mit Brustkrebs [Ko 2013], Lungenadenokarzinomen [Ko 2014] und Gliomen [Wang 2015] zeigten, sondern auch in der Ionenkanalaktivität voneinander zu differenzieren waren [Payne 2019]. In der Folge sorgte dies dann für eine Veränderung im Membranpotential der einzelnen Zelle und bildete einen entscheidenden Unterschied zu „normalen“ Zellen [Binggeli 1986], der mit einem metastatischen Phänotyp assoziiert

werden konnte [Payne 2019]. Die lokal unterschiedlichen Ionenkonzentrationen in einer Zelle waren hier für die Initialisierung der Zellmigration wichtig [Brisson 2011; Denker 2002].

Nun stellte sich selbstverständlich die Frage, ob dies auch in Glioblastomzellen der Fall ist und ob dieser Einfluss auch auf andere Tumore im neuronalen Netzwerk zutrifft. Anhand unserer Ergebnisse war deutlich zu erkennen, dass Glioblastomzellen im Vergleich zu den Metastasezellen, aus einem Bronchialkarzinom, von dem elektrischen Feld beeinflusst wurden und sich ihre Migrationsrichtung und Geschwindigkeit veränderten. Die Metastasezellen waren also nicht im gleichen Ausmaß im Stande das elektrische Feld wahrzunehmen, die Depolarisation ihrer Zellen unterschied sich also von der in Glioblastomzellen. Ein stärker depolarisiertes Ruhemembranpotential schien mit einem höheren Metastasierungspotential und einer allgemein positiv korrelierenden Proliferationsrate [Yang 2013] verbunden zu sein, wie es sich auch in unseren Versuchsergebnissen widerspiegelte, und eine erzwungene Hyperpolarisation konnte die Migration und Invasivität verringern [Chernet 2016; Chernet 2014; Chernet 2013]. Ähnliches wäre auch bei dem Glioblastom denkbar und zeigt, wie wichtig das elektrische Feld so nicht nur für die Migration ist. Leider ist die Studienlage hier noch recht spärlich, sodass sich hier noch weitere Arbeiten lohnen könnten.

Die Gesamtladung einer Zelle wird durch die Summe des Ionenflusses bestimmt, der nicht nur abhängig von der Expressionsanzahl der einzelnen Kanäle ist, sondern vor allem auch von der Aktivität der Summe der Kanäle [Payne 2019]. Von Bedeutung ist dies, da auf Gewebeebene der bioelektrische Zustand einzelner Zellen die benachbarten Zellen beeinflussen konnte, sodass elektrische Felder, durch das Aufsummieren von Membranpotentialen verschiedener Zellen in ladungsspezifischen Domänen, entstanden. Solche physiologischen Felder wurden in *in vivo*-Studien bereits entlang des rostralen migratorischen Stroms nachgewiesen [Cao 2013]. Elektrische Felder könnten also wichtige Hinweise für die Zellmigration und anschließende Gewebeorganisation geben [Forrester 2007; McCaig 2005], indem sie die bioelektrischen Eigenschaften einer Zelle beeinflussen würden. Es ist also denkbar, dass unabhängig von den Laborbedingungen in unseren Versuchen, Zellen durch ein nun selbst erzeugtes Gleichstromfeld in ihrer unmittelbaren Umgebung zur richtungsorientierten Migration angeregt würden. Auf diese Weise könnte das zuvor beobachtete anodale Wanderungsverhalten vom Tumor selbst gesteuert und verändert werden, um eine Migrationsrichtung oder ein „Invasionsziel“ zu erreichen. Außerdem könnte bioelektrisches Gewebe, wie es im neuronalen Netzwerk nicht selten vorkommt, dadurch ein anfälligeres Ziel der Invasion darstellen und die Wachstumsstrukturen des Tumors indirekt durch die hier natürlich vorkommenden bioelektrischen Potentialunterschiede vorgeben.

Die kleinen Veränderungen, die so im Ruhemembranpotential entstehen, könnten aufgrund der dünnen Plasmamembran der Zellen in große elektrische Felder übersetzt werden, welche die Konformation und damit die Aktivität von spannungsabhängigen Ionenkanälen steuern konnten [Schwab 2012], wodurch in einigen Studien komplexe Rückkopplungsschleifen entstanden [Pietak 2017]. Da das Ruhemembranpotential jedoch auf der Öffnungs- und Schließkinetik von Ionenkanälen beruht und diese ihre Konformation und somit Aktivität in Abhängigkeit von der Spannung der Membran änderten [Stock 2013], handelt es sich um einen ständig fluktuierenden Prozess. Durch diese Tatsache verkompliziert sich wiederum das Verständnis der Zusammenhänge weiter.

Als ein möglicher Ansatz wäre es denkbar, dass in Krebszellen ähnliche Mechanismen die elektrotaktische Reaktion antreiben, wie sie aus „normalen“ Zellen bereits bekannt sind [Payne 2019].

Die spezifischen Änderungen, die in der Zellmembranproteinfunktion erfolgen müssten, um eine Motilität und eine elektrotaktische Reaktion hervorzurufen, könnten auf ein frühes Ereignis in der normalen Zellektrotaxis zurückzuführen sein. Die polarisierte Erhöhung des elektrisch gesteuerten intrazellulären Ca^{2+} innerhalb einer Zelle wirkte sich dabei auf die asymmetrische Aktivierung nachgeschalteter Signalwege aus, die an der Migration beteiligt gewesen zu sein schienen [Finkelstein 2007]. Darunter fielen beispielsweise die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die *RAS homolog GTPase* (RHO-GTPasen, eine Familie von kleinen Guanosintriphosphat-bindenden Proteinen) und die *extracellular signal regulated kinase* (ERK, eine Serin/Threonin-Kinase), die im Verlauf für eben jene Veränderungen des Zytoskeletts verantwortlich gewesen sein könnten [Finkelstein 2007], wie möglicherweise die Aktin-Polymerisation oder Depolymerisation, Zelladhäsion und Wachstumsfaktorsignalisierung [Payne 2019]. Die Tumorzellen passten also während ihrer Migration die Zusammensetzung ihrer Zellmembran an [Soroceanu 1999].

Die Beeinflussung durch bioelektrische Potentiale betrifft Zellen aus unterschiedlichsten Bereichen. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass eine Störung des transepithelialen Potentials der Haut während einer Verwundung zu einer Verschiebung des lokalen Potentials führte, was die Migration von Keratinozyten als Teil des Heilungsprozesses induzierte [Zhao 2009]. Ähnliche Veränderungen des Potentials wurden auch bei verschiedenen Tumorbildungen beobachtet [Wirtz 2011; Pu 2007; Zhao 2006; Mycielska 2004; Cuzick 1998; Faupel 1997]. Aus der Literatur ging sogar hervor, dass diese Signale des elektrischen Feldes synergistisch mit chemischen und anderen Arten von Mikro-umgebungssignalen waren und jene sogar außer Kraft setzen konnten [Zhao 2006]. Die hierarchische Anordnung rückt die Wichtigkeit des elektrischen Feldes für die Zellen und eventuell sogar für ihre Richtungsorientierung weiter in den Vordergrund. Andere Studien zeigten jedoch auch, dass Glioblastom-initiiierende Zellen, die auf Poly-L-Ornithin/Laminin-Kunststoff kultiviert wurden, in Richtung der Anode migrierten, während eben diese Zellen hingegen bevorzugt zur Kathode wanderten, wenn sie in einem 3D-Hyaluronan/Kollagenhydrogel ausgesät wurden [Huang 2016]. Dies würde wiederum darauf hindeuten, dass physikalische Hinweise zwar einen entscheidenden Hinweis für die Richtung der Migration bieten, die chemischen Einflussfaktoren auf die Weiterleitung der entsprechenden Signale jedoch nicht außer Acht gelassen werden dürfen.

4.2.2 Eine mögliche Rolle des EGF-Rezeptors

Eine Bedeutung bei der gerichteten Migration in Glioblastomzellen könnte dem Rezeptor zugesprochen werden, der den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*) bindet. Anhand unserer Versuche mit HROG 05, einer Zelllinie mit hoher EGFR-Amplifikation [Mullins 2013b], konnten wir sehen, dass diese zwar ohne Gleichstromfeld eine vergleichsweise höhere Grundgeschwindigkeit aufwies, sich jedoch lediglich ein geringer Unterschied im elektrischen Feld ergab und die Richtungsorientierung im Gegensatz zu den anderen Zelllinien nicht ausgeprägt war.

Die EGFR-Amplifikation enthielt keine Liganden-bindende Domäne [Guo 2015], deswegen sah man die Variante III des EGF-Rezeptors (EGFRvIII) klassischerweise als schwach konstitutiv aktiv [Huang 1997]. Er war dementsprechend mit einem erhöhten Level an EGFR-Proteinen assoziiert [Jawhari 2016; Brennan 2013; Ramnarain 2006], die eventuell durch eine beeinträchtigten Endozytose und Abbau begründet sein könnte [Grandal 2007]. Es könnten so also weiterhin Signale über den EGF-Rezeptor übertragen worden sein, die unter anderem unter der Kontrolle der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) oder der Proteinkinase B (AKT) standen. Diese Signalgebung unterschied

sich jedoch sowohl quantitativ (unterschiedliche Signalstärke), als auch qualitativ (verschiedene Signalmoleküle) [An 2018]. Wodurch sich tumorfördernde Eigenschaften ergaben [Feng 2014; Babic 2013; Bonavia 2012; Nagane 1996; Nishikawa 1994], wie zum Beispiel ein autonomes Zellwachstum [Pan 2020], welches wir in unseren Versuchen als ungerichtete Migration erkennen konnten. Trotz des elektrischen Feldes wanderte HROG 05 kontinuierlich ohne Richtungsorientierung. Das elektrische Feld wurde scheinbar nicht von dem, durch seine Amplifikation Liganden-unabhängigen Rezeptor, wahrgenommen. Dennoch gab es in der Literatur auch vereinzelt Hinweise, dass die Amplifikation des EGF-Rezeptors ebenso aktiv war wie der Wildtyp-Liganden-gebundene Rezeptor [Fernandes 2001]. Dies könnte gestützt werden durch die Ergebnisse der HROG 05 Zellen, die sich außerhalb des Gleichstromfeldes schneller bewegten als die Zelllinien ohne EGFR-Veränderung.

Des Weiteren konnten wir feststellen, dass wie bereits in anderen Studien gezeigt [Huang 1997], in manchen Zusammenhängen Kinase-totes EGFRVIII die Tumorbildung und das Tumorstadium nicht förderte, so eben auch in unserem elektrischen Feld, dessen migrationsfördernde Wirkung nicht auf HROG 05 übertragbar war. Es scheint sich also so zu verhalten, dass in einem elektrischen Feld der Wachstumsvorteil, den man zuvor ohne elektrischen Einfluss bei Zelllinien ohne EGFR-Amplifikation gegenüber beobachten konnte, nun durch Gleichstromstimulation nicht mehr bestand. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass der EGF-Rezeptor an der Übertragung der elektrischen Migrationshinweise beteiligt ist.

Auch außerhalb des Gehirns wiesen einige Versuche auf die Bedeutung des EGF-Rezeptor bei der Erkennung des Gleichstromfeldes durch die Zelle hin. So zeigten MDA-MB-231 Brustkrebszellen ebenso wie Ratten Mamma-Adenokarzinom-MTLn3-Tumorzellen, dass sie sich einer Elektrotaxis über die EGFR-Signalübertragung unterzogen [Pu 2007]. Die EGFR-mRNA-Level korrelierte an dieser Stelle mit der elektrotaktischen Antwort und eine Transfektion mit dem EGF-Rezeptor bei schwach metastatischen Tumorzellen, zeigte eine verstärkte Ausrichtung und Geschwindigkeit [Pu 2007].

Die irreversible Inhibition des EGF-Rezeptors durch Afatinib [Solca 2012; Li 2008] in den Zelllinien HROG 02, 15 und 17 verlangsamte jedoch lediglich nicht signifikant die Wanderung und zeigte damit nicht die im Vorhinein erwarteten Ergebnisse. Dies entsprach dem allgemeinen Bild, dass beim Glioblastom nicht die gleichen Erfolge erzielt wurden, wie zum Beispiel beim nicht-kleinzelligen Lungentumor [Pan 2020]. Bei jenem Tumor lagen die Veränderungen Studien zu Folge jedoch vor allem in der Kinase-Domäne, während beim Glioblastom die extrazelluläre Domäne verändert war [Pan 2020]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Inhibition so nicht die gleiche Wirkung erzielen kann wie die Amplifikation des Rezeptors.

Man muss an dieser Stelle betonen, dass unser Versuch, ebenso wie viele andere, Limitationen aufwies, denn wie die meisten anderen Studien konzentrierten auch wir uns nur auf einen Signalweg. Da der Fluss eines Ions jedoch sowohl andere Ionentypen als auch das Ruhemembranpotential beeinflusst und umgekehrt, muss es sich nicht zwingend um eine Veränderung im Ionenkanal gehandelt haben, die zu einer Migrationsveränderung führte. Es könnte vielmehr ein Zusammenspiel dieser verschiedenen Faktoren gewesen sein, die sich gegenseitig bedingten. Zudem waren Tumorzellen entsprechend dem Prinzip der Zellkompensation in der Lage, ein anormales oder verändertes Ruhemembranpotential zu kompensieren, indem sie beispielsweise die Ionenkanalaktivität modulierten, um die Homöostase aufrecht zu erhalten [Payne 2019]. Ein weiterer Faktor könnten die

Laborbedingungen gewesen sein, denn auch wenn es sich bei den HROG-Zellen um niedrig passagierte Zellen handelte, war nicht auszuschließen, dass sie sich in der Kultur nicht von dem Ursprungstumor entfernt haben könnten. Da Zelllinien nicht gänzlich stabil sind, ist es weiterhin wichtig, auch patientennähere Zellen zu untersuchen.

Zu den Herausforderungen für das Abzielen auf den EGF-Rezeptor gehörte insgesamt allerdings nicht nur ein veränderter Rezeptor, sondern auch die große intratumorale Heterogenität der EGFR-Mutanten und Wildtyp-Expression sowie die mögliche Überwindung der Inhibition durch andere Rezeptoren [Furnari 2015; van den Bent 2015; Garrett 2009]. Eine Studie von Lyon zeichnete ein ähnliches Bild, auch hier hatte eine Inhibition oberhalb des PI3K-Weges keinen Einfluss auf die U87-Zellen (verewigte Glioblastomzellen) [Lyon 2019].

4.2.3 Einflussmöglichkeiten des PI3K/AKT-Signalwegs

Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs war, Literaturangaben zu Folge, stark in die Elektrotaxis vieler Zellen eingebunden [Li 2013; Meng 2011; Arocena 2010; Yao 2008; Pu 2007; Zhao 2002]. Veränderungen in diesem Signalweg und in Zytoskelett-Strukturen sind bei Tumoren weit verbreitet, Mutationen trugen oft zu seiner Hyperaktivierung bei und führten so zu einer onkogenen Transformation „normaler“ Zellen, so konnte es zum Beispiel bei Mäusen zu einer somatischen Tumorbildung mit erhöhter Krebszellinvasion und Arzneimittelresistenzen kommen [Bader 2006; Kang 2005; Samuels 2005]. Neben den kritischen Zellfunktionen schien die PI3K-Aktivierung ebenfalls am Umbau des Zytoskeletts beteiligt gewesen zu sein [Hoxhaj 2019; Jiménez 2000], welche das Metastasierungspotential von Tumorzellen erhöhte [Deng 2022].

Auch wenn die genaue Kausalität noch weitestgehend ungeklärt war, schien es einen interessanten Zusammenhang zwischen den Zytoskelett-assoziierten Proteinen und ihrer Regulation durch Signalnetzwerke wie beispielsweise den PI3K/AKT-Signalweg, als Reaktion auf externe und interne Stimuli, zu geben. So zeigten auch unsere Zelllinien unter Inhibition des Signalweges mit Capivasertib eine signifikant geringere Wanderung und in einer sogar eine Aufhebung der Migrationsrichtung.

Wenn man Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat (PIP₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃), die Lipidprodukte der Phosphoinositid-3-Kinase, betrachtete, gab es vermehrt Hinweise, dass sie unter anderem durch Bindung an Effektorproteine, welche eine Pleckstrin-Homologie-Domäne enthielten [Fruman 2017; Campa 2015; Ebi 2013], die Aktivität von Mitgliedern der RHO-GTPasen und somit die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts beeinflussten [McCormick 2019; Castellano 2011; Spiering 2011; Ridley 2006; Bompard 2004]. Die Polymerisation der Aktinmonomere konnte an der Vorderkante der Plasmamembran wandernder Zellen die Bildung von Lamellipodien induzieren [Yamaguchi 2007], welche die bereits beschriebene beiläufig erfolgte Beobachtung in der Morphologie unserer Glioblastomzellen erklären könnte. Dieser polarisierte Aktin-Umbau wurde mit einer polarisierten Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges in Verbindung gebracht [Meng 2011; Zhao 2002].

Die Gesamteffizienz der gerichteten Zellmigration schien zudem oftmals eng mit den Mikrotubuli zusammenzuhängen [Garcin 2019; Etienne-Manneville 2013; Ganguly 2012]. Weiterhin wurde die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges mit der Mikrotubuli-Stabilität in Verbindung gebracht [Batrouni 2020; Thapa 2020; Onishi 2007]. Einige Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen der Anreicherung der PI3K-Signalgebung und der Mikrotubuli-Stabilität an der Vorderkante der

wandernden Zellen [Sasaki 2004; Higuchi 2001], während andere zum Beispiel in Fibroblastenzellen zeigten, dass durch Zugabe eines *pan*-PI3K-Inhibitors oder Einführung der dominant negativen AKT-Form Mikrotubuli destabilisiert wurden. Diese Veränderungen der Mikrotubuli könnten, durch die Förderung der unkontrollierten Beweglichkeit der Krebszelle, das Fortschreiten des Tumors unterstützt haben [Deng 2022].

All dies gab Anlass zu erwarten, dass durch Inhibition der Proteinkinase B ein ähnlicher Effekt eintreten könnte, dass also im elektrischen Gleichstromfeld die Geschwindigkeit und auch der Richtungseinfluss verändert wurden. In einer der Zelllinien (HROG 02) konnten wir diesen Effekt beobachten, die anodale Wanderung wurde im Feld beinahe zu einer kathodalen Wanderung. Demgegenüber stieg die Distanz in X-Richtung einer zweiten Zelllinie (HROG 15) sogar im elektrischen Feld an. In einer anderen Zelllinie wirkte sich die Inhibition ohne elektrisches Feld negativ auf die Geschwindigkeit aus. Es sieht also so aus, als könnte die Proteinkinase B sowohl einen Schlüsselpunkt in der Fortbewegung, aber auch in der Weiterleitung der Feldwahrnehmung darstellen. Der Einfluss des AKT-Inhibitors schien hier abhängig vom Genstatus, des Phosphatase und Tensinhomologons (PTEN), der Zelllinie gewesen zu sein.

Dieser Tumorsuppressor ist in Glioblastomen regelmäßig mutiert und, während er unter normalen Umständen als Negativregulator des PI3K/AKT-Signalweges fungierte [Klempner 2013], verursachte die Mutation einen Funktionsverlust, sodass es zu einer PI3K-Hyperaktivierung kam [Bader 2006; Kang 2005; Samuels 2005]. Eine solche Veränderung im Genstatus von PTEN lag in zwei unserer Zelllinien (HROG 15 und HROG 17) vor und schien den Effekt von Capivasertib zu hemmen, sodass nur bei der Zelllinie ohne PTEN-Veränderung (HROG 02) eine Umkehrung der Migration erfolgte. Es könnte dementsprechend sein, dass sich die Hyperaktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase und die Inhibition der Proteinkinase B im Anschluss einander ausgleichen und so die Signalgebung wieder beinahe regulär stattfand.

Festzuhalten ist also, dass der EGFR-PI3K/AKT-Signalweg eine mögliche Rolle in der Weiterleitung elektrischer Felder spielen könnte und somit die Richtungsreaktion beeinflussen würde. Der EGF-Rezeptor könnte durch seine Signalweiterleitung Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit gehabt haben. Es könnten jedoch auch weitere Rezeptoren für die galvanotaktische Weiterleitung von Bedeutung sein, die ein Übergehen des Rezeptors ermöglichen könnten. Auch eine Amplifikation des Rezeptors könnte weiteren Einfluss nehmen. Die Proteinkinase B scheint eine zentrale Rolle einzunehmen und mit ihm auch die Phosphoinositid-3-Kinase und PTEN. Denn nicht nur durch eine unterschiedlich starke AKT-Aktivierung, sondern auch durch Inhibition, zeigte sich die galvanotaktische Migration verändert (Abb. 17).

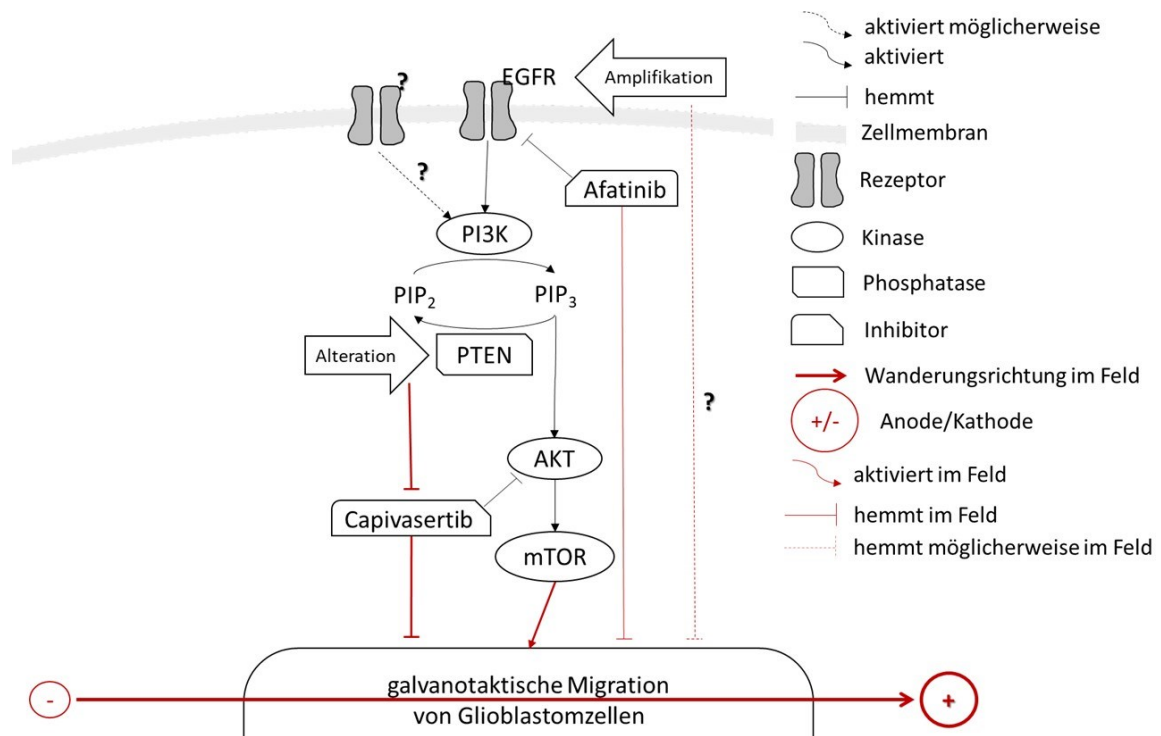


Abb. 17: Zentrale Rolle des EGF-Rezeptors und des PI3K/AKT-Signalweges für die galvanotaktische Migration unserer Glioblastomzellen durch elektrische Gleichstromstimulation (rot) mit möglichen Ansatzpunkten in dieser Aktivierung für weitere Forschungen.

5. Zusammenfassung

Das Glioblastom ist der häufigste primär bösartige intrinsische Gliatumor, der aufgrund seiner hohen Aggressivität mit einer schlechten Prognose und nahezu universeller Sterblichkeit einhergeht. Die diffuse infiltrative Natur spiegelt sich in der signifikanten molekularen und zellulären Heterogenität des Tumors wider, die es ihm erlaubte, auf selektiven Druck zu reagieren und an vielen Stellen zum Therapieversagen führte. Die häufige Amplifikation des Rezeptors, an den der epidermale Wachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*) bindet, und Mutationen im Phosphatase und Tensin homologon (PTEN)-Gen sorgten für verstärkte Proliferation und unterstützten das Überleben des Tumors. Die starke Infiltration, die eine Resektion weiter erschwerte, könnte sich an bioelektrischen Feldern orientieren, die durch endogene Aktionspotentiale entstehen könnten. Es könnte also eine Wanderungsrichtung durch diese Felder, wie sie durch natürlich vorkommende bioelektrische Potentialdifferenzen zustande kommen, die Invasion von Gehirntumorzellen in das tumorumgebende Gewebe vorgeben. Ebenso wie es in der Galvanotaxis mit der Migration entlang eines Gleichstromfeldes der Fall ist.

Im Versuch wurden vom Patienten stammende niedrig passagierte Glioblastomzellen und Metastazellen eines Bronchialkarzinoms sowie eines Colonkarzinoms in einer Stimulationskammer einem elektrischen Gleichstromfeld ausgesetzt und die Geschwindigkeit und Richtung ihrer Migration wurden gemessen. Alle Glioblastomzellen wiesen einen Migrationsphänotyp im Gleichstromfeld auf, der oftmals mit einer Vergrößerung der Distanz und Richtungsorientierung zur Anode einherging. Da es sich bei der Steigerung der Geschwindigkeit nicht um eine signifikante Steigerung senkrecht zu den elektrischen Feldlinien handelte, lag dieser Wanderung vermutlich keine zufällige Verteilung zugrunde. Glioblastomzellen folgen gerichtet dem elektrischen Feld in die Richtung der Anode.

Ebenfalls war zu erkennen, dass die interindividuelle und intratumorale Heterogenität sich in Bezug auf das Migrationsverhalten widerspiegelte. Die Gesamtheit einer Zelllinie beziehungsweise einer Tumorart bildete hierbei eine Richtungstendenz, dies ließ jedoch keinen klaren Rückschluss auf die einzelne Zelle zu. Insgesamt wiesen Zelllinien mit einem ähnlichen Mutationsmuster zwar eine unterschiedliche Geschwindigkeit auf, ihre Richtungstendenz blieb jedoch zwischen den Linien erhalten. Dieses Phänomen betraf nicht alle Tumore im neuronalen System, denn die Metastasen zeigten neben ihrer allgemein geringen Wanderung ein weitestgehend unaffektiertes Verhalten bei einer Gleichstromstimulation. Metastasen unterscheiden sich dementsprechend in ihrer Migration grundlegend vom Glioblastom.

Wir vermuteten, dass eine pharmakologische Beeinflussung des EGF-Rezeptors und des stromabwärts liegenden Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) / Proteinkinase B (AKT)-Signalweges die zuvor noch möglich gewesene galvanotaktische Migration verhinderte. Afatinib zeigte hier nur eine leichte Dämpfung der Galvanotaxis, dabei blieb die Richtungstendenz unverändert. Capivasertib hingegen verhinderte die Migration von Glioblastomzellen ohne genetische Veränderungen im PI3K/AKT-Signalweg, nicht aber in den Zellen, in denen eine PTEN-Mutation vorlag. Unsere Daten zeigten also, dass Glioblastomzellen im elektrischen Gleichstromfeld migrieren und der PI3K/AKT-Signalweg in diese Galvanotaxis stark eingebunden ist.

6. Thesen

1. Das Glioblastom ist durch eine große inter- und intratumorale Heterogenität gekennzeichnet.
2. Die durch eine Gleichstromstimulation in einer Zellkammer simulierten bioelektrischen Felder, könnten Wanderungshinweise für Glioblastomzellen darstellen.
3. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Glioblastomzellen stieg bei vier der fünf Zelllinien.
4. Die Geschwindigkeitssteigerung fand signifikant in Richtung der Anode statt.
5. Metastasezellen zeigten eine geringe Grundmigration, deren Geschwindigkeit durch das Gleichstromfeld nicht signifikant gesteigert wurde.
6. Die Zellen der HROBMC 01, der Metastase eines Colonkarzinoms, wanderten signifikant in Richtung der Kathode.
7. Die durchschnittlichen Zellen von Glioblastomen und Metastasen, deren Primärtumore außerhalb des zentralen Nervensystems lagen, unterschieden sich signifikant in ihrer Geschwindigkeit, sowohl mit als auch ohne Gleichstromfeld.
8. Die durchschnittliche Wanderung der Glioblastomzellen in die Richtung der Anode unterschied sich signifikant von der kathodalen Tendenz der Metastasezellen.
9. Der EGFR-Inhibitor Afatinib hemmte in allen Zelllinien die Geschwindigkeit nicht signifikant, eine signifikante Steigerung der Geschwindigkeit durch das Gleichstromfeld blieb erhalten.
10. Unter Einfluss des AKT Inhibitors Capivasertib stieg die Geschwindigkeit in zwei von drei Zelllinien, in der anderen Zelllinie hemmte es nicht nur die Geschwindigkeitssteigerung, sondern auch die Richtungsantwort im elektrischen Gleichstromfeld.

7. Bibliografie

- Adams, Hadie; Chaichana, Kaisorn L.; Avendaño, Javier; Liu, Brian; Raza, Shaan M.; Quiñones-Hinojosa, Alfredo (2013): Adult cerebellar glioblastoma: understanding survival and prognostic factors using a population-based database from 1973 to 2009. In: *World neurosurgery* 80 (6), e237-43. DOI: 10.1016/j.wneu.2013.02.010.
- Agarwal, Supreet; Al-Keilani, Maha S.; Alqudah, Mohammad A. Y.; Sibenaller, Zita A.; Ryken, Timothy C.; Assem, Mahfoud (2013): Tumor derived mutations of protein tyrosine phosphatase receptor type k affect its function and alter sensitivity to chemotherapeutics in glioma. In: *PloS one* 8 (5), e62852. DOI: 10.1371/journal.pone.0062852.
- Alieva, Maria; Leidgens, Verena; Riemenschneider, Markus J.; Klein, Christoph A.; Hau, Peter; van Rheenen, Jacco (2019): Intravital imaging of glioma border morphology reveals distinctive cellular dynamics and contribution to tumor cell invasion. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 2054. DOI: 10.1038/s41598-019-38625-4.
- Allen, Greg M.; Mogilner, Alex; Theriot, Julie A. (2013): Electrophoresis of cellular membrane components creates the directional cue guiding keratocyte galvanotaxis. In: *Current biology: CB* 23 (7), S. 560–568. DOI: 10.1016/j.cub.2013.02.047.
- An, Zhenyi; Aksoy, Ozlem; Zheng, Tina; Fan, Qi-Wen; Weiss, William A. (2018): Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. In: *Oncogene* 37 (12), S. 1561–1575. DOI: 10.1038/s41388-017-0045-7.
- Andrikopoulou, Angeliki; Chatzinikolaou, Spyridoula; Panourgias, Evangelia; Kaparelou, Maria; Liontos, Michalis; Dimopoulos, Meletios-Athanasios; Zagouri, Flora (2022): “The emerging role of capivasertib in breast cancer”. In: *The Breast: Official Journal of the European Society of Mastology* 63, S. 157–167. DOI: 10.1016/j.breast.2022.03.018.
- Armento, Angela; Ehlers, Jakob; Schötterl, Sonja; Naumann, Ulrike (2017): Glioblastoma. *Molecular Mechanisms of Glioma Cell Motility*. Hg. v. Steven de Vleeschouwer. Brisbane (AU). DOI: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch5
- Arocena, Miguel; Zhao, Min; Collinson, Jon Martin; Song, Bing (2010): A time-lapse and quantitative modelling analysis of neural stem cell motion in the absence of directional cues and in electric fields. In: *Journal of neuroscience research* 88 (15), S. 3267–3274. DOI: 10.1002/jnr.22502.
- Assem, Mahfoud; Sibenaller, Zita; Agarwal, Supreet; Al-Keilani, Maha S.; Alqudah, Mohammad A. Y.; Ryken, Timothy C. (2012): Enhancing diagnosis, prognosis, and therapeutic outcome prediction of gliomas using genomics. In: *Omic: a journal of integrative biology* 16 (3), S. 113–122. DOI: 10.1089/omi.2011.0031.
- Aubry, M.; Tayrac, M. de; Etcheverry, A.; Clavreul, A.; Saikali, S.; Menei, P.; Mosser, J. (2014): O4.04'FROM THE CORE TO BEYOND THE MARGIN': A GENOMIC PICTURE OF GLIOBLASTOMA INTRATUMOR HETEROGENEITY. In: *Neuro-Oncology* 16 (Suppl 2), ii7. DOI: 10.1093/neuonc/nou174.25.
- Babic, Ivan; Anderson, Erik S.; Tanaka, Kazuhiro; Guo, Deliang; Masui, Kenta; Li, Bing et al. (2013): EGFR mutation-induced alternative splicing of Max contributes to growth of glycolytic tumors in brain cancer. In: *Cell metabolism* 17 (6), S. 1000–1008. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.04.013.
- Bachoo, Robert M.; Maher, Elizabeth A.; Ligon, Keith L.; Sharpless, Norman E.; Chan, Suzanne S.; You, Mingjian James et al. (2002): Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. In: *Cancer cell* 1 (3), S. 269–277. DOI: 10.1016/s1535-6108(02)00046-6.
- Bader, Andreas G.; Kang, Sohye; Vogt, Peter K. (2006): Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (5), S. 1475–1479. DOI: 10.1073/pnas.0510857103.
- Batrouni, Alex G.; Baskin, Jeremy M. (2020): A MAP for PI3K activation on endosomes. In: *Nature cell biology* 22 (11), S. 1292–1294. DOI: 10.1038/s41556-020-00597-3.
- Bellail, Anita C.; Hunter, Stephen B.; Brat, Daniel J.; Tan, Chalet; van Meir, Erwin G. (2004): Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 36 (6), S. 1046–1069. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.01.013.
- Bernstein, J. J.; Woodard, C. A. (1995): Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels. In: *Neurosurgery* 36 (1), 124-32; discussion 132. DOI: 10.1227/00006123-199501000-00016.

- Binggeli, R.; Weinstein, R. C. (1986): Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. In: *Journal of theoretical biology* 123 (4), S. 377–401. DOI: 10.1016/s0022-5193(86)80209-0.
- Bompard, Guillaume; Caron, Emmanuelle (2004): Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. In: *The Journal of Cell Biology* 166 (7), S. 957–962. DOI: 10.1083/jcb.200403127.
- Bonavia, R.; Inda, M. M.; Vandenberg, S.; Cheng, S-Y; Nagane, M.; Hadwiger, P. et al. (2012): EGFRVIII promotes glioma angiogenesis and growth through the NF- κ B, interleukin-8 pathway. In: *Oncogene* 31 (36), S. 4054–4066. DOI: 10.1038/onc.2011.563.
- Borgens, R. B.; Roederer, E.; Cohen, M. J. (1981): Enhanced spinal cord regeneration in lamprey by applied electric fields. In: *Science (New York, N.Y.)* 213 (4508), S. 611–617. DOI: 10.1126/science.7256258.
- Brabletz, Thomas; Jung, Andreas; Spaderna, Simone; Hlubek, Falk; Kirchner, Thomas (2005): Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. In: *Nature reviews. Cancer* 5 (9), S. 744–749. DOI: 10.1038/nrc1694.
- Brennan, Cameron W.; Verhaak, Roel G. W.; McKenna, Aaron; Campos, Benito; Nushmeh, Houtan; Salama, Sofie R. et al. (2013): The somatic genomic landscape of glioblastoma. In: *Cell* 155 (2), S. 462–477. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.034.
- Brisson, L.; Gillet, L.; Calaghan, S.; Besson, P.; Le Guennec, J-Y; Roger, S.; Gore, J. (2011): Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. In: *Oncogene* 30 (17), S. 2070–2076. DOI: 10.1038/onc.2010.574.
- Burr, H. S. (1941): Changes in the Field Properties of Mice with Transplanted Tumors. In: *The Yale journal of biology and medicine* 13 (6), S. 783–788. PMID: 21433982
- Campa, Carlo C.; Ciralo, Elisa; Ghigo, Alessandra; Germena, Giulia; Hirsch, Emilio (2015): Crossroads of PI3K and Rac pathways. In: *Small GTPases* 6 (2), S. 71–80. DOI: 10.4161/21541248.2014.989789.
- Cao, Lin; Wei, Dongguang; Reid, Brian; Zhao, Siwei; Pu, Jin; Pan, Tingrui et al. (2013): Endogenous electric currents might guide rostral migration of neuroblasts. In: *EMBO reports* 14 (2), S. 184–190. DOI: 10.1038/embor.2012.215.
- Carpten, John D.; Faber, Andrew L.; Horn, Candice; Donoho, Gregory P.; Briggs, Stephen L.; Robbins, Christiane M. et al. (2007): A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. In: *Nature* 448 (7152), S. 439–444. DOI: 10.1038/nature05933.
- Carro, Maria Stella; Lim, Wei Keat; Alvarez, Mariano Javier; Bollo, Robert J.; Zhao, Xudong; Snyder, Evan Y. et al. (2009): The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumors. In: *Nature* 463 (7279), S. 318–325. DOI: 10.1038/nature08712.
- Castellano, Esther; Downward, Julian (2011): RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. In: *Genes & cancer* 2 (3), S. 261–274. DOI: 10.1177/1947601911408079.
- Catalano, Veronica; Gaggianesi, Miriam; Spina, Valentina; Iovino, Flora; Dieli, Francesco; Stassi, Giorgio; Todaro, Matilde (2011): Colorectal cancer stem cells and cell death. In: *Cancers* 3 (2), S. 1929–1946. DOI: 10.3390/cancers3021929.
- Chakrabarti, Indro; Cockburn, Myles; Cozen, Wendy; Wang, Ya-Ping; Preston-Martin, Susan (2005): A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999. In: *Cancer* 104 (12), S. 2798–2806. DOI: 10.1002/cncr.21539.
- Chen, Jian; McKay, Renée M.; Parada, Luis F. (2012): Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. In: *Cell* 149 (1), S. 36–47. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.009.
- Cheng, Lin; Wu, Qiulian; Guryanova, Olga A.; Huang, Zhi; Huang, Qian; Rich, Jeremy N.; Bao, Shideng (2011): Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 406 (4), S. 643–648. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.123.
- Cheray, Mathilde; Bégau, Gaëlle; Deluche, Elise; Nivet, Alexandre; Battu, Serge; Lalloué, Fabrice et al. (2017): Glioblastoma. Cancer Stem-Like Cells in Glioblastoma. Hg. v. Steven de Vleeschouwer. Brisbane (AU). DOI: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch4
- Chernet, Brook; Levin, Michael (2013): Endogenous Voltage Potentials and the Microenvironment: Bioelectric Signals that Reveal, Induce and Normalize Cancer. In: *Journal of clinical & experimental oncology Suppl* 1. DOI: 10.4172/2324-9110.S1-002.

Chernet, Brook T.; Adams, Dany S.; Lobikin, Maria; Levin, Michael (2016): Use of genetically encoded, light-gated ion translocators to control tumorigenesis. In: *Oncotarget* 7 (15), S. 19575–19588. DOI: 10.18632/oncotarget.8036.

Chernet, Brook T.; Levin, Michael (2014): Transmembrane voltage potential of somatic cells controls oncogene-mediated tumorigenesis at long-range. In: *Oncotarget* 5 (10), S. 3287–3306. DOI: 10.18632/oncotarget.1935.

Cheung, Kevin J.; Gabrielson, Edward; Werb, Zena; Ewald, Andrew J. (2013): Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. In: *Cell* 155 (7), S. 1639–1651. DOI: 10.1016/j.cell.2013.11.029.

an Claes; Idema, Albert J.; Wesseling, Pieter (2007): Diffuse glioma growth: a guerilla war. In: *Acta neuropathologica* 114 (5), S. 443–458. DOI: 10.1007/s00401-007-0293-7.

Clancy, Hannah; Pruski, Michal; Lang, Bing; Ching, Jared; McCaig, Colin D. (2021): Glioblastoma cell migration is directed by electrical signals. In: *Experimental cell research* 406 (1), S. 112736. DOI: 10.1016/j.yexcr.2021.112736.

Cone, C. D. (1970): Variation of the transmembrane potential level as a basic mechanism of mitosis control. In: *Oncology* 24 (6), S. 438–470. DOI: 10.1159/000224545.

Cone, C. D. (1971): Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. In: *Journal of theoretical biology* 30 (1), S. 151–181. DOI: 10.1016/0022-5193(71)90042-7.

Cone, C. D. (1974): The role of the surface electrical transmembrane potential in normal and malignant mitogenesis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 238, S. 420–435. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1974.tb26808.x.

Cortese, B.; Palamà, I. E.; D'Amone, S.; Gigli, G. (2014): Influence of electrotaxis on cell behaviour. In: *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro* 6 (9). DOI: 10.1039/c4ib00142g.

Costello, J. F.; Plass, C.; Arap, W.; Chapman, V. M.; Held, W. A.; Berger, M. S. et al. (1997): Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. In: *Cancer research* 57 (7), S. 1250–1254. PMID: 9102208

Crespo, Inês; Vital, Ana Luísa; Nieto, Ana Belen; Rebelo, Olinda; Tão, Hermínio; Lopes, Maria Celeste et al. (2011): Detailed characterization of alterations of chromosomes 7, 9, and 10 in glioblastomas as assessed by single-nucleotide polymorphism arrays. In: *The Journal of molecular diagnostics: JMD* 13 (6), S. 634–647. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2011.06.003.

Cuddapah, Vishnu Anand; Robel, Stefanie; Watkins, Stacey; Sontheimer, Harald (2014): A neurocentric perspective on glioma invasion. In: *Nature reviews. Neuroscience* 15 (7), S. 455–465. DOI: 10.1038/nrn3765.

Cuzick, J.; Holland, R.; Barth, V.; Davies, R.; Faupel, M.; Fentiman, I. et al. (1998): Electropotential measurements as a new diagnostic modality for breast cancer. In: *Lancet (London, England)* 352 (9125), S. 359–363. DOI: 10.1016/s0140-6736(97)10002-2.

Dai, Chengkai; Celestino, Joseph C.; Okada, Yoshifumi; Louis, David N.; Fuller, Greory N.; Holland, Eric C. (2001): PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. In: *Genes & Development* 15 (15), S. 1913–1925. DOI: 10.1101/gad.903001.

Datta, S. R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters, S.; Fu, H.; Gotoh, Y.; Greenberg, M. E. (1997): Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. In: *Cell* 91 (2), S. 231–241. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80405-5.

Dean, Michael; Fojo, Tito; Bates, Susan (2005): Tumour stem cells and drug resistance. In: *Nature reviews. Cancer* 5 (4), S. 275–284. DOI: 10.1038/nrc1590.

Demuth, Tim; Berens, Michael E. (2004): Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. In: *Journal of neuro-oncology* 70 (2), S. 217–228. DOI: 10.1007/s11060-004-2751-6.

Deng, Shuo; Leong, Hin Chong; Datta, Arpita; Gopal, Vennila; Kumar, Alan Prem; Yap, Celestial T. (2022): PI3K/AKT Signaling Tips the Balance of Cytoskeletal Forces for Cancer Progression. In: *Cancers* 14 (7). DOI: 10.3390/cancers14071652.

Denker, Sheryl P.; Barber, Diane L. (2002): Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na⁺-H exchanger NHE1. In: *The Journal of Cell Biology* 159 (6), S. 1087–1096. DOI: 10.1083/jcb.200208050.

Djamgoz, M. B.A.; Mycielska, M.; Madeja, Z.; Fraser, S. P.; Korohoda, W. (2001): Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltagegated Na⁺ channel activity. In: *Journal of cell science* 114 (Pt 14), S. 2697–2705. DOI: 10.1242/jcs.114.14.2697.

Dropcho, E. J.; Soong, S. J. (1996): The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. In: *Neurology* 47 (3), S. 684–690. DOI: 10.1212/wnl.47.3.684.

du Bois-Reymond, Emil Heinrich (1848). München, Bayerische Staatsbibliothek - Phys.sp. 186 x-1, OCLC 257822883. Online verfügbar unter <https://www.digitale-sammlungen.de/de/view/bsb10133654?page=5>, zuletzt geprüft am 26.04.2023.

Ebi, Hiromichi; Costa, Carlotta; Faber, Anthony C.; Nishtala, Madhuri; Kotani, Hiroshi; Juric, Dejan et al. (2013): PI3K regulates MEK/ERK signaling in breast cancer via the Rac-GEF, P-Rex1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (52), S. 21124–21129. DOI: 10.1073/pnas.1314124110.

Engelhard, Herbert H.; Villano, J. Lee; Porter, Kimberly R.; Stewart, Andrew K.; Barua, Manali; Barker, Fred G.; Newton, Herbert B. (2010): Clinical presentation, histology, and treatment in 430 patients with primary tumors of the spinal cord, spinal meninges, or cauda equina. In: *Journal of neurosurgery. Spine* 13 (1), S. 67–77. DOI: 10.3171/2010.3.SPINE09430.

Etienne-Manneville, Sandrine (2013): Microtubules in cell migration. In: *Annual review of cell and developmental biology* 29, S. 471–499. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155711.

Faupel, M.; Vanel, D.; Barth, V.; Davies, R.; Fentiman, I. S.; Holland, R. et al. (1997): Electropotential evaluation as a new technique for diagnosing breast lesions. In: *European journal of radiology* 24 (1), S. 33–38. DOI: 10.1016/s0720-048x(96)01113-8.

Feng, Enshan; Sui, Changbai; Wang, Tongxin; Sun, Gaoling (2017): Temozolomide with or without Radiotherapy in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis. In: *European neurology* 77 (3-4), S. 201–210. DOI: 10.1159/000455842.

Feng, H.; Hu, B.; Vuori, K.; Sarkaria, J. N.; Furnari, F. B.; Cavenee, W. K.; Cheng, S-Y (2014): EGFRVIII stimulates glioma growth and invasion through PKA-dependent serine phosphorylation of Dock180. In: *Oncogene* 33 (19), S. 2504–2512. DOI: 10.1038/onc.2013.198.

Feng, Haizhong; Hu, Bo; Jarzynka, Michael J.; Li, Yanxin; Keezer, Susan; Johns, Terrance G. et al. (2012): Phosphorylation of dedicator of cytokinesis 1 (Dock180) at tyrosine residue Y722 by Src family kinases mediates EGFRVIII-driven glioblastoma tumorigenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (8), S. 3018–3023. DOI: 10.1073/pnas.1121457109.

Feng, Haizhong; Hu, Bo; Liu, Kun-Wei; Li, Yanxin; Lu, Xinghua; Cheng, Tao et al. (2011): Activation of Rac1 by Src-dependent phosphorylation of Dock180(Y1811) mediates PDGFR α -stimulated glioma tumorigenesis in mice and humans. In: *The Journal of clinical investigation* 121 (12), S. 4670–4684. DOI: 10.1172/JCI58559.

Fernandes, Catarina; Costa, Andreia; Osório, Lúgia; Lago, Rita Costa; Linhares, Paulo; Carvalho, Bruno; Caeiro, Cláudia (2017): Glioblastoma. *Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy*. Hg. v. Steven de Vleeschouwer. Brisbane (AU). DOI: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch11

Fernandes, H.; Cohen, S.; Bishayee, S. (2001): Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRVIII/DeltaEGFR) expressed in cancer cells. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (7), S. 5375–5383. DOI: 10.1074/jbc.M005599200.

Finkelstein, Erik I.; Chao, Pen-hsiu Grace; Hung, Clark T.; Bulinski, Jeannette Chloë (2007): Electric field-induced polarization of charged cell surface proteins does not determine the direction of galvanotaxis. In: *Cell motility and the cytoskeleton* 64 (11), S. 833–846. DOI: 10.1002/cm.20227.

Forrester, John V.; Lois, Noemi; Zhao, Min; McCaig, Colin (2007): The spark of life: the role of electric fields in regulating cell behaviour using the eye as a model system. In: *Ophthalmic research* 39 (1), S. 4–16. DOI: 10.1159/000097901.

Fraser, S. P.; Grimes, J. A.; Diss, J. K. J.; Stewart, D.; Dolly, J. O.; Djamgoz, M. B. A. (2003): Predominant expression of Kv1.3 voltage-gated K⁺ channel subunit in rat prostate cancer cell lines: electrophysiological, pharmacological and molecular characterisation. In: *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 446 (5), S. 559–571. DOI: 10.1007/s00424-003-1077-0.

Fraser, Scott P.; Diss, James K. J.; Chioni, Athina-Myrto; Mycielska, Maria E.; Pan, Huiyan; Yamaci, Rezan F. et al. (2005): Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 11 (15), S. 5381–5389. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0327.

Friedl, Peter; Alexander, Stephanie (2011): Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. In: *Cell* 147 (5), S. 992–1009. DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.016.

- Friedl, Peter; Gilmour, Darren (2009): Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (7), S. 445–457. DOI: 10.1038/nrm2720.
- Friedl, Peter; Locker, Joseph; Sahai, Erik; Segall, Jeffrey E. (2012): Classifying collective cancer cell invasion. In: *Nature cell biology* 14 (8), S. 777–783. DOI: 10.1038/ncb2548.
- Friedl, Peter; Wolf, Katarina (2003): Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. In: *Nature reviews. Cancer* 3 (5), S. 362–374. DOI: 10.1038/nrc1075.
- Fruman, David A.; Chiu, Honyin; Hopkins, Benjamin D.; Bagrodia, Shubha; Cantley, Lewis C.; Abraham, Robert T. (2017): The PI3K Pathway in Human Disease. In: *Cell* 170 (4), S. 605–635. DOI: 10.1016/j.cell.2017.07.029.
- Funk, Richard H. W. (2015): Endogenous electric fields as guiding cue for cell migration. In: *Frontiers in Physiology* 6. DOI: 10.3389/fphys.2015.00143.
- Funk, Richard H. W.; Monsees, Thomas K. (2006): Effects of electromagnetic fields on cells: physiological and therapeutical approaches and molecular mechanisms of interaction. A review. In: *Cells, tissues, organs* 182 (2), S. 59–78. DOI: 10.1159/000093061.
- Furnari, Frank B.; Cloughesy, Timothy F.; Cavenee, Webster K.; Mischel, Paul S. (2015): Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. In: *Nature reviews. Cancer* 15 (5), S. 302–310. DOI: 10.1038/nrc3918.
- Galli, Rossella; Binda, Elena; Orfanelli, Ugo; Cipelletti, Barbara; Gritti, Angela; Vitis, Simona de et al. (2004): Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. In: *Cancer research* 64 (19), S. 7011–7021. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1364.
- Ganguly, Anutosh; Yang, Hailing; Sharma, Ritu; Patel, Kamala D.; Cabral, Fernando (2012): The role of microtubules and their dynamics in cell migration. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (52), S. 43359–43369. DOI: 10.1074/jbc.M112.423905.
- Garcin, Clare; Straube, Anne (2019): Microtubules in cell migration. In: *Essays in Biochemistry* 63 (5), S. 509–520. DOI: 10.1042/EBC20190016.
- Garrett, Thomas P. J.; Burgess, Antony W.; Gan, Hui K.; Luwor, Rod B.; Cartwright, Glenn; Walker, Francesca et al. (2009): Antibodies specifically targeting a locally misfolded region of tumor associated EGFR. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (13), S. 5082–5087. DOI: 10.1073/pnas.0811559106.
- Gerlinger, M.; Swanton, C. (2010): How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. In: *British journal of cancer* 103 (8), S. 1139–1143. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605912.
- Gerlinger, Marco; Rowan, Andrew J.; Horswell, Stuart; Math, M.; Larkin, James; Endesfelder, David et al. (2012): Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. In: *The New England journal of medicine* 366 (10), S. 883–892. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205.
- Gilbert, Mark R.; Wang, Meihua; Aldape, Kenneth D.; Stupp, Roger; Hegi, Monika E.; Jaeckle, Kurt A. et al. (2013): Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (32), S. 4085–4091. DOI: 10.1200/JCO.2013.49.6968.
- Grandal, Michael V.; Zandi, Roza; Pedersen, Mikkel W.; Willumsen, Berthe M.; van Deurs, Bo; Poulsen, Hans S. (2007): EGFRvIII escapes down-regulation due to impaired internalization and sorting to lysosomes. In: *Carcinogenesis* 28 (7), S. 1408–1417. DOI: 10.1093/carcin/bgm058.
- Guo, Gao; Gong, Ke; Wohlfeld, Bryan; Hatanpaa, Kimmo J.; Zhao, Dawen; Habib, Aryn A. (2015): Ligand-Independent EGFR Signaling. In: *Cancer research* 75 (17), S. 3436–3441. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0989.
- Hales, Colin G.; Pockett, Susan (2014): The relationship between local field potentials (LFPs) and the electromagnetic fields that give rise to them. In: *Frontiers in Systems Neuroscience* 8. DOI: 10.3389/fnsys.2014.00233.
- Han, S. Y.; Kato, H.; Kato, S.; Suzuki, T.; Shibata, H.; Ishii, S. et al. (2000): Functional evaluation of PTEN missense mutations using in vitro phosphoinositide phosphatase assay. In: *Cancer research* 60 (12), S. 3147–3151. PMID: 10866302
- Hatanpaa, Kimmo J.; Burma, Sandeep; Zhao, Dawen; Habib, Aryn A. (2010): Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 12 (9), S. 675–684. DOI: 10.1593/neo.10688.

- Higuchi, M.; Masuyama, N.; Fukui, Y.; Suzuki, A.; Gotoh, Y. (2001): Akt mediates Rac/Cdc42-regulated cell motility in growth factor-stimulated cells and in invasive PTEN knockout cells. In: *Current biology: CB* 11 (24), S. 1958–1962. DOI: 10.1016/s0960-9822(01)00599-1.
- Hoxhaj, Gerta; Manning, Brendan D. (2019): The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. In: *Nature reviews. Cancer* 20 (2), S. 74–88. DOI: 10.1038/s41568-019-0216-7.
- Huang, Ching-Wen; Cheng, Ji-Yen; Yen, Meng-Hua; Young, Tai-Horng (2009): Electrotaxis of lung cancer cells in a multiple-electric-field chip. In: *Biosensors & bioelectronics* 24 (12), S. 3510–3516. DOI: 10.1016/j.bios.2009.05.001.
- Huang, H. S.; Nagane, M.; Klingbeil, C. K.; Lin, H.; Nishikawa, R.; Ji, X. D. et al. (1997): The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (5), S. 2927–2935. DOI: 10.1074/jbc.272.5.2927.
- Huang, Paul H.; Xu, Alexander M.; White, Forest M. (2009): Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. In: *Science signaling* 2 (87), re6. DOI: 10.1126/scisignal.287re6.
- Huang, Yu-Ja; Hoffmann, Gwendolyn; Wheeler, Benjamin; Schiapparelli, Paula; Quinones-Hinojosa, Alfredo; Searson, Peter (2016): Cellular microenvironment modulates the galvanotaxis of brain tumor initiating cells. In: *Scientific reports* 6, S. 21583. DOI: 10.1038/srep21583.
- Huang, Yu-Ja; Schiapparelli, Paula; Kozielski, Kristen; Green, Jordan; Lavell, Emily; Guerrero-Cazares, Hugo et al. (2017): Electrophoresis of cell membrane heparan sulfate regulates galvanotaxis in glial cells. In: *Journal of cell science* 130 (15), S. 2459–2467. DOI: 10.1242/jcs.203752.
- Jänne, Pasi A.; Yang, James Chih-Hsin; Kim, Dong-Wan; Planchard, David; Ohe, Yuichiro; Ramalingam, Suresh S. et al. (2015): AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. In: *The New England journal of medicine* 372 (18), S. 1689–1699. DOI: 10.1056/NEJMoa1411817.
- Jawhari, Soha; Ratinaud, Marie-Hélène; Verdier, Mireille (2016): Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone 'ménage-à-trois'. In: *Cell Death & Disease* 7 (10), e2434-. DOI: 10.1038/cddis.2016.318.
- Jeuken, Judith; Sijben, Angelique; Alenda, Cristina; Rijntjes, Jos; Dekkers, Marieke; Boots-Sprenger, Sandra et al. (2009): Robust detection of EGFR copy number changes and EGFR variant III: technical aspects and relevance for glioma diagnostics. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 19 (4), S. 661–671. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2009.00320.x.
- Jiménez, C.; Portela, R. A.; Mellado, M.; Rodríguez-Frade, J. M.; Collard, J.; Serrano, A. et al. (2000): Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. In: *The Journal of Cell Biology* 151 (2), S. 249–262. DOI: 10.1083/jcb.151.2.249.
- Johansen, Maria Dinche; RoCHAT, Per; Law, Ian; Scheie, David; Poulsen, Hans Skovgaard; Muhic, Aida (2016): Presentation of Two Cases with Early Extracranial Metastases from Glioblastoma and Review of the Literature. In: *Case reports in oncological medicine* 2016, S. 8190950. DOI: 10.1155/2016/8190950.
- Jorissen, R. N.; Walker, F.; Pouliot, N.; Garrett, T. P.; Ward, C. W.; Burgess, A. W. (2003): Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. In: *Experimental cell research* 284 (1). DOI: 10.1016/s0014-4827(02)00098-8.
- Kang, Sohye; Bader, Andreas G.; Vogt, Peter K. (2005): Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (3), S. 802–807. DOI: 10.1073/pnas.0408864102.
- Kim, Betty Y. S.; Jiang, Wen; Beiko, Jason; Prabhu, Sujit S.; DeMonte, Franco; Gilbert, Mark R. et al. (2014): Diagnostic discrepancies in malignant astrocytoma due to limited small pathological tumor sample can be overcome by IDH1 testing. In: *Journal of neuro-oncology* 118 (2), S. 405–412. DOI: 10.1007/s11060-014-1451-0.
- Kirson, Eilon D.; Dbalý, Vladimír; Tovarys, Frantisek; Vymazal, Josef; Soustiel, Jean F.; Itzhaki, Aviran et al. (2007): Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (24), S. 10152–10157. DOI: 10.1073/pnas.0702916104.
- Kleihues, P.; Ohgaki, H. (1999): Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. In: *Neuro-Oncology* 1 (1), S. 44–51. DOI: 10.1093/neuonc/1.1.44.

- Kleihues, P.; Soylemezoglu, F.; Schäuble, B.; Scheithauer, B. W.; Burger, P. C. (1995): Histopathology, classification, and grading of gliomas. In: *Glia* 15 (3), S. 211–221. DOI: 10.1002/glia.440150303.
- Klempner, Samuel J.; Myers, Andrea P.; Cantley, Lewis C. (2013): What a tangled web we weave: emerging resistance mechanisms to inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway. In: *Cancer discovery* 3 (12), S. 1345–1354. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0063.
- Ko, Jae-Hong; Gu, Wanjun; Lim, Inja; Bang, Hyoweon; Ko, Eun A.; Zhou, Tong (2014): Ion channel gene expression in lung adenocarcinoma: potential role in prognosis and diagnosis. In: *PloS one* 9 (1), e86569. DOI: 10.1371/journal.pone.0086569.
- Ko, Jae-Hong; Ko, Eun A.; Gu, Wanjun; Lim, Inja; Bang, Hyoweon; Zhou, Tong (2013): Expression profiling of ion channel genes predicts clinical outcome in breast cancer. In: *Molecular cancer* 12 (1), S. 106. DOI: 10.1186/1476-4598-12-106.
- Koshy, Matthew; Villano, John L.; Dolecek, Therese A.; Howard, Andrew; Mahmood, Usama; Chmura, Steven J. et al. (2012): Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. In: *Journal of neuro-oncology* 107 (1), S. 207–212. DOI: 10.1007/s11060-011-0738-7.
- Koul, Dimpy (2008): PTEN signaling pathways in glioblastoma. In: *Cancer biology & therapy* 7 (9), S. 1321–1325. DOI: 10.4161/cbt.7.9.6954.
- Lange, Falko; Venus, Jakob; Shams Esfand Abady, Daria; Porath, Katrin; Einsle, Anne; Sellmann, Tina et al. (2022): Galvanotactic Migration of Glioblastoma and Brain Metastases Cells. In: *Life (Basel, Switzerland)* 12 (4). DOI: 10.3390/life12040580.
- Lee, Jeffrey C.; Vivanco, Igor; Beroukhi, Rameen; Huang, Julie H. Y.; Feng, Whei L.; DeBiasi, Ralph M. et al. (2006): Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. In: *PLoS medicine* 3 (12), e485. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030485.
- Lefranc, Florence; Brotchi, Jacques; Kiss, Robert (2005): Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (10), S. 2411–2422. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.089.
- Levin, Michael (2014): Molecular bioelectricity: how endogenous voltage potentials control cell behavior and instruct pattern regulation in vivo. In: *Molecular biology of the cell* 25 (24), S. 3835–3850. DOI: 10.1091/mbc.E13-12-0708.
- Levin, Michael; Martyniuk, Christopher J. (2018): The bioelectric code: An ancient computational medium for dynamic control of growth and form. In: *Bio Systems* 164, S. 76–93. DOI: 10.1016/j.biosystems.2017.08.009.
- Lewis, T. S.; Shapiro, P. S.; Ahn, N. G. (1998): Signal transduction through MAP kinase cascades. In: *Advances in cancer research* 74. DOI: 10.1016/s0065-230x(08)60765-4.
- Li, D.; Ambrogio, L.; Shimamura, T.; Kubo, S.; Takahashi, M.; Chirieac, L. R. et al. (2008): BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. In: *Oncogene* 27 (34), S. 4702–4711. DOI: 10.1038/onc.2008.109.
- Li, Fei; Chen, Tunan; Hu, Shengli; Lin, Jiangkai; Hu, Rong; Feng, Hua (2013): Superoxide mediates direct current electric field-induced directional migration of glioma cells through the activation of AKT and ERK. In: *PloS one* 8 (4), e61195. DOI: 10.1371/journal.pone.0061195.
- Li, Leanne; Hanahan, Douglas (2013): Hijacking the neuronal NMDAR signaling circuit to promote tumor growth and invasion. In: *Cell* 153 (1), S. 86–100. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.051.
- Liu, Gentao; Yuan, Xiangpeng; Zeng, Zhaohui; Tunici, Patrizia; Ng, Hiushan; Abdulkadir, Iman R. et al. (2006): Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. In: *Molecular cancer* 5, S. 67. DOI: 10.1186/1476-4598-5-67.
- Liu, Qian; Song, Bing (2014): Electric field regulated signaling pathways. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 55, S. 264–268. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.09.014.
- Loeb, Lawrence A. (2011): Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. In: *Nature reviews. Cancer* 11 (6), S. 450–457. DOI: 10.1038/nrc3063.
- Lombardi, M. Y.; Assem, M. (2017): Glioblastoma Genomics: A Very Complicated Story. DOI: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch1.

- LoPiccolo, Jaclyn; Blumenthal, Gideon M.; Bernstein, Wendy B.; Dennis, Phillip A. (2008): Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. In: *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 11 (1-2), S. 32–50. DOI: 10.1016/j.drug.2007.11.003.
- Lorenzo, Melvin F.; Arena, Christopher B.; Davalos, Rafael V. (2017): Glioblastoma. Maximizing Local Access to Therapeutic Deliveries in Glioblastoma. Part III: Irreversible Electroporation and High-Frequency Irreversible Electroporation for the Eradication of Glioblastoma. Hg. v. Steven de Vleeschouwer. Brisbane (AU). DOI: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch19
- Louis, David N.; Perry, Arie; Reifenberger, Guido; Deimling, Andreas von; Figarella-Branger, Dominique; Cavenee, Webster K. et al. (2016): The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. In: *Acta neuropathologica* 131 (6), S. 803–820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Lowery, Laura Anne; van Vactor, David (2009): The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (5), S. 332–343. DOI: 10.1038/nrm2679.
- Lyon, Johnathan G.; Carroll, Sheridan L.; Mokarram, Nassir; Bellamkonda, Ravi V. (2019): Electrotaxis of Glioblastoma and Medulloblastoma Spheroidal Aggregates. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 5309. DOI: 10.1038/s41598-019-41505-6.
- Malmström, Annika; Grønberg, Bjørn Henning; Marosi, Christine; Stupp, Roger; Frappaz, Didier; Schultz, Henrik et al. (2012): Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. In: *The Lancet. Oncology* 13 (9), S. 916–926. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70265-6.
- Mansouri, Alireza; Karamchandani, Jason; Das, Sunit (2017): Glioblastoma. Molecular Genetics of Secondary Glioblastoma. Hg. v. Steven de Vleeschouwer. Brisbane (AU). DOI: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch2
- McCaig, Colin D.; Rajnicek, Ann M.; Song, Bing; Zhao, Min (2005): Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. In: *Physiological reviews* 85 (3), S. 943–978. DOI: 10.1152/physrev.00020.2004.
- McCaig, Colin D.; Song, Bing; Rajnicek, Ann M. (2009): Electrical dimensions in cell science. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 23), S. 4267–4276. DOI: 10.1242/jcs.023564.
- McCormick, Barry; Chu, Julia Y.; Vermeren, Sonja (2019): Cross-talk between Rho GTPases and PI3K in the neutrophil. In: *Small GTPases* 10 (3), S. 187–195. DOI: 10.1080/21541248.2017.1304855.
- McLaughlin, Kelly A.; Levin, Michael (2017): Bioelectric Signaling in Regeneration: Mechanisms of Ionic Controls of Growth and Form. In: *Developmental biology* 433 (2), S. 177–189. DOI: 10.1016/j.ydbio.2017.08.032.
- Meng, Xiaoting; Arocena, Miguel; Penninger, Josef; Gage, Fred H.; Zhao, Min; Song, Bing (2011): PI3K mediated electrotaxis of embryonic and adult neural progenitor cells in the presence of growth factors. In: *Experimental neurology* 227 (1), S. 210–217. DOI: 10.1016/j.expneurol.2010.11.002.
- Messerli, Mark A.; Graham, David M. (2011): Extracellular electrical fields direct wound healing and regeneration. In: *The Biological bulletin* 221 (1), S. 79–92. DOI: 10.1086/BBLv221n1p79.
- Mullins, Christina Susanne (2013a): A Comprehensive Approach to Patient-individual Glioblastoma Multiforme Model Establishment. In: *J Cancer Sci Ther* 05 (12). DOI: 10.4172/1948-5956.1000237.
- Mullins, Christina Susanne; Schneider, Björn; Stockhammer, Florian; Krohn, Mathias; Classen, Carl Friedrich; Linnebacher, Michael (2013b): Establishment and characterization of primary glioblastoma cell lines from fresh and frozen material: a detailed comparison. In: *PLoS one* 8 (8), e71070. DOI: 10.1371/journal.pone.0071070.
- Munson, Jennifer M.; Bellamkonda, Ravi V.; Swartz, Melody A. (2013): Interstitial flow in a 3D microenvironment increases glioma invasion by a CXCR4-dependent mechanism. In: *Cancer research* 73 (5), S. 1536–1546. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2838.
- Mycielska, Maria E.; Djamgoz, Mustafa B. A. (2004): Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. In: *Journal of cell science* 117 (Pt 9), S. 1631–1639. DOI: 10.1242/jcs.01125.
- Nagane, M.; Coufal, F.; Lin, H.; Bögl, O.; Cavenee, W. K.; Huang, H. J. (1996): A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. In: *Cancer research* 56 (21), S. 5079–5086. PMID: 8895767

Narita, Yoshitaka; Nagane, Motoo; Mishima, Kazuhiko; Huang, H-J Su; Furnari, Frank B.; Cavenee, Webster K. (2002): Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. In: *Cancer research* 62 (22), S. 6764–6769. PMID: 12438278

Nevo, Ido; Woolard, Kevin; Cam, Maggie; Li, Aiguo; Webster, Joshua D.; Kotliarov, Yuri et al. (2014): Identification of molecular pathways facilitating glioma cell invasion in situ. In: *PLoS one* 9 (11), e111783. DOI: 10.1371/journal.pone.0111783.

Nicholas, M. Kelly; Lukas, Rimas V.; Jafri, Nazia F.; Faoro, Leonardo; Salgia, Ravi (2006): Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (24), S. 7261–7270. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0874.

Nishikawa, R.; Ji, X. D.; Harmon, R. C.; Lazar, C. S.; Gill, G. N.; Cavenee, W. K.; Huang, H. J. (1994): A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (16), S. 7727–7731. DOI: 10.1073/pnas.91.16.7727.

Nobusawa, Sumihito; Watanabe, Takuya; Kleihues, Paul; Ohgaki, Hiroko (2009): IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (19), S. 6002–6007. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0715.

Oh, Taemin; Ivan, Michael E.; Sun, Matthew Z.; Safaee, Michael; Fakurnejad, Shayan; Clark, Aaron J. et al. (2014): PI3K pathway inhibitors: potential prospects as adjuncts to vaccine immunotherapy for glioblastoma. In: *Immunotherapy* 6 (6), S. 737–753. DOI: 10.2217/imt.14.35.

Ohgaki, Hiroko; Dessen, Pierre; Jourde, Benjamin; Horstmann, Sonja; Nishikawa, Tomofumi; Di Patre, Pier-Luigi et al. (2004): Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. In: *Cancer research* 64 (19), S. 6892–6899. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337.

Ohgaki, Hiroko; Kleihues, Paul (2005): Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 64 (6), S. 479–489. DOI: 10.1093/jnen/64.6.479.

Ohgaki, Hiroko; Kleihues, Paul (2007): Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. In: *The American journal of pathology* 170 (5), S. 1445–1453. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070011.

Ohgaki, Hiroko; Kleihues, Paul (2013): The definition of primary and secondary glioblastoma. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (4), S. 764–772. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.

Onishi, Keisuke; Higuchi, Maiko; Asakura, Tomoko; Masuyama, Norihisa; Gotoh, Yukiko (2007): The PI3K-Akt pathway promotes microtubule stabilization in migrating fibroblasts. In: *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* 12 (4), S. 535–546. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2007.01071.x.

Ostrom, Quinn T.; Gittleman, Haley; Farah, Paul; Ondracek, Annie; Chen, Yanwen; Wolinsky, Yingli et al. (2013): CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. In: *Neuro-Oncology* 15 Suppl 2 (Suppl 2), ii1-56. DOI: 10.1093/neuonc/not151.

Ozes, O. N.; Mayo, L. D.; Gustin, J. A.; Pfeffer, S. R.; Pfeffer, L. M.; Donner, D. B. (1999): NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. In: *Nature* 401 (6748), S. 82–85. DOI: 10.1038/43466.

Pan, Peter C.; Magge, Rajiv S. (2020): Mechanisms of EGFR Resistance in Glioblastoma. In: *International journal of molecular sciences* 21 (22). DOI: 10.3390/ijms21228471.

Patel, Anoop P.; Tirosh, Itay; Trombetta, John J.; Shalek, Alex K.; Gillespie, Shawn M.; Wakimoto, Hiroaki et al. (2014): Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. In: *Science (New York, N.Y.)* 344 (6190), S. 1396–1401. DOI: 10.1126/science.1254257.

Paw, Ivy; Carpenter, Richard C.; Watabe, Kounosuke; Debinski, Waldemar; Lo, Hui-Wen (2015): Mechanisms regulating glioma invasion. In: *Cancer letters* 362 (1), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.03.015.

Payne, Samantha L.; Levin, Michael; Oudin, Madeleine J. (2019): Bioelectric Control of Metastasis in Solid Tumors. In: *Bioelectricity* 1 (3), S. 114–130. DOI: 10.1089/bioe.2019.0013.

Perrin, Sally L.; Samuel, Michael S.; Koszyca, Barbara; Brown, Michael P.; Ebert, Lisa M.; Oksdath, Mariana; Gomez, Guillermo A. (2019): Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. In: *Biochemical Society transactions* 47 (2), S. 625–638. DOI: 10.1042/BST20180444.

Perry, James; Okamoto, Masahiko; Guiou, Michael; Shirai, Katsuyuki; Errett, Allison; Chakravarti, Arnab (2012): Novel Therapies in Glioblastoma. In: *Neurology Research International* 2012. DOI: 10.1155/2012/428565.

Pietak, Alexis; Levin, Michael (2017): Bioelectric gene and reaction networks: computational modelling of genetic, biochemical and bioelectrical dynamics in pattern regulation. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 14 (134). DOI: 10.1098/rsif.2017.0425.

Pollard, Steven M.; Yoshikawa, Koichi; Clarke, Ian D.; Danovi, Davide; Stricker, Stefan; Russell, Roslin et al. (2009): Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. In: *Cell stem cell* 4 (6), S. 568–580. DOI: 10.1016/j.stem.2009.03.014.

Pu, Jin; McCaig, Colin D.; Cao, Lin; Zhao, Zhiqiang; Segall, Jeffrey E.; Zhao, Min (2007): EGF receptor signalling is essential for electric-field-directed migration of breast cancer cells. In: *Journal of cell science* 120 (Pt 19), S. 3395–3403. DOI: 10.1242/jcs.002774.

Ramnarain, Deepti B.; Park, Seongmi; Lee, Diana Y.; Hatanpaa, Kimmo J.; Scoggin, Shane O.; Otu, Hasan et al. (2006): Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. In: *Cancer research* 66 (2), S. 867–874. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2753.

Ridley, Anne J. (2006): Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. In: *Trends in cell biology* 16 (10), S. 522–529. DOI: 10.1016/j.tcb.2006.08.006.

Ridley, Anne J.; Schwartz, Martin A.; Burridge, Keith; Firtel, Richard A.; Ginsberg, Mark H.; Borisy, Gary et al. (2003): Cell migration: integrating signals from front to back. In: *Science (New York, N.Y.)* 302 (5651), S. 1704–1709. DOI: 10.1126/science.1092053.

Rohde, Marco; Ziebart, Josefin; Kirschstein, Timo; Sellmann, Tina; Porath, Katrin; Kühl, Friederike et al. (2019): Human Osteoblast Migration in DC Electrical Fields Depends on Store Operated Ca²⁺-Release and Is Correlated to Upregulation of Stretch-Activated TRPM7 Channels. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 7, S. 422. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00422.

Samuels, Yardena; Diaz, Luis A.; Schmidt-Kittler, Oleg; Cummins, Jordan M.; Delong, Laura; Cheong, Ian et al. (2005): Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. In: *Cancer cell* 7 (6), S. 561–573. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.05.014.

Sanai, Nader; Alvarez-Buylla, Arturo; Berger, Mitchel S. (2005): Neural stem cells and the origin of gliomas. In: *The New England journal of medicine* 353 (8), S. 811–822. DOI: 10.1056/NEJMra043666.

Sasaki, Atsuo T.; Chun, Cheryl; Takeda, Kosuke; Firtel, Richard A. (2004): Localized Ras signaling at the leading edge regulates PI3K, cell polarity, and directional cell movement. In: *The Journal of Cell Biology* 167 (3), S. 505–518. DOI: 10.1083/jcb.200406177.

Schrump, D. S.; Nguyen, D. M. (2001): The epidermal growth factor receptor-STAT pathway in esophageal cancer. In: *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 7 (2), S. 108–111. PMID: 11324763

Schwab, Albrecht; Fabian, Anke; Hanley, Peter J.; Stock, Christian (2012): Role of ion channels and transporters in cell migration. In: *Physiological reviews* 92 (4), S. 1865–1913. DOI: 10.1152/physrev.00018.2011.

Scott, C. B.; Nelson, J. S.; Farnan, N. C.; Curran, W. J.; Murray, K. J.; Fischbach, A. J. et al. (1995): Central pathology review in clinical trials for patients with malignant glioma. A Report of Radiation Therapy Oncology Group 83-02. In: *Cancer* 76 (2), S. 307–313. DOI: 10.1002/1097-0142(19950715)76:2<307::aid-cnrc2820760222>3.0.co;2-l.

Silvennoinen, O.; Schindler, C.; Schlessinger, J.; Levy, D. E. (1993): Ras-independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation. In: *Science (New York, N.Y.)* 261 (5129), S. 1736–1739. DOI: 10.1126/science.8378775.

Solca, Flavio; Dahl, Goeran; Zoepfel, Andreas; Bader, Gerd; Sanderson, Michael; Klein, Christian et al. (2012): Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 343 (2), S. 342–350. DOI: 10.1124/jpet.112.197756.

Song, Bing; Zhao, Min; Forrester, John; McCaig, Colin (2004): Nerve regeneration and wound healing are stimulated and directed by an endogenous electrical field in vivo. In: *Journal of cell science* 117 (Pt 20), S. 4681–4690. DOI: 10.1242/jcs.01341.

Sontheimer, Harald (2008): An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis. In: *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 233 (7), S. 779–791. DOI: 10.3181/0711-MR-308.

- Soroceanu, Liliana; Manning, Timothy J.; Sontheimer, Harald (1999): Modulation of Glioma Cell Migration and Invasion Using Cl⁻ and K⁺ Ion Channel Blockers. In: *The Journal of Neuroscience* 19 (14), S. 5942–5954. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-14-05942.1999.
- Sottoriva, Andrea; Spiteri, Inmaculada; Piccirillo, Sara G. M.; Touloumis, Anestis; Collins, V. Peter; Marioni, John C. et al. (2013): Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (10), S. 4009–4014. DOI: 10.1073/pnas.1219747110.
- Spiering, Désirée; Hodgson, Louis (2011): Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. In: *Cell adhesion & migration* 5 (2), S. 170–180. DOI: 10.4161/cam.5.2.14403.
- Stieber, Daniel; Golebiewska, Anna; Evers, Lisa; Lenkiewicz, Elizabeth; Brons, Nicolaas H. C.; Nicot, Nathalie et al. (2013): Glioblastomas are composed of genetically divergent clones with distinct tumorigenic potential and variable stem cell-associated phenotypes. In: *Acta neuropathologica* 127 (2), S. 203–219. DOI: 10.1007/s00401-013-1196-4.
- Stock, C.; Ludwig, F. T.; Hanley, P. J.; Schwab, A. (2013): Roles of ion transport in control of cell motility. In: *Comprehensive Physiology* 3 (1). DOI: 10.1002/cphy.c110056.
- Stokoe, D. (2001): PTEN. In: *Current biology: CB* 11 (13), R502. DOI: 10.1016/S0960-9822(01)00303-7.
- Stupp, Roger; Mason, Warren P.; van den Bent, Martin J.; Weller, Michael; Fisher, Barbara; Taphoorn, Martin J. B. et al. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. In: *The New England journal of medicine* 352 (10), S. 987–996. DOI: 10.1056/NEJMoa043330.
- Stupp, Roger; Taillibert, Sophie; Kanner, Andrew A.; Kesari, Santosh; Steinberg, David M.; Toms, Steven A. et al. (2015): Maintenance Therapy with Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. In: *JAMA* 314 (23), S. 2535–2543. DOI: 10.1001/jama.2015.16669.
- Sturm, Dominik; Bender, Sebastian; Jones, David T. W.; Lichter, Peter; Grill, Jacques; Becher, Oren et al. (2014): Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. In: *Nature reviews. Cancer* 14 (2), S. 92–107. DOI: 10.1038/nrc3655.
- Sun, Yung-Shin (2018): Direct-Current Electric Field Distribution in the Brain for Tumor Treating Field Applications: A Simulation Study. In: *Computational and mathematical methods in medicine* 2018, S. 3829768. DOI: 10.1155/2018/3829768.
- Sundelacruz, S.; Levin, M.; Kaplan, D. L. (2013): Depolarization alters phenotype, maintains plasticity of predifferentiated mesenchymal stem cells. In: *Tissue engineering. Part A* 19 (17-18). DOI: 10.1089/ten.tea.2012.0425.rev.
- Suvà, Mario L.; Tirosh, Itay (2019): Single-Cell RNA Sequencing in Cancer: Lessons Learned and Emerging Challenges. In: *Molecular cell* 75 (1), S. 7–12. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.05.003.
- Tabata, Hidenori; Sasaki, Megumi; Agetsuma, Masakazu; Sano, Hitomi; Hirota, Yuki; Miyajima, Michio et al. (2022): Erratic and blood vessel-guided migration of astrocyte progenitors in the cerebral cortex. In: *Nature communications* 13 (1), S. 6571. DOI: 10.1038/s41467-022-34184-x.
- Tamimi, Ahmad Faleh; Juweid, Malik (2017): Glioblastoma. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. Hg. v. Steven de Vleeschouwer. Brisbane (AU). DOI: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8
- Tamura, M.; Gu, J.; Matsumoto, K.; Aota, S.; Parsons, R.; Yamada, K. M. (1998): Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. In: *Science (New York, N.Y.)* 280 (5369), S. 1614–1617. DOI: 10.1126/science.280.5369.1614.
- Thakkar, Jigisha P.; Dolecek, Therese A.; Horbinski, Craig; Ostrom, Quinn T.; Lightner, Donita D.; Barnholtz-Sloan, Jill S.; Villano, John L. (2014): Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 23 (10), S. 1985–1996. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275.
- Thapa, Narendra; Chen, Mo; Horn, Hudson T.; Choi, Suyong; Wen, Tianmu; Anderson, Richard A. (2020): Phosphatidylinositol-3-OH kinase signalling is spatially organized at endosomal compartments by microtubule-associated protein 4. In: *Nature cell biology* 22 (11), S. 1357–1370. DOI: 10.1038/s41556-020-00596-4.
- Tohma, Y.; Gratas, C.; Biernat, W.; Peraud, A.; Fukuda, M.; Yonekawa, Y. et al. (1998): PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 57 (7), S. 684–689. DOI: 10.1097/00005072-199807000-00005.

- Tsai, Hsieh-Fu; Huang, Ching-Wen; Chang, Hui-Fang; Chen, Jeremy J. W.; Lee, Chau-Hwang; Cheng, Ji-Yen (2013): Evaluation of EGFR and RTK signaling in the electrotaxis of lung adenocarcinoma cells under direct-current electric field stimulation. In: *PLoS one* 8 (8), e73418. DOI: 10.1371/journal.pone.0073418.
- Tsai, Hsieh-Fu; IJspeert, Camilo; Shen, Amy Q. (2020): Voltage-gated ion channels mediate the electrotaxis of glioblastoma cells in a hybrid PMMA/PDMS microdevice. In: *APL bioengineering* 4 (3), S. 36102. DOI: 10.1063/5.0004893.
- Tsuji, Takanori; Ibaragi, Soichiro; Hu, Guo-fu (2009): Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. In: *Cancer research* 69 (18), S. 7135–7139. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1618.
- van den Bent, Martin J.; Gao, Ya; Kerkhof, Melissa; Kros, Johan M.; Gorlia, Thierry; van Zwieten, Kitty et al. (2015): Changes in the EGFR amplification and EGFRvIII expression between paired primary and recurrent glioblastomas. In: *Neuro-Oncology* 17 (7), S. 935–941. DOI: 10.1093/neuonc/nov013.
- van den Bent, Martin J.; Kros, Johan M. (2007): Predictive and prognostic markers in neuro-oncology. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 66 (12), S. 1074–1081. DOI: 10.1097/nen.0b013e31815c39f1.
- Vartanian, Alenoush; Singh, Sanjay K.; Agnihotri, Sameer; Jalali, Shahrzad; Burrell, Kelly; Aldape, Kenneth D.; Zadeh, Gelareh (2014): GBM's multifaceted landscape: highlighting regional and microenvironmental heterogeneity. In: *Neuro-Oncology* 16 (9), S. 1167–1175. DOI: 10.1093/neuonc/nou035.
- Verhaak, Roel G. W.; Hoadley, Katherine A.; Purdom, Elizabeth; Wang, Victoria; Qi, Yuan; Wilkerson, Matthew D. et al. (2010): Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. In: *Cancer cell* 17 (1), S. 98–110. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
- Vescovi, Angelo L.; Galli, Rossella; Reynolds, Brent A. (2006): Brain tumour stem cells. In: *Nature reviews. Cancer* 6 (6), S. 425–436. DOI: 10.1038/nrc1889.
- Vitorino, Philip; Meyer, Tobias (2008): Modular control of endothelial sheet migration. In: *Genes & Development* 22 (23), S. 3268–3281. DOI: 10.1101/gad.1725808.
- Vleeschouwer, Steven de (Hg.) (2017): *Glioblastoma*. Codon Publications. Brisbane (AU). ISBN-13: 978-0-9944381-2-6
- Vollmann-Zwerenz, Arabel; Leidgens, Verena; Feliciello, Giancarlo; Klein, Christoph A.; Hau, Peter (2020): Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. In: *International journal of molecular sciences* 21 (6). DOI: 10.3390/ijms21061932.
- Wang, Rong; Chadalavada, Kalyani; Wilshire, Jennifer; Kowalik, Urszula; Hovinga, Koos E.; Geber, Adam et al. (2010): Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. In: *Nature* 468 (7325), S. 829–833. DOI: 10.1038/nature09624.
- Wang, Rong; Gurguis, Christopher I.; Gu, Wanjun; Ko, Eun A.; Lim, Inja; Bang, Hyoweon et al. (2015): Ion channel gene expression predicts survival in glioma patients. In: *Scientific reports* 5, S. 11593. DOI: 10.1038/srep11593.
- Weller, Michael; Knobbe-Thomsen, Christiane B.; Le Rhun, Emilie; Reifenberger, Guido (2022): Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems 2021. In: *Onkologie* 28 (2), S. 155–163. DOI: 10.1007/s00761-021-01083-7.
- Wells, A. (1999): EGF receptor. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 31 (6), S. 637–643. DOI: 10.1016/s1357-2725(99)00015-1.
- Wernicke, A. Gabriella; Smith, Andrew W.; Taube, Shoshana; Mehta, Minesh P. (2016): Glioblastoma: Radiation treatment margins, how small is large enough? In: *Practical radiation oncology* 6 (5), S. 298–305. DOI: 10.1016/j.prr.2015.12.002.
- Wilson, Taylor A.; Karajannis, Matthias A.; Harter, David H. (2014): Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. In: *Surgical neurology international* 5, S. 64. DOI: 10.4103/2152-7806.132138.
- Wirtz, Denis; Konstantopoulos, Konstantinos; Searson, Peter C. (2011): The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. In: *Nature reviews. Cancer* 11 (7), S. 512–522. DOI: 10.1038/nrc3080.
- Wolf, Katarina; Friedl, Peter (2006): Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. In: *The British journal of dermatology* 154 Suppl 1, S. 11–15. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2006.07231.x.
- Wright, Stephen H. (2004): Generation of resting membrane potential. In: *Advances in physiology education* 28 (1-4), S. 139–142. DOI: 10.1152/advan.00029.2004.
- Wu, Dan; Ma, Xiuli; Lin, Francis (2013): DC electric fields direct breast cancer cell migration, induce EGFR polarization, and increase the intracellular level of calcium ions. In: *Cell biochemistry and biophysics* 67 (3), S. 1115–1125. DOI: 10.1007/s12013-013-9615-7.

- Xie, Qian; Mittal, Sandeep; Berens, Michael E. (2014): Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. In: *Neuro-Oncology* 16 (12), S. 1575–1584. DOI: 10.1093/neuonc/nou147.
- Yamaguchi, Hideki; Condeelis, John (2007): Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. In: *Biochimica et biophysica acta* 1773 (5), S. 642–652. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.07.001.
- Yang, Hsin-ya; La, Thi Dinh; Isseroff, R. Rivkah (2014): Utilizing custom-designed galvanotaxis chambers to study directional migration of prostate cells. In: *Journal of visualized experiments: JoVE* (94). DOI: 10.3791/51973.
- Yang, Ming; Brackenbury, William J. (2013): Membrane potential and cancer progression. In: *Frontiers in Physiology* 4, S. 185. DOI: 10.3389/fphys.2013.00185.
- Yao, Li; Shanley, Lynne; McCaig, Colin; Zhao, Min (2008): Small applied electric fields guide migration of hippocampal neurons. In: *Journal of cellular physiology* 216 (2), S. 527–535. DOI: 10.1002/jcp.21431.
- Yap, Jeremy L.; Worlikar, Shilpa; MacKerell, Alexander D.; Shapiro, Paul; Fletcher, Steven (2011): Small-molecule inhibitors of the ERK signaling pathway: Towards novel anticancer therapeutics. In: *ChemMedChem* 6 (1), S. 38–48. DOI: 10.1002/cmdc.201000354.
- Yap, Timothy A.; Gerlinger, Marco; Futreal, P. Andrew; Pusztai, Lajos; Swanton, Charles (2012): Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. In: *Science translational medicine* 4 (127), 127ps10. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003854.
- Yuan, Xiangpeng; Curtin, James; Xiong, Yizhi; Liu, Gentao; Waschmann-Hogiu, Sebastian; Farkas, Daniel L. et al. (2004): Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. In: *Oncogene* 23 (58), S. 9392–9400. DOI: 10.1038/sj.onc.1208311.
- Zhang, Xiang; Zhang, Wei; Cao, Wei-Dong; Cheng, Gang; Zhang, Yong-Qiang (2012): Glioblastoma multiforme: Molecular characterization and current treatment strategy (Review). In: *Experimental and therapeutic medicine* 3 (1), S. 9–14. DOI: 10.3892/etm.2011.367.
- Zhao, Huiping; Steiger, Amanda; Nohner, Mitch; Ye, Hui (2015): Specific Intensity Direct Current (DC) Electric Field Improves Neural Stem Cell Migration and Enhances Differentiation towards β III-Tubulin+ Neurons. In: *PloS one* 10 (6), e0129625. DOI: 10.1371/journal.pone.0129625.
- Zhao, Min (2009): Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration. In: *Seminars in cell & developmental biology* 20 (6), S. 674–682. DOI: 10.1016/j.semcdb.2008.12.009.
- Zhao, Min; Pu, Jin; Forrester, John V.; McCaig, Colin D. (2002): Membrane lipids, EGF receptors, and intracellular signals colocalize and are polarized in epithelial cells moving directionally in a physiological electric field. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (8), S. 857–859. DOI: 10.1096/fj.01-0811fje.
- Zhao, Min; Song, Bing; Pu, Jin; Wada, Teiji; Reid, Brian; Tai, Guangping et al. (2006): Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. In: *Nature* 442 (7101), S. 457–460. DOI: 10.1038/nature04925.

8. Anhang

8.1 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden.

Leopoldshöhe, den 10.05.2023

Daria Shams Esfand Abady

8.2 Lebenslauf

8.3 Vorabveröffentlichung der Dissertation

Teile dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Rostock in der folgenden Publikation veröffentlicht und 2021 in einem Poster für die 100. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft gezeigt:

Lange F, Venus J, **Shams Esfand Abady D**, Porath K, Einsle A, Sellmann T, Neubert V, Reichart G, Linnebacher M, Köhling R, Kirschstein T. Galvanotactic Migration of Glioblastoma and Brain Metastases Cells. *Life (Basel)*. 2022 Apr 14;12(4):580. doi: 10.3390/life12040580. PMID: 35455071; PMCID: PMC9027426.

8.4 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Köhling für die Möglichkeit, in einem so spannenden Themengebiet arbeiten zu können, bedanken. Zudem habe ich die Unterstützung des gesamten Teams der Physiologie bei dieser Arbeit sehr wertgeschätzt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Kirschstein, der mich in unzähligen Gesprächen auch weit über die Phase der Versuche begleitete und dabei jedem absurden Gedanken seine Aufmerksamkeit schenkte. Er unterstützte diese Arbeit durch jedwede Höhen und Tiefen und war stets zur Stelle, wenn fehlende Motivation mit Disziplin wettgemacht werden musste. Jedes Zoom-Meeting stellte eine neue Herausforderung dar, bei dem das weitere Vorgehen festgelegt wurde und übermütiger Perfektionismus an den unwichtigen Stellen im Keim erstickt werden musste.

Ein weiterer Mensch, ohne den diese Arbeit wohl gleich zu Beginn gescheitert wäre, ist Dipl.-Chem. Porath, die keine Mühen scheute, die Promotionsarbeit auch in Corona-Zeiten am Leben zu erhalten. Sie hat mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden und immer wieder dafür gesorgt, dass keine Langeweile bei der Auswertung aufkam, sondern immer ausreichend Nachschub zur Hand war. Auch dass die ein oder andere Excelwarnmeldung bezüglich „sämtlicher“ Formelbezüge oder die Anwendung von Statistikprogrammen mich nicht in den Wahnsinn getrieben haben, ist vor allem ihr Verdienst.

Auch Dr. Lange möchte ich vielmals danken, denn er hat dafür gesorgt, dass einige der Ergebnisse, schon vor der Fertigstellung dieser Arbeit, ihren Weg aus meinen Messwerttabellen fanden und so nicht nur als Plakat, sondern auch als Paper bereits zugänglich wurden. Außerdem hat er es geschafft immer wieder genau die richtigen Fragen zu stellen und hat so zwar häufig die Schwachstellen einiger Ideen beleuchtet, aber auch den Ehrgeiz in mir geweckt.

Sehr zu schätzen wusste ich ebenfalls die unermüdliche Unterstützung meiner Familie, die sich nun schon einige Zeit mein mehr oder weniger verständliches Gerede über alle möglichen Kleinigkeiten dieser Arbeit anhörte und immer wieder die ein oder andere Verzweiflungsträne trocknen musste. Hätten sie mir nicht den Rücken freigehalten, wäre ich wohl nicht nur verhungert, sondern hätte diese Arbeit niemals abgegeben.

Ein Dank geht auch an meine Freunde, die zahllose Stunden in der Unibibliothek mit mir verbrachten und mit Hilfe von Kaffee den Fortgang der Arbeit unterstützten. Ebenso danke ich denjenigen, die mir stets die Daumen drückten und ein offenes Ohr schenkten.

8.5 Abkürzungsverzeichnis

	Abkürzung	Bedeutung
	-	kein aktives Gleichstromfeld/positiv
	%	Prozent
	+	aktives Gleichstromfeld/negativ
	°C	Grad Celsius
	µm	Mikrometer
	µM	Mikromolar
A	Abb.	Abbildung
	AKT	Proteinkinase B
C	ca.	circa
	Ca ²⁺	Calciumion
	CHE	Schweiz
	CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D	DEU	Deutschland
	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (ein synthetisches Nährmedium)
	DMEM/F12	DMEM und Ham's F12 (ein synthetisches Nährmedium)
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DOCK 1	<i>dedicator of cytokinesis 1</i> (ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor)
	DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung nach Dulbecco
	Dr.	Doktor
E	EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
	EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
	EGFRvIII	Variante III des EGFR
	ErbB/HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i> , humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren
	ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i> (eine Serin/Threonin-Kinase)
G	<i>g</i>	Erdbeschleunigung
	GDP	Guanosindiphosphat
	Gl.	Gleichung
	GTP	Guanosintriphosphat
H	h	Stunden
	Ham's F12	<i>Ham's tissue culture medium</i> (ein synthetisches Nährmedium)
L	li	links
M	m	männlich
	M	Monate
	MEK	<i>mitogen activated/extracellular signal-activated kinase kinase</i> , mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen
	Mg ²⁺	Magnesiumion
	ml	Milliliter
	mm	Millimeter
	mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> (eine Serin/Threonin-Kinase)
	mTORC1/2	<i>mammalian target of rapamycin complex 1/2</i> (Proteinkomplexe)
N	NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> (ein spezifischer Transkriptionsfaktor)
	Nr.	Nummer

P	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
	PIP ₂	Phosphatdylinositol-4,5-bisphosphonat
	PIP ₃	Phosphatdylinositol-3,4,5-triphosphonat
	Prof.	Professor
	PTEN	Phosphatase und Tensin homologon
	px	Pixel
R	RAC1	<i>RAS related C3 botulinum toxin substrate 1</i> (eine RHO-GTPase)
	RAF	<i>rat fibrosarcom protein</i> (eine Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen)
	RAS	<i>rat sarcoma protein</i> (ein kleines Guanosin triphosphat-bindendes Protein)
	re	rechts
	RHO-GTPasen	<i>RAS homolog-GTPase</i> (eine Familie von kleinen Guanosin triphosphat-bindenden Proteinen)
S	s.	siehe
	SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
	SRC	Tyrosinproteinkinase SRC
	STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i> (Transkriptionsfaktoren)
T	Tab.	Tabelle
	TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i> (ein katalytischer Subkomplex der Telomerase)
	USA	<i>United States of America</i> , Vereinigte Staaten
W	w	weiblich
	WHO	<i>world health organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
Z	ZNS	zentrales Nervensystem

8.6 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Der EGF-Rezeptor und Ausschnitte aus seinen aktivierten Signalwegen, modifiziert nach Wells [Wells 1999]. EGFR induziert neben dem schwarz dargestellten PI3K/AKT-Signalweg auch den STAT-Signalweg und den RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg (grau dargestellt). In normalen Zellen dienen sie wachstumsfördernden Prozessen und der Migration. _____ 7
- Abb. 2: Möglicher Einfluss des elektrischen Gleichstromfeldes (rot). Ungeklärt war, ob in Glioblastomzellen und Metastasezellen unter Einfluss einer Gleichstromstimulation eine galvanotaktische Migration stattfinden würde und ob dieser eine Richtungsorientierung (Anode oder Kathode) zugeordnet werden könnte. Weiterführend stand die Auswirkungen eines EGFR-Inhibitors (Afinatinib) und eines AKT-Inhibitors (Capivasertib) auf die Zellreaktion auf das elektrische Feld offen, um möglicherweise Rückschlüsse auf die Relevanz des EGFR/PI3K/AKT-Signalweg ziehen zu können. _____ 13
- Abb. 3: Aufbau der Gleichstrom-Stimulationskammer in Anlehnung an Rohde [Rohde 2019]. _____ 17
- Abb. 4: Mikroskopische Aufnahme der Glioblastomzellen zum Zeitpunkt t_1 (09.09.2022, HROG 17, Zellkasten 05, Bild Nr. 6). 20
- Abb. 5: Überlagerung zum Zeitpunkt t_1 und t_2 mit Umkreisung und eingezeichnetem Mittelpunkt der Zelle 4 (09.09.2022, HROG 17, Zellkasten 05, Bild Nr. 6). _____ 20
- Abb. 6: Migration von Glioblastomzellen (HROG 02, HROG 05, HROG 15, HROG 17, HROG 24) nach 6 h im elektrischen Gleichstromfeld (rot) und der Kontrollgruppe (schwarz) als Einzelzellen (a-e) und als Summenvektor (f-j) im Verhältnis zur Position zu Beginn (t_1). (Positive X-Werte implizieren eine Wanderung zur Anode.) _____ 23
- Abb. 7: Geschwindigkeit der Glioblastom-Zelllinien (HROG 02, HROG 05, HROG 15, HROG 17, HROG 24) mit (rot) und ohne (schwarz) Gleichstromfeld, dargestellt als Mittelwert \pm SD. $^{**}p \leq 0.01$ $^{***}p \leq 0.001$ (Mann-Whitney U-Test). _____ 24
- Abb. 8: Effekt des Gleichstromfeldes (rot) auf die Polorientierung der Migration von Glioblastom-Zelllinien (HROG 02, HROG 05, HROG 15, HROG 17, HROG 24) im Vergleich zur unbeeinflussten Kontrollgruppe (schwarz) (a). (Positive X-Werte implizieren eine Wanderung zur Anode.) Im Gegensatz dazu die ungerichtete Wanderung in Y-Richtung (b). $^{**}p \leq 0.01$ $^{***}p \leq 0.001$ (Mann-Whitney U-Test). Weiterhin dargestellt sind der Median (graue Linie), Mittelwert (gestrichelte Linie) und die Nulllinie (grau) als Ursprungsstartpunkt der Zellen sowie das 10 % und 90 % Quantil. _____ 25
- Abb. 9: Migration von Metastasezellen im Gehirn aus einem Colonkarzinom (HROBMC 01) und einem Lungenkarzinom (HROBML 01) nach 6 h im elektrischen Gleichstromfeld (rot) und der Kontrollgruppe (schwarz) als Einzelzellen (a, b) und als Summenvektor (c, d) im Verhältnis zur Position zu Beginn (t_1). (Positive X-Werte implizieren die Wanderung zur Anode.) Die Geschwindigkeit der beiden Metastase-Zelllinien (HROBMC 01, HROBML 01) mit Gleichstromfeld (rot) und als Kontrollgruppe (schwarz), dargestellt als Mittelwert \pm SD (e). Man beachte die veränderten Maßstäbe in allen Grafiken. _____ 27
- Abb. 10: Effekt des Gleichstromfeldes (rot) auf die Polorientierung der Migration der Metastasezellen (HROBMC 01 und HROBML 01) im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarz) (a). (Positive X-Werte implizieren eine Wanderung zur Anode.) Im Gegensatz dazu gezeigt, die ungerichtete Wanderung in Y-Richtung (b). $^{*}p \leq 0.05$ (Mann-Whitney U-Test). Weiterhin sind der Median (graue Linie), Mittelwert (gestrichelte Linie), die Nulllinie (grau) als Ursprungsstartpunkt der Zellen sowie das 10 % und 90 % Quantil dargestellt. Man beachte die Veränderung der Maßstäbe in allen Grafiken. _____ 28
- Abb. 11: Durchschnittliche Migration von Glioblastomzellen (a) und Metastasezellen (b) als Summenvektoren und Geschwindigkeit (c), dargestellt als Mittelwert \pm SD nach 6 h im elektrischen Gleichstromfeld (rot) und der Kontrollgruppe (schwarz) im Verhältnis zur Position zu Beginn (t_1). (Positive X-Werte implizieren die Wanderung zur Anode.) Im Vergleich zur Kontrollgruppe $^{***}p \leq 0.001$ und zwischen Glioblastom und Metastase $^{***}p \leq 0.001$ (Mann-Whitney U-Test). _____ 29
- Abb. 12: Vergleich des durchschnittlichen Effekts des Gleichstromfeldes (rot) auf die Polorientierung der Migration der Glioblastom-Zelllinien und Metastase-Zelllinien auch im Verhältnis zur jeweiligen Kontrollgruppe (schwarz) (a). (Positive X-Werte implizierten eine Wanderung zur Anode.) Im Gegensatz dazu steht die ungerichtete Wanderung in Y-Richtung (b). Im Vergleich zur Kontrollgruppe $^{**}p \leq 0.01$ $^{***}p \leq 0.001$ und im Vergleich von Glioblastom und Metastase $^{***}p \leq 0.001$ (Mann-Whitney U-Test). Weiterhin sind der Median (graue Linie), Mittelwert (gestrichelte Linie), die Nulllinie (grau) als Ursprungsstartpunkt der Zellen sowie das 10 % und 90 % Quantil dargestellt. _____ 31
- Abb. 13: Migration von Glioblastom-Zelllinien (HROG 02, HROG 15, HROG 17) nach 6 h im elektrischen Gleichstromfeld (rot) und der Kontrollgruppe, ohne elektrisches Feld (schwarz) unter Behandlung mit DMSO als Kontrollgruppe (gestrichelte Linien) und unter Afinatinib (a, c, e) und Capivasertib (b, d, f) im Verhältnis zur Position zu Beginn (t_1) als Summenvektor. (Positive X-Werte implizieren eine Wanderung zur Anode.) _____ 33
- Abb. 14: Effekt von Afinatinib und Capivasertib auf die galvanotaktische Migrationsgeschwindigkeit mit (rot) und ohne (schwarz) elektrisches Gleichstromfeld von HROG 02 (a), HROG 15 (b) und HROG 17 (c). Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Gleichstromfeld $^{*}p \leq 0.05$ $^{**}p \leq 0.01$ und im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DMSO $^{*}p \leq 0.05$ (Mann-Whitney U-Test). _____ 34

Abb. 15: Effekt von Afatinib und Capiasertib auf die Polarorientierung der galvanotaktischen Migration im Gleichstromfeld (rot) und ohne (schwarz) von HROG 02 (a), HROG 15 (b) und HROG 17 (c) dargestellt als Mittelwert \pm STABW. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Gleichstromfeld * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$ und im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DMSO ° $p \leq 0.05$ °° $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney U-Test). (Positive X-Werte implizieren eine Wanderung zur Anode.) Weiterhin wird der Median (graue Linie), Mittelwert (gestrichelte Linie) die Nulllinie (grau) als Ursprungsstartpunkt der Zellen sowie das 10 % und 90 % Quantil dargestellt. _____ 36

Abb. 16: Einfluss der elektrischen Gleichstromstimulation auf unsere Glioblastomzellen. Ausschnitt aus dem scheinbar relevanten EGF-Rezeptor und PI3K/AKT-Signalwegen mit den Angriffsorten der Inhibitoren Afatinib und Capiasertib. Es stellt in rot den Einfluss des elektrischen Feldes auf die Migration in unseren Ergebnissen, in Abhängigkeit der Signifikanz (je größer die Linienstärke dargestellt ist, desto niedriger war der p-Wert) dar. _____ 38

Abb. 17: Zentrale Rolle des EGF-Rezeptors und des PI3K/AKT-Signalweges für die galvanotaktische Migration unserer Glioblastomzellen durch elektrische Gleichstromstimulation (rot) mit möglichen Ansatzpunkten in dieser Aktivierung für weitere Forschungen. _____ 48

8.7 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Lösungen, Puffer und Medien zur Behandlung humaner Zellen _____	14
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien _____	14
Tab. 3: Geräte und ihre Software _____	14
Tab. 4: Software _____	15
Tab. 5: Übersicht der Patientendaten. _____	15
Tab. 6: Ausschnitt der Tabelle vom 09.09.2020, HROG 17, Zellkasten 05, zu Bild Nr.6. _____	21