

Lebendzellaufnahmen mit einem aufrechten Lichtmikroskop zur Detektion von physiologischen oder tumorösen Zellvorgängen und deren Interaktion mit Bestrahlung und Medikamenten

Der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades Dr. med.
vorgelegt von
Jennifer Vu

Als Dissertation genehmigt
von der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2024

Vorsitzender des Promotionsorgans: Prof. Dr. med. Markus Neurath

Gutachter/in: Prof. Dr. med. Rainer Fietkau

Gutachter/in: PD Dr. med. Philip Hölter

Für meine Familie und Freunde,
die mich immer unterstützt haben

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1.1 Hintergrund und Ziele.....	1
1.2 Materialien und Methoden	1
1.3 Ergebnisse	2
1.4 Schlussfolgerung.....	3
2. Summary	4
2.1 Background and aims.....	4
2.2 Methods.....	4
2.3 Results.....	5
2.4 Conclusions	5
3. Einleitung	7
3.1 Entwicklung des Mikroskops	7
3.2 Lebendzellaufnahmen	8
3.3 Zell-in-Zell Ereignisse.....	8
3.4 Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC).....	9
3.5 Glioblastom	9
3.6 Ziele dieser Arbeit.....	10
4. Materialien und Methoden	11
4.1 Kamera, Mikroskop und Software	11
4.1.1 Leica DM6000B.....	11
4.1.2 Inkubationssystem.....	12
4.1.3 Verwendete Softwares für Analyse und Auswertung	14
4.2 Microfluidic Chips.....	15
4.3 Zellreihen.....	16

4.3.1	BEAS-2B	16
4.3.2	A549	16
4.3.3	U251	17
4.4	Medikamente	17
4.4.1	Crizotinib	17
4.4.2	Alectinib	17
4.4.3	Perampanel	17
4.5	Verwendete Farbstoffe	18
4.5.1	Phototoxizität und Photobleaching	19
4.6	Zellkulturverfahren	21
4.6.1	Kultivieren von Zellen	21
4.6.2	Bestimmung der Zellzahl	21
4.7	Detektion von Zell in Zell Ereignissen	22
4.7.1	Hintergrund	22
4.7.2	Versuchsaufbau	22
4.7.3	Auswertung	23
4.8	Interaktion Tumorzelle mit Bestrahlung und Medikament	23
4.8.1	BEAS-2B/A549 + Alectinib und Crizotinib im Vergleich	23
4.8.1.1	Hintergrund	23
4.8.1.2	Versuchsaufbau	24
4.8.1.3	Auswertung	25
4.8.2	U251 + Perampanel	27
4.8.2.1	Hintergrund	27
4.8.2.2	Versuchsaufbau	27
4.8.2.3	Auswertung	28
5.	Ergebnisse	30

Zusammenfassung

5.1	Detektion von Zell in Zell (CiC) Ereignissen	30
5.2	BEAS/A549 + Alec/Crizo	32
5.3	U251 + Perampanel.....	40
6.	Diskussion	44
7.	Literaturverzeichnis	48
8.	Abkürzungsverzeichnis	56
9.	Abbildungsverzeichnis	57
10.	Tabellenverzeichnis	58
10.1	Zelllinien	59
10.2	Zellkulturmedien.....	59
10.3	Zusammensetzung verwendeter Lösungen.....	60
10.4	Medikamente	60
10.5	Medien, Farbstoffe und Reagenzien	61
10.6	Verbrauchsmaterial.....	62
10.7	Geräte.....	63
11.	Danksagung	64
12.	Lebenslauf	65

1. Zusammenfassung

1.1 Hintergrund und Ziele

Bestrahlung hat eine große Auswirkung auf unseren Körper. Bereits nach Millisekunden verursacht sie eine Stresswirkung auf unser Endothel. Bei längerer Exposition von Strahlung kann es zu einer Dysfunktion bis hin zum Zelluntergang kommen (Baselet *et al.*, 2019). Diese Wirkung trifft nicht nur gesunde Zellen, sondern auch auf entartete Zellen zu. Dafür verantwortlich sind Defekte in der DNA-Reparatur (Xu *et al.*, 2015), welche aber auch gleichzeitig der Grund für Resistenzen gegen bestimmte Medikamente sind (Huang and Zhou, 2020). Viele Behandlungen gegen Krebs beinhalten bereits Bestrahlung in der Therapie. Nachgewiesen wurde zudem auch das Zusammenspiel zwischen Bestrahlung und gleichzeitiger Gabe von bestimmten Medikamenten, welche Tumorresistenzen gezielt angreifen, wie z.B. in der Therapie von Tyrosinkinase Inhibitoren (TKI) -resistenten NSCLC (Zhuang, 2018). Durch den gemeinsamen Effekt kommt es zur gegenseitigen Verstärkung, was sich positiv auf den Krankheitsverlauf des Patienten ausüben kann. Aber auch andere zelluläre Vorgänge scheinen das Tumorfortschreiten zu beeinflussen. So wurde bereits 2007 der Begriff ‚Entose‘ (Overholtzer *et al.*, 2007) beschrieben und 2015 erklärte die Arbeitsgruppe von Schwegler aus Erlangen einen Zusammenhang zwischen nicht professioneller Phagozytose und der Prognose der Erkrankung (Schwegler, Wirsing, Dollinger, *et al.*, 2015; Schwegler, Wirsing, Schenker, *et al.*, 2015).

Lebendzellaufnahmen sind daher perfekt dafür geeignet, um kleinste Veränderungen und Vorgänge im zeitlichen Ablauf von physiologischen oder Tumorzellen bei Gabe von Medikamenten mit gleichzeitiger Bestrahlung zu detektieren.

1.2 Materialien und Methoden

Drei verschiedene Versuchsreihen wurden durchgeführt, um diese Methode zu verifizieren. Die untersuchten Zellen, je nach Versuchsreihe entweder BEAS-2B, A549 oder U251, wurden in T25 Kulturflaschen angesät. Die benötigte Zellanzahl ($6 - 8 \times 10^5$ Z/ml) entsprach etwa einer 80 % Bewachsung der Flasche. Bei einer ausreichenden Zellanzahl wurde das Medium auf 10 ml reduziert und mit 25 nM Tetramethylrhodamine versetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 45 min inkubiert. Danach wurde das Medium mit FluoroBrite™ DMEM ausgetauscht und die Fluoreszenzfarbstoffe DRAQ7 und CellEvent Caspase 3/7 mit den Konzentrationen von 3 µM und 10 µM dazugegeben und zusätzlich auch 10 mM von Good's Puffer HEPES. Die Zellsuspension wurde geteilt

und bei den Versuchen mit Medikamenten wurde einem Teil 1 μM TKI oder Perampanel hinzugefügt. Dann wurde die Suspension auf zwei Rhombic Chamber Microfluidic Chips aufgeteilt und in das Mikroskop eingespannt. Nach 3 Stunden wurde einer der Chips mit 2 Gy durch einen ISOVOLT Titan Röntgengerät bestrahlt. Das Leica DM6000B zeichnete alle 20 min (Zell-in-Zell Ereignisse) oder 45 min (Versuchsreihe mit Medikamenten) mit verschiedenen Beleuchtungen (DIC und Fluoreszenz) und unterschiedlicher Wellenlängen über einen Zeitraum von drei Tagen Aufnahmen auf. Für die Lebendzellaufnahmen wurde das Mikroskop in ein Inkubationssystem umgebaut. Vier verschiedene Positionen wurden je einer Kondition zugeordnet. Jede Versuchsreihe wurde mindestens 3-mal wiederholt. Die Bildauswertung wurde mit Biomas Software durchgeführt, wobei der Hintergrund abgezogen wurde, um das Rauschen im Bild zu minimieren und die Fluoreszenzfarbe zu verstärken. Die verschiedenen Farbstoff-Intensitäten wurden gemessen und anschließend in eine Excel-Tabelle als zeitlich aufgelöste Daten eingefügt und mit GraphPad Prism9 ausgewertet.

1.3 Ergebnisse

Bei den Versuchen mit der Zellreihe BEAS-2B zur Detektion von Zell-in-Zell (CiC) Ereignissen konnten wir bei jedem Durchgang in fast allen Positionen des Microfluidic Chips mindestens eine, wenn nicht sogar mehrere, nicht professionelle Phagozytosen beobachten. Die nekrotischen Zellen ließen sich mittels Fluoreszenzfarbstoffen gut von den lebenden unterscheiden. Ebenso konnte man die Zelllyse, welche mit Farbstoffverlust der Zelle einherging, zeitlich und bildlich erfassen.

Die Lebendzellaufnahmen der Versuchsreihe BEAS-2B/A549 mit Behandlung von 1 μM Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) Alectinib/ Crizotinib zeigte keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien oder TKIs. Lediglich Crizotinib bewirkte bei den physiologischen Lungenepithelzellen eine etwas stärker ausgefallene Apoptose. Bei den Zellen malignen Ursprungs konnte dies nicht beobachtet werden, was auf blockierte oder unzureichende Apoptose-Signalwege der A549 Zellen deuten könnte. Insgesamt gaben diese Experimente Aufschlüsse darüber, dass bei einer Konzentration von 1 μM beider TKIs keine relevante Toxizität besteht. Auch durch verstärkte Bestrahlung konnte keine erhöhte Toxizität im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Die Glioblastomzellen mit negativer Mutation von Isocitratdehydrogenase-1- oder -2-Gen (IDH) oder negativer Translokation des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) -Gens reagierten bei Behandlung mit Perampanel und gleichzeitiger ionisierender Strahlung nur mit Verlangsamung des Wachstums. Diese Versuchsreihe

zeigte uns, dass das Medikament in dieser Konzentration nicht toxisch war und das bereits bestehende Wissen über die Korrelation des Glutamat Rezeptor mit der Progreienz des Tumors bestätigt. Zum einen wurde dies durch bildmorphologische Beweise dargestellt, zum anderen durch die fehlende Steigerung der, sich eher konstant verhaltende Mitochondrienaktivität.

1.4 Schlussfolgerung

Mit unserer Methode der Lebendzellmikroskopie konnten wir einige Vor- und Nachteile ausmachen. Bildaufnahmen auf zellulärer Ebene für einen Zeitraum von ca. drei bis fünf Tagen lassen sich bildmorphologisch sehr gut darstellen und auswerten. Somit ist diese Vorgehensweise optimal für Aufzeichnungen von Zellprozessen wie z.B. Ca²⁺-Ereignissen. Sie können als zusätzliche Ergebnisse zu bestehenden Studien dienen. Für Aufnahmen, welche länger als fünf Tage dauern, wird jedoch ein anderes Behältnis für die Untersuchung der Zellen benötigt. Dies könnte daran liegen, dass mit unseren gewählten Microfluidic Chips die Zellen beim Wechseln des Mediums durch zu hohen Druck oder Scherkräfte zugrunde gehen könnten. Zudem limitieren allgemein die Effekte des Photobleaching und der Phototoxizität die Möglichkeit längerer Aufnahmen (Diaspro *et al.*, 2006; Icha *et al.*, 2017).

2. Summary

2.1 Background and aims

Radiation has a huge impact on our body. Already after milliseconds it is stressing the endothelial cells. With longer expositions they can end in dysfunction or even cell death. Not only healthy cells but also abnormal ones will sense the impact. In particular tumor cells will notice the effect, because of the damage of their DNA repairing system (Xu *et al.*, 2015). That is on the other hand also the reason why there are many drug-resistances (Huang and Zhou, 2020). A lot of therapies already included radiation to their schedule. The proved correlation of gain, while using radiation in combination with drugs, is used for example in the therapy of tyrosinkinase inhibitor (TKI) -resistant NSCLC (Zhuang, 2018). However, other cellular processes also appear to influence tumor progression. The term 'entosis' (Overholtzer *et al.*, 2007) was already described in 2007 and in 2015 Schwegler's working group from Erlangen questioned a connection between non-professional phagocytosis and the prognosis of the disease (Schwegler, Wirsing, Dollinger, *et al.*, 2015; Schwegler, Wirsing, Schenker, *et al.*, 2015). Therefore, Live Cell Imaging is perfect for detecting even the smallest change while the cells are interacting with each other or drugs and radiation.

2.2 Methods

Three different test series were accomplished to verify the method. Cells were seeded into T25 flasks. The calculated number of required cells ($6 - 8 \times 10^5$ cells/mL) correlated with approximately 80 % coverage of the flask's surface. After reaching the adequate cell number, the medium was reduced to 10 mL and the cells were incubated for 45 min with 25 nM Tetramethylrhodamine at 37 °C and 5 % CO₂. Subsequently, the medium was changed to FluoroBrite™ DMEM and the fluorescent stains DRAQ7 and CellEvent Caspase 3/7 were added with the concentration of 3 μM and 10 μM. Furthermore, 10 mM of Good's Buffer HEPES was added. The mixture of cells and stain was split. If needed the mixture was added with 1 μM tyrosinkinase inhibitor (TKI) to one part. After that it was divided into two Rhombic Chamber microfluidic chips, which were then inserted under the microscope. After 3 hours one of the chips was irradiated with 2 Gy by an ISOVOLT Titan X-ray generator. A Leica DM6000B recorded the images every 20 (Cell-in-Cell) or 45 min (drug experiments) for 3 days with differing wavelengths per each staining. For live cell imaging, the microscope was transformed into an incubating system. Four different positions were attributed to every condition. 30-

Summary

50 individual cells were analyzed within one position. Each experiment was repeated at least 3 times. The imaging analyses was performed with Biomas Software, where the background noise was then reduced, thus allowing the fluorescent color to intensify. The intensity of the different stains was inserted into data tables where Microsoft Excel and GraphPad Prism9 were then used for data evaluation.

2.3 Results

In the experiments with the BEAS-2B cell series for the detection of Cell-in-Cell (CiC) events, we were able to observe at least one, if not several, non-professional phagocytosis in almost all positions of the microfluidic chip in each run. The necrotic cells could easily be distinguished from the living ones using fluorescent dyes. It was also possible to record the lysis, which was accompanied by the loss of dye in the cell, in terms of time and images.

Live Cell Imaging from the experiments with BEAS-2B/A549, which were treated with 1 μ M TKI alectinib/crizotinib, showed no relevant differences between the two cell lines or treatment with both TKIs. Only crizotinib caused some stronger apoptosis in the physiological lung epithelial cells. This could not be observed in the cells of malignant origin, which could indicate blocked or insufficient apoptosis signaling pathways of the A549 cells. Overall, these experiments provided information that at a concentration of 1 μ M both TKIs have no relevant toxicity. This was also not increased by additional radiation.

Glioblastoma cells with a negative mutation of Isocitratdehydrogenase-1- or -2-gene (IDH) or a negative translocation of the MGMT (O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase) gene reacted to treatment with perampanel and simultaneous ionizing radiation only by slowing down their growth. This series of experiments showed us that the drug was not toxic at this concentration and confirmed what was already known about the correlation of the glutamate receptor with tumor progression. On one hand, this was illustrated by image morphological evidence, as well as by the lack of an increase in mitochondrial activity, which was rather constant.

2.4 Conclusions

With our method of live cell imaging, we were able to identify some advantages and disadvantages. Image recordings at cellular level for a period of approximately three to five days can be displayed and evaluated very well in terms of image morphology. This procedure is therefore ideal for recording cell processes such as CiC. They can

Summary

serve as additional results to existing studies. However, for recordings longer than five days, a different container for the examined cells is required. With our chosen microfluidic chip, the cells perish when changing the medium due to high pressure or shear forces. In addition, the effects of photobleaching and phototoxicity limit the possibility of longer exposures (Diaspro *et al.*, 2006; Icha *et al.*, 2017).

3. Einleitung

3.1 Entwicklung des Mikroskops

Die Entstehung des Mikroskops hat ihren Ursprung um ca. 100 v.Chr. Damals benutzten bereits die Römer geschliffenes Glas als Lupen oder Brenngläser (Gerabek, 2005). Ende des 16. Jhd. gelang es den holländischen Brillenmachern Hans und Zacharias Janssen, das erste Mikroskop zu bauen. Zwei Linsen wurden jeweils am Anfang und Ende in einer länglichen Röhre befestigt. Dieses Konstrukt vergrößerte ein Objekt zwischen 3- bis 9-fach (Fournier, 1996). Jedoch waren die damaligen Fertigkeiten zur Herstellung einer Linse noch nicht ausgereift und es kam nicht selten vor, dass das mikroskopierte Bild oft verzerrt und fehlerhaft war (Mißfeld, no date). Robert Hooke, ein Forscher der Mikroskopie, verbesserte schließlich 1665 das Verfahren und baute das erste Auflichtmikroskop. In den folgenden Jahren danach fertigte er die ersten maßstabgetreuen Zeichnungen von diversen Pflanzen und Tieren z.B. Laus, Floh und Mücke (Fournier, 1996; Gerabek, 2005). Beim Mikroskopieren von Kork bemerkte er ‚leere Boxen‘, welche er als Zellen bezeichnete und legte damit die Grundlage für die heutige Zellenlehre (Joachim Herz Stiftung, no date). Ca. 1670 gelang schließlich Anton van Leeuwenhoek die Herstellung von 1 mm dünnen Linsen. Er fand auch heraus, dass je stärker die Krümmung der Linse, umso stärker die Vergrößerungen des Objektes waren (Gerlach, 2009). Mit Hilfe eines zusätzlichen Wassertropfens gelang es ihm, Objekte mit einer Vergrößerung von 200-fach darzustellen. Die ersten Bilder und Aufzeichnungen von nicht nur toten, sondern auch lebenden Bakterien oder Kleinstlebewesen wurden aufgenommen (Gerlach, 2009; Joachim Herz Stiftung, no date; Zeiss, no date). Ein Physiker namens Ernst Abbe stellte 1863 fest, dass man mittels Lichtmikroskopie nur einen minimalen Objektabstand von 0,25 µm darstellen kann. Man nennt dies auch das Abbe Limit (Rebohm, 2017). Mit Hilfe von UV-Licht kann man jedoch kleinere Abstände darstellen, was schließlich August Köhler, ein Forscher bei Carl Zeiss, entdeckte und entwickelte. 1893 baute dieser anschließend das erste Mikroskop mit einer UV-Lampe als Lichtquelle (Zeiss, no date). Mit dem 20. Jhd. kamen folgende Erfindungen hinzu (Van Helden, 2010):

- 1904 Ultraviolett Mikroskop
- 1908 Fluoreszenz Mikroskop
- 1930 Phasenkontrast Mikroskop
- 1931 Elektronenmikroskop

- 1942 Laser-Scan Mikroskop
- 1978 Konfokal Mikroskop

Aufgrund der neuen Mikroskope explodierte die Forschung im Bereich Medizin Anfang des 20. Jahrhunderts bis zum heutigen Zeitpunkt. Wir dürfen uns in den nächsten Jahren weiterhin auf bahnbrechende Erfindungen freuen.

3.2 Lebendzellaufnahmen

Bereits Mitte des 20. Jhd. hat es erste Nachforschungen hinsichtlich Zelldarstellung auf kleinster Ebene mit Fluoreszenz gegeben. Ab Anfang des 21. Jhd. gab es immer mehr Interesse an Lebendzellmikroskopie. Erkennbar ist dies beispielsweise an der Anzahl von Veröffentlichungen, beispielsweise auf Pubmed. Siehe Schlagwort ‚Live Cell Imaging‘: Jahr: 2000 – 73 veröffentlichte Arbeiten, 2010 – 877, 2020 – 2054 (PubMed, no date). Durch die wachsende Bedeutung hat sich in den letzten Jahren einiges in der Lebendzellmikroskopie getan. Viele verschiedene fortschrittliche Techniken zur Bildgebung lebender Zellen wurden entwickelt. Ein großer Vorteil gegenüber dem klassischen Färben von statischen Zellschnitten mit Immunofluoreszenz-Farbstoffen ist, dass man Zellprozesse in Zeitraffer Aufnahmen genauestens untersuchen kann. Doch es gibt dabei viele Faktoren zu beachten und nicht selten sind solche Verfahren sehr kostspielig. So ist die Auswahl des richtigen Kamerasystems, sei es Konfokal oder Lichtmikroskopie, bis hin zur Aufrechterhaltung der Zellgesundheit letztlich entscheidend für die Bildqualität (Cole, 2014).

3.3 Zell-in-Zell Ereignisse

Overholtzer definierte im Jahr 2007 den Begriff der ‚Entose‘ (Overholtzer *et al.*, 2007). Dieser Terminus beschreibt ein nicht-apoptotisches Zelltodprogramm für in Matrix-abgelöste Zellen, das durch einen zuvor unerkannten und ungewöhnlichen Prozess initiiert wird. Dabei dringt eine lebende in eine andere vitale Zelle und baut diese mit lysosomalen Enzymen ab. Der umgekehrte Mechanismus, dass nekrotische Zellen von lebenden Zellen phagozytiert und danach eliminiert werden, wird als Zell-in-Zell (CiC) Ereignis definiert (Schwegler, Wirsing, Dollinger, *et al.*, 2015). Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe gab Aufschluss über den Mechanismus der Beseitigung nekrotischer Zellen durch Tumorzellen und normale Fibroblasten der Haut *in vitro*. Es ist davon auszugehen, dass diesen Vorgängen eine wichtige Rolle bei Entzündungen und Autoimmunerkrankungen im Normalgewebe, sowie bei Tumoren hinsichtlich der Infiltration von Immunzellen zugeschrieben wird (Fais and Overholtzer, 2018). Die

Beseitigung nekrotischer Zellen durch nicht professionelle Phagozyten trägt zur phagozytischen Aktivität von Makrophagen bei und kann die mit entzündungsfördernden verbundenen Schäden inhibieren. Dieser Vorgang kann die Prognose des Tumorverlaufs positiv beeinflussen (Schwegler, Wirsing, Schenker, *et al.*, 2015).

3.4 Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)

Das Lungenkarzinom gehört nach wie vor zu den häufigsten Krebstodesursachen weltweit (Bade and Dela Cruz, 2020). Unterschieden werden das kleinzellige und nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (Torre, Siegel and Jemal, 2016). Die Unterteilung basiert auf der Zellteilungsrate. So teilen sich die Zellen des kleinzelligen schneller als die des nicht-kleinzelligen. Dies hat therapeutische Konsequenzen und wirkt sich zudem auf die Prognose aus (Gadgeel, Ramalingam and Kalemkerian, 2012). Zum NSCLC gehören unter anderem das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom. Ca. 3-7 % aller NSCLC Patienten weisen eine Mutation der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) auf (Allen *et al.*, 2020, p. 1). Einen Zusammenhang mit der ALK Mutation und einer Tumorerkrankung konnte erstmals 1997 nachgewiesen werden (Iwahara *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1997), jedoch wurde erst 2013 der erste Tyrosinkinase Inhibitor namens Crizotinib auf dem Markt gebracht (O'Bryant *et al.*, 2013; Kazandjian *et al.*, 2014). Ende 2014 wurde zudem im *New England Journal* eine Studie über die Wirksamkeit von Crizotinib bei NSCLC Patienten mit einer Translokation im ROS1-Gen veröffentlicht (Shaw *et al.*, 2014). Da die Translokation auf dem ROS1-Gen der Mutation der ALK ähnelt (Patil *et al.*, 2019), konnte das Medikament in beiden Fällen eingesetzt werden. Einige Resistenzen gegenüber dem *first generation* TKI zeigten sich jedoch im Laufe der Zeit nach Einsetzen des Medikaments (European Medicines Agency, 2017). So wurde anschließend *second generation* TKS wie Alectinib entwickelt, welche sich durch eine höhere Wirksamkeit kennzeichnen (Avrillon and Pérol, 2017). Die ALEX III-Studie führte schließlich zur Zulassung von Alectinib und zeigte, dass beide Inhibitoren Nebenwirkungen vom Grad 3-5 verursachen, der *second generation* TKI Alectinib (41 %) jedoch weniger als Crizotinib (50 %) (Hida *et al.*, 2017).

3.5 Glioblastom

Gliome sind der häufigste primäre intrakranielle Tumor und machen 81 % der bösartigen Hirntumoren aus (Omuro, 2013; Wirsching, Galanis and Weller, 2016). Obwohl sie selten sind, verursachen sie eine erhebliche Mortalität und Morbidität (Witthayanuwat *et al.*, 2018). Das Glioblastom, die häufigste Gliom-Histologie (ca. 45 % aller Gliome),

hat eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 5 % (Ostrom *et al.*, 2014). Die Therapie unterscheidet sich in der weiteren Klassifizierung (Komori, 2022). 10 % aller Glioblastome weisen eine Mutation im Isocitratdehydrogenase-1- oder -2-Gen (IDH) auf (Reuss *et al.*, 2015). Das Gegenstück (IDH Wildtyp) macht dementsprechend 90 % aus und die Behandlung wird anhand des MGMT (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gen) -Promotor-Hypermethylierung Status unterteilt. Denn eine starke DNA-Methylierung des Promotors vom MGMT-Gen ist ein positiver Prädiktor fürs Ansprechen auf Chemotherapeutika vom Typ Alkylantien (Wirsching, Galanis and Weller, 2016). Trotz der verschiedenen Therapiemöglichkeiten kommt es nicht selten im Rahmen der Glioblastom Erkrankung zu unkontrollierbaren Epilepsien (Lange, Hörschemeyer and Kirschstein, 2021). Neue Erkenntnisse zeigen, dass durch neuronale Stimulation das Wachstum von Gliomen angeregt wird (Venkataramani *et al.*, 2019). Insbesondere kann Glutamat die Proliferation, das Überleben und die Invasivität von Tumorzellen nach Bindung an verschiedene Klassen von Glutamatrezeptoren erhöhen (Takano *et al.*, 2001; Ishiuchi *et al.*, 2002; Rzeski, Ikonomidou and Turski, 2002). Da das Antiepileptikum Perampanel den AMPA-Rezeptor, ein Glutamat-Rezeptor, hemmt (European Medicines Agency, 2020), kommt dieser besonders für weitere präklinische Studien und klinische Studien in der Neuroonkologie infrage. Am ehesten spielen wohl Patienten mit sowohl negativem IDH als auch negativem MGMT-Gen eine Rolle hinsichtlich dieser möglichen Studien (Rösche *et al.*, 2015).

3.6 Ziele dieser Arbeit

Um detailreiche Bildaufnahmen von lebenden Zellen abzubilden, bedarf es nicht immer teurer Ausrüstung. Vorherige Arbeiten zeigten bereits, dass man schon mit einem einfachen Lichtmikroskop und ein paar Umbauten Live Cell Imaging betreiben kann. Mit dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass dieses Verfahren die Möglichkeit wiederum zur Detektion von CiC Ereignissen oder von Interaktionen zwischen Zellen mit diversen Medikamenten bietet.

4. Materialien und Methoden

Nähere Angaben zu Bezeichnungen der verwendeten Zelllinien, Herstellern der verwendeten Materialien sowie zu Zusammensetzungen von Lösungen und Medien und Abkürzungen finden sich im Anhang ab Kapitel 8.

4.1 Kamera, Mikroskop und Software

4.1.1 Leica DM6000B

Das automatisierte, aufrechte Mikroskop-System Leica DM6000B kann alle Durchlicht- und Kontrastverfahren bewerkstelligen. Mit motorisierten Z-Focus können Fokus-Positionen abgespeichert werden. Es kann zwischen dem Differentialinterferenzkontrast (DIC) und Fluoreszenz-Aufnahmen wechseln (Leica, no date). Um die Fluoreszenzbilder genaustens den dazugehörigen Zellen zuordnen zu können, wurden DIC-Bilder abgebildet. Aufnahmen, welche nur mit Breitfeldbeleuchtung erfasst wurden, wirkten meist flach und detailarm und erschwerten uns die korrekte Zuordnung (Abbildung 1).

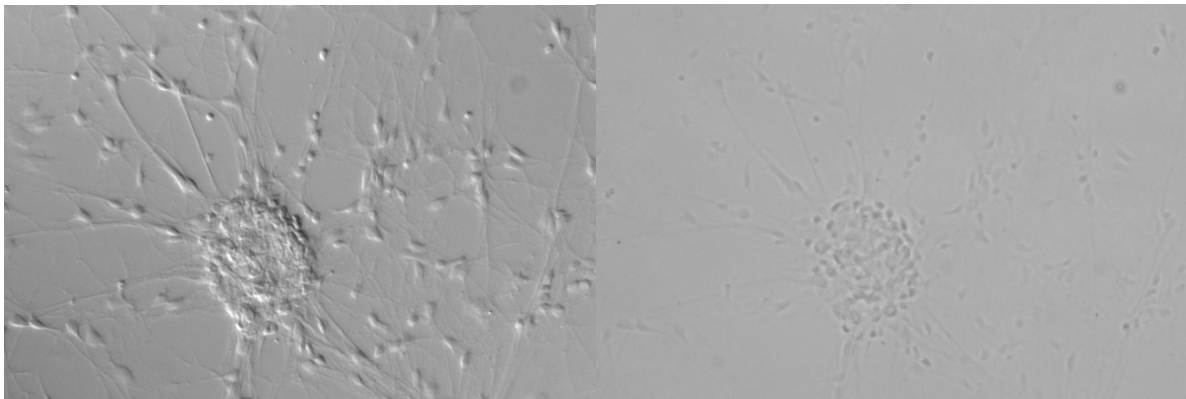


Abbildung 1: DIC (links) und Breitfeld-Beleuchtung (rechts) eines Zellhaufens

Dies zeigt die Notwendigkeit von DIC zur verbesserten Darstellung und somit für eine genauere Betrachtung.

entnommen von: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/differential-interference-contrast-dic/>

Das liegt daran, dass die Präparate zwar mit Licht reagieren, dies aber nicht im sichtbaren Bereich liegt. So unterscheidet man zum einen zwischen Amplituden-Objekten, die die Amplitude und für das menschliche Auge die Helligkeit beeinflussen, und zum anderen Phasen-Objekten, welche die Phasen der Wellenlänge verschieben können und für unsere Wahrnehmung nur als flacher und detailarmer aufgenommen werden (Jiang and Yin, 2016). Bei der DIC-Aufnahme wird ein Gradient in optischer Wellenlänge verwendet. Dadurch wirken die Bilder reliefartig und scheinen einen Schatten zu besitzen (Centonze Frohlich, 2008). Zwei Lichtstrahlen mit polarisiertem Licht werden

hierfür orthogonal zerlegt, sodass die beiden Strahlengänge sehr nah beieinander liegen. Vereinen sich diese wieder, stören sie sich gegenseitig und werden elliptisch polarisiert. Durch eine Amplitudenverschiebung mit einem Analysator können diese Strahlen in einen für das menschliche Auge sichtbaren Bereich umgewandelt werden (Ockenga, 2011) (Abbildung 2).

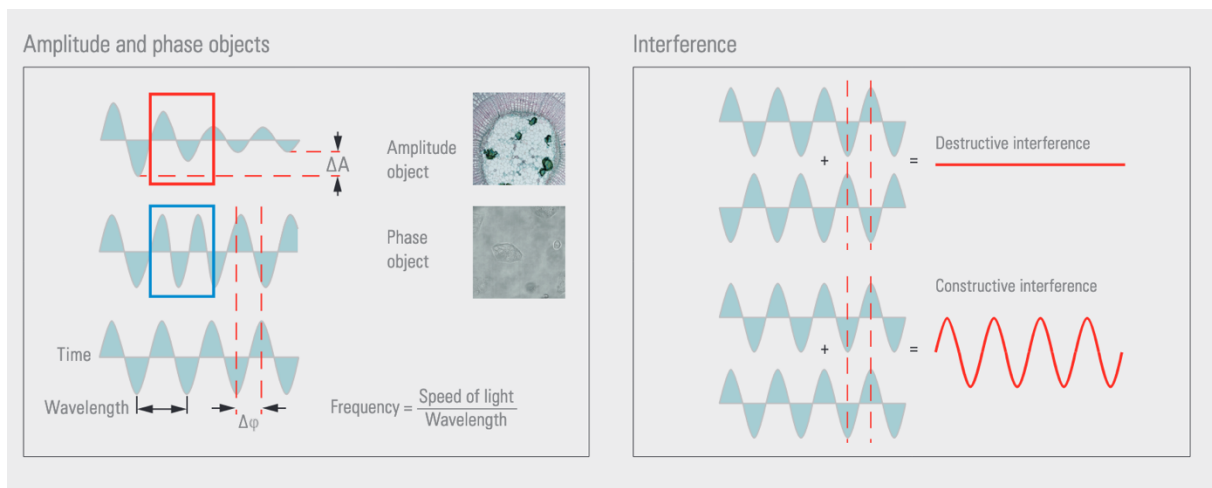


Abbildung 2: Amplituden- und Phasenobjekte

Auf der linken Seite wird schematisch beschrieben, wie Amplituden- bzw. Phasenobjekte den Lichtstrahlengang beeinflussen. Auf der rechten Seite wird bildlich gezeigt, wie die Interferenz durch eine Verschiebung des Intervalls den Strahlengang wieder für das menschliche Auge hervorhebt.

entnommen von: https://downloads.leica-microsystems.com/Leica%20DMi8/Posters/Leica_DMi8_DIC-Poster_A1_en_2016.02.18.pdf

4.1.2 Inkubationssystem

Das DM6000B wird nicht regulär in der Lebendzellmikroskopie verwendet, weshalb es daher auch keine erhältlichen Inkubationssysteme für dieses Lichtmikroskop gibt. Es wurden einige Umbauten vorgenommen. Eine quaderförmige Ummantelung aus Polystyrol (Abbildung 3) diente als Gehäuse und damit als Schutz und zur Temperaturechterhaltung. Um die Arbeitstemperatur von 37 °C konstant halten zu können, wurden vier Heizmatten mit einer Leistung von 6 W mit je einer Fläche von 17 cm x 17 cm benutzt. Zudem wurde ein Thermostat zur On/Off-Steuerung vorgeschaltet. Damit dieser auch die richtige Temperatur einstellte, wurde an zwei verschiedenen Punkten im Gehäuse die Wärme mittels eines Temperaturmessgeräts gemessen. Sobald die Quecksilberdampf Lampe für die Fluoreszenzmikroskopie in Betrieb ist, wird Licht durch das Lichtleiterkabel geleitet. Egal ob gerade Aufnahmen laufen oder nicht (Abramowitz, M., et al., no date).

Selbst bei geschlossener Blende – also keinen laufenden Bildaufnahmen – treffen die Photonen auf diese und geben ihre Energie in Form von Wärme ab. Die aufgestaute

Hitze brachte die Arbeitstemperatur auf über 37 °C, weshalb ein handelsüblicher CPU-Lüfter auf die Kamera montiert wurde.

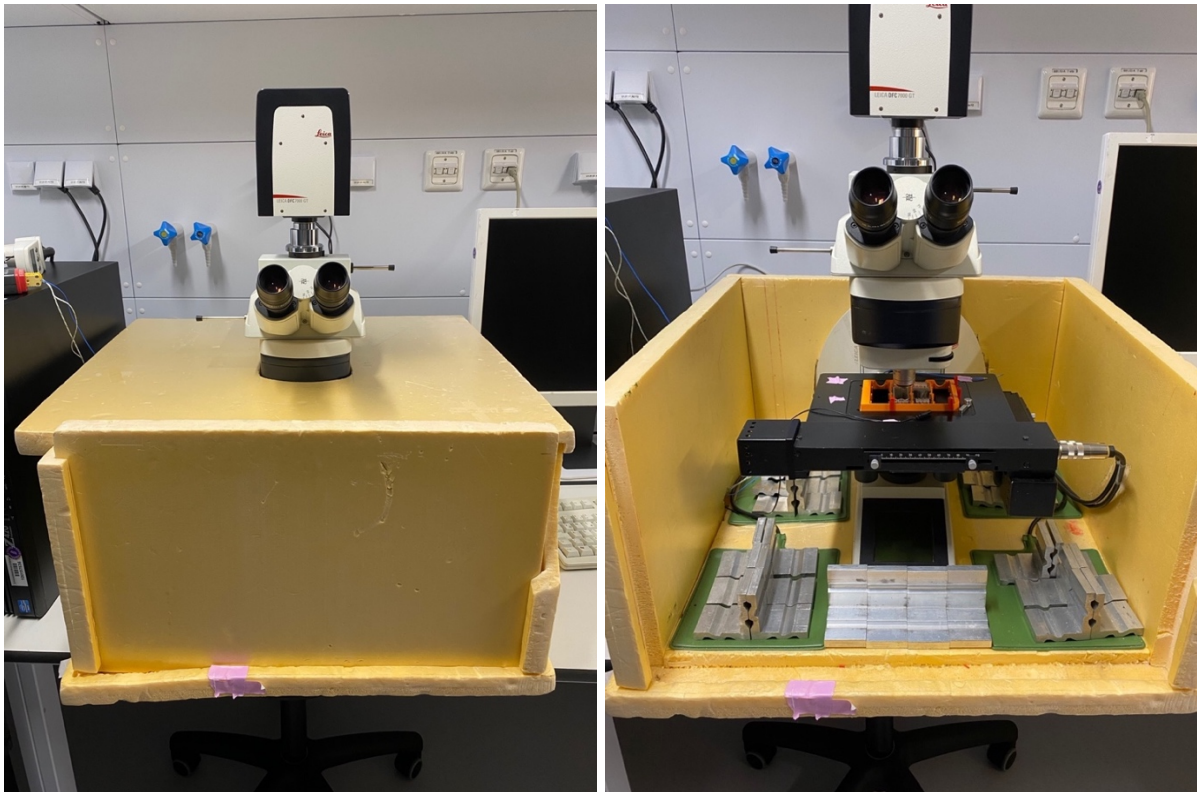


Abbildung 3: Fotografie des Inkubationssystem (links)

Die Leica DM6000B ist mit Styroporgehäuse umhüllt, welches als Inkubationssystem dient.

Abbildung 4: Fotografie vom Inneren des Inkubationssystem (rechts)

Zu sehen sind die Leica DM6000B, ein Teil des Styropor-Inkubationssystem, die Heizplatten und die darauf liegenden Aluminiumwinkel, welche als Wärmespeicher dienen.

Damit beim Öffnen der Klappe die Temperatur nicht sofort entweicht, wurden auf den Heizplatten Aluminiumwinkel gelegt, die die Wärme in der Konstruktion speichern sollte (Abbildung 3 und 4). Durch diese Methode blieb die Temperatur nahezu konstant.

Für Lebendzellaufnahmen gibt es diverse Zellkultur-Platten. Wir entschieden uns jedoch für die Microfluidic Chips der Firma ‚microfluidic ChipShop‘. Um diese an Ort und Stelle festzuhalten, benutzten wir den Chiphalter der gleichen Firma und kleine Keile, welche wir zwischen dem Halter und dem Mikroskoptisch einspannten (Abbildung 5).

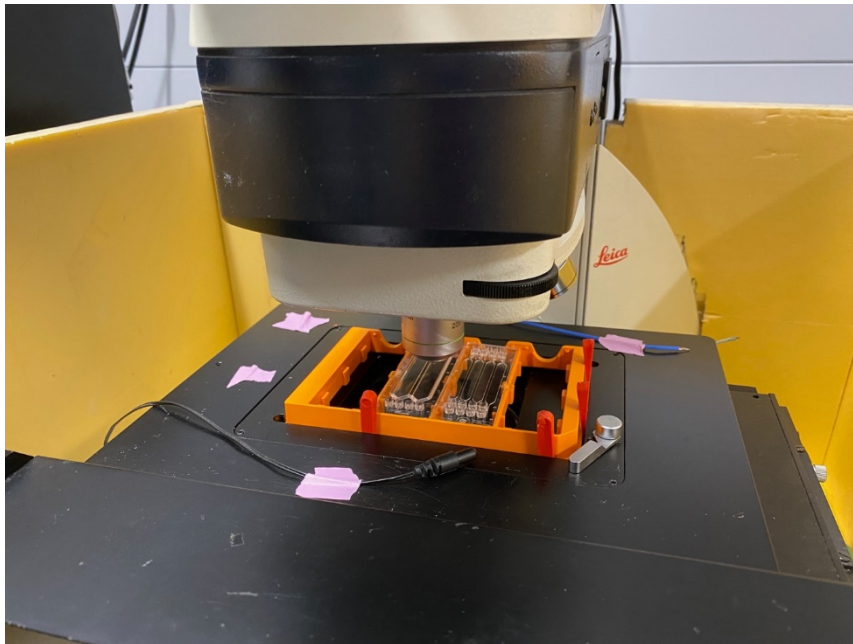


Abbildung 5: Fotografie der Befestigung des Microfluidic-Chiphalters

Durch Keile wird dieser an Ort und Stelle gehalten. Zudem sind die Sonden des Thermostats erkennbar (blaues und schwarzes Kabel).

4.1.3 Verwendete Softwares für Analyse und Auswertung

Mithilfe von LASX, einer Software von Leica, ließ sich das Mikroskop gut steuern. Man konnte jegliche Funktionen am Computer einstellen, wie z.B. Aufnahmezeit, Aufnahmedauer usw. Auch der notwendige Autofocus konnte hiermit eingestellt werden (Abbildung 6). Um Phototoxizität und Photobleaching zu vermeiden, wurde am Programm die Signalverstärkung (Gain) auf höchste Stufe (= 10) eingestellt. Die Bildaufnahmen konnte man schließlich in Tiff-Dateien umwandeln. War eine Photobleachingkorrektur nötig, so wurde sie mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Die finale Auswertung erfolgte mit dem auf der Bildanalysesoftware Optimas basierenden Programm Biomas unter Zuhilfenahme eines von Prof. Dr. Distel geschriebenen Programmteils. Bei den Fluoreszenzbildern musste zunächst ein starker Hintergrundabzug erfolgen. Die einzelnen Bilder wurden im nächsten Schritt dann zusammengefügt, sodass alle verschiedenen Aufnahmen in einem Farbbild vereint waren. Nun konnte man die auszumesenden Flächen bestimmen. Die Intensität der drei verschiedenen Fluoreszenzfarben (grün, blau und rot) wurden nun vermessen und in einer Excel Tabelle ausgegeben. Mithilfe von GraphPad Prism9 wurden die Excel-Tabellen schließlich ausgewertet und in Box Plots oder Graphen ausgewertet.

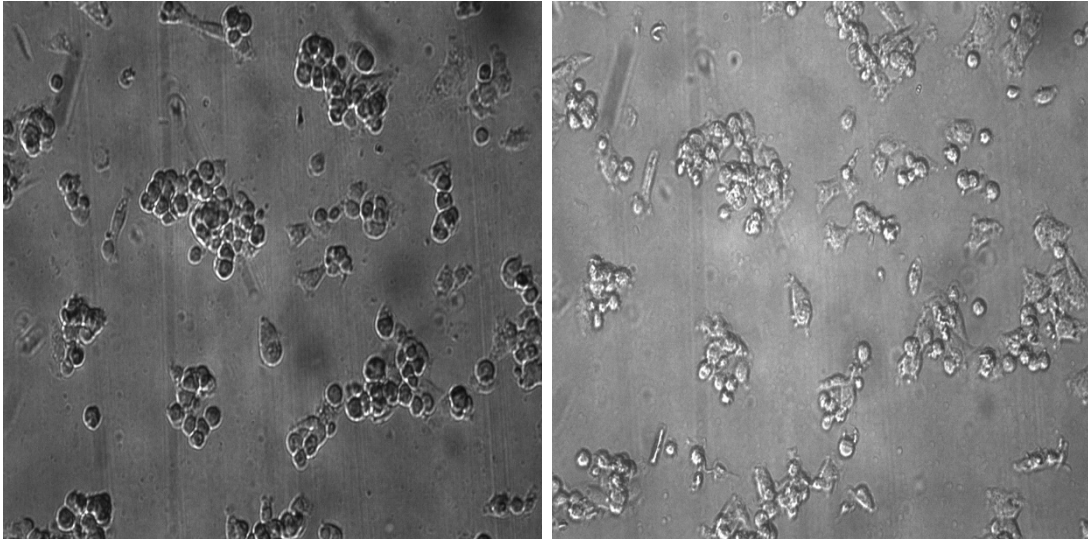


Abbildung 6: Autofocus

Zeigt die Notwendigkeit von Autofocus. Bei diesen Versuchen verwendeten wir lebende Zellen, welche nicht statisch an einer Stelle gebunden waren und daher der Focus alle 3-5h automatisch justiert werden musste.

4.2 Microfluidic Chips

Wir entschieden uns zum Kultivieren von Zellen für die Microfluidic Chips (Abbildung 7). Sie zeigten sich als gut geeignet, aber dennoch musste auf einiges geachtet werden. Die Chips waren deutlich kleiner als die herkömmlichen Zellkulturflaschen. Sie besitzen ein 2,5- bis 3-mal so hohes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, weshalb das Zellmedium öfters gewechselt werden muss. Denn es akkumulieren Stoffwechselprodukte schneller als bei den gängigen Zellkulturflaschen. Auffällig war jedoch, dass die Zellen nach Mediumwechsel schneller starben als bei keinem. So hielten z.B. Zellen der Zellreihe BEAS-2B/U251 ohne das Austauschen von Medium gute 3-4 Tage aus und mit teilweise nur 1-2 Tage. Beim Auswählen des Mediums sollte darauf geachtet werden, dass es sich um farbloses Medium handelt, da die meisten Medien Phenolrot enthalten, welches Fluoreszenzfarbstoffe im sichtbaren Wellenlängenbereich löschen kann (Yamaguchi, Tamura and Maeda, 1997). Zudem herrscht bei diesen Bildern meist ein höheres Hintergrundrauschen, was die Auswertung erschwert. Viele der Medien enthalten neben Phenolrot auch noch autofluoreszierende Komponenten wie Riboflavin, die das Signal zum Hintergrund reduzieren können (Monici, 2005).

Es sollte beim Umgang mit den Chips auf eine sterile Umgebung geachtet werden. Zellsuspensionen, die mit Schläuchen über Mini-male Luer Konus verbunden sind, können über Spritzen direkt in die Chips eingegeben werden. Dabei dürfen keine

Luftblasen in das System gelangen. Diese würden die Bilder sonst unbrauchbar machen. Die Microfluidic Chips kann man nach Trypsinierung und anschließender Spülung mit Isopropanol und PBS mehrmals wiederverwenden. Jedoch ist das auch nur begrenzt möglich, da sehr häufig Materialermüdung an den Schnittstellen auftritt. Trotz der Umwandlung des Mikroskops in ein Lebendzellmikroskop kann keine kontrollierte Atmosphäre mit 5 % CO₂ gewährleistet werden. Daher muss das Medium anderweitig gepuffert werden. Good-Puffer HEPES eignet sich gut für die Zellkultur (Good *et al.*, 1966).

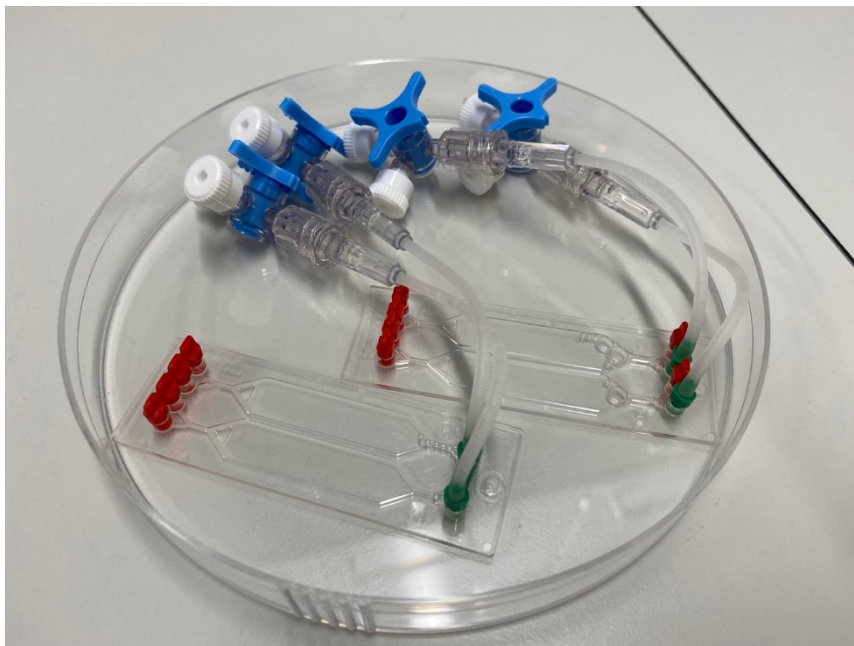


Abbildung 7: Fotografie zweier Rhombic Chamber Microfluidic Chips

Zu sehen sind die Microfluidic Chips, welche mit Schlauch- und Drei-Wege-Hahn-System und Mini-Male Luer Konus verbunden sind

4.3 Zellreihen

4.3.1 BEAS-2B

Bei der Zellreihe BEAS-2B handelt es sich um humane Lungenepithelzellen, welche für Forschungszwecke als *in vitro* Zellmodell standardisiert worden sind (Han *et al.*, 2020). Die Zellen zeigen ein adhärentes Wachstumsverhalten. Das Medium DMEM wurde zur Kultivierung mit 10 % FKS und 1 % PIS versetzt.

4.3.2 A549

Die humanen Adenokarzinomzellen der Lunge der Zelllinie A549 stammen von einem 58-jährigen weißen Amerikaner (Cooper *et al.*, 2016). Sie wachsen ebenfalls adhärent. Diese Zellen werden häufig in Versuchsreihen als ALK/ROS1 Wildtyp eingesetzt (Jost

et al., 2022). Das zu verwendete Medium DMEM wurde 5 % FKS und 1 % PIS hinzugefügt.

4.3.3 U251

Die Zellreihe U251 ist vergesellschaftet mit humanen Glioblastomzellen des Gehirns (Qi and Liu, 2016). Sie stammen von einem männlichen weißen Europäer. Sie besitzen keine IDH-Mutation oder Translokation des MGMT-Gens. Auch diese Zellen wachsen adhärent. Ihrem Medium DMEM wurde 10% FKS und 1 % PIS beigesetzt.

4.4 Medikamente

4.4.1 Crizotinib

Im Jahr 2008 fand man heraus, dass manche der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome bei Nicht-Rauchern eine Mutation in dem ALK-Gen aufwiesen (Soda *et al.*, 2007). Die ersten Medikamente hierzu wurden entwickelt. Crizotinib gehört zu der ersten Generation von Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), die gegen ALK-positive NSCLC eingesetzt wurden (Alice T. Shaw, M.D., Ph.D, 2014). Jedoch verlor das Medikament nach längerer Nutzung an Wirkung (European Medicines Agency, 2017). Man fand heraus, dass die Tumorzelle sich anpasste und so wurden schließlich zweite Generationen TKIs entwickelt (Song, Wang and Zhang, 2015). Die Wirksamkeit *in vivo* ist dosisabhängig und korreliert mit der pharmakodynamischen Hemmung der Phosphorylierung von ALK-Fusionsproteinen. Das Medikament spricht im Durchschnitt 11 Monate bei nicht Vorbehandlung an (European Medicines Agency, 2017).

4.4.2 Alectinib

Alectinib gehört zu den TKIs der zweiten Generation (Avrillon and Pérol, 2017; European Medicines Agency, 2018). Es wird häufig in der Simultantherapie verwendet. Eingesetzt wird es bei ALK positiven Patienten, die bereits vorher eine Therapie mit Crizotinib hatten und deren Krankheitsverlauf stagniert oder deren Krankheit sehr weit fortgeschritten ist und bis dato noch keine Therapie erhalten hatten (European Medicines Agency, 2018).

4.4.3 Perampanel

Als erster Vertreter der selektiven nicht kompetitiven Antagonisten des AMPA-Rezeptors wird Perampanel zur Behandlung von primär generalisierten tonisch-klonischen Anfällen eingesetzt (European Medicines Agency, 2020). Bei Patienten mit

gleichzeitiger Erkrankung an Glioblastomen fand man heraus, dass der Einsatz von diesem Medikament eine Verzögerung des Krankheitsverlaufs hervor rief (Lange *et al.*, 2019). Die Ausschüttung von Glutamat regt die Neuronen zur Apoptose an und gleichzeitig bewirkt die neuronale Aktivität ein progredientes Tumorzellwachstum (Takano *et al.*, 2001). Durch Hemmung des AMPA-Rezeptors, welcher ein Glutamat-Rezeptor ist (Chen and Gouaux, 2019), kann dieser Vorgang verlangsamt werden. Dies wird jedoch nur bei Glioblastomen ohne IDH-1 und ohne MGMT-Promoter Mutation verwendet (Rösche *et al.*, 2015).

4.5 Verwendete Farbstoffe

Bei der Wahl des Farbstoffes musste einiges beachtet werden. Er sollte chemisch stabil sein, damit bei langen Versuchsaufnahmen auch am Ende der Aufnahmezeit immer noch ein ausreichendes Signal vorhanden ist. Zudem darf er nicht bzw. wenig zytotoxisch sein. Die Bilder wurden nur mit kurzen Belichtungszeiten aufgenommen, um die zusätzliche Phototoxizität zu minimieren, die ein entscheidender limitierender Faktor in der Fluoreszenzmikroskopie ist (Watkins and St. Croix, 2013). Dabei sollte der Farbstoff trotz allem eine starke Fluoreszenz aufweisen. Das Spektrum von Exzitation und Emission ist ebenso entscheidend. Langwellige Spektren sind weniger toxisch, weshalb wir auch auf Farbstoffe im blauen Bereich vollständig verzichtet haben. Die Zellen wurden in drei verschiedenen Stadien untersucht: lebend, apoptotisch und nekrotisch.

Zur Färbung von lebendigen Zellen entschieden wir uns für TMRM. In gesunden Zellen mit unterschiedlichen elektrischen Membranpotentialen akkumuliert der Farbstoff in den Mitochondrien. Bei Verlust des Potentials schwächt das Signal ab oder verliert sich ganz. Exzitations- und Emissionsmaxima liegen bei 548 nm und 574 nm (Thermo Fischer Scientific Inc., 2017) (Abbildung 8).

Cell Event Caspase 3/7 ist ein Peptid aus vier Aminosäuren (DEVD – Aspartat, Glutamat, Valin, Aspartat) und der ideale Farbstoff für apoptotische Zellen. Die Aktivität von Caspase 3 ist entscheidend für die Apoptose. Das Substrat DEVD ist konjugiert an einem Farbstoff mit Exzitations- und Emissionsmaxima von 502/530 nm. Die Sequenz des Peptids entspricht der Spaltstelle vom Enzym und erst beim Abspalten leuchtet der Farbstoff durch Bindung an die DNA (Thermo Fischer Scientific Inc., no date).

Da TMRM und Caspase 3/7 sich bereits im grünen und gelben Spektralbereich befinden, entschieden wir uns für DRAQ7. Dieser Farbstoff hat sein Exzitations- und

Emissionsmaxima bei 678 nm/697 nm und wird somit eher im roten bis infraroten Bereich angeregt. Somit konnten wir unnötige Überschneidungen vermeiden und bessere Bildergebnisse erzielen (Abb.8). DRAQ7 verbleibt im Medium und stellt nekrotische Vorgänge dar. Zellen mit intakter Zellmembran waren undurchlässig für den Farbstoff. Erst mit Durchgängigkeit der Membran der Zelle verbindet sich der Farbstoff mit der dsDNA (abcam, no date) (Abbildung 9).

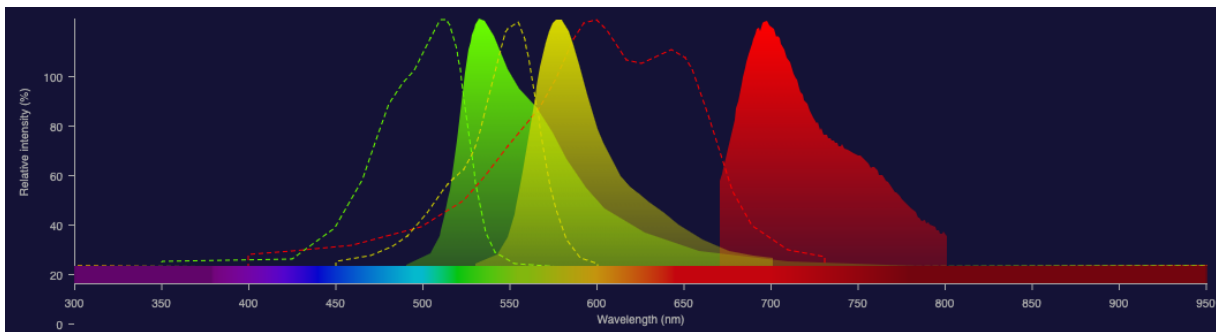


Abbildung 8: Exzitations- und Emissionsmaxima

Die schematische und bildliche Darstellung der Exzitations- und Emissionsmaxima der Farbstoffe TMRM, Caspase 3/7 und DRAQ7 zeigt, dass durch diese Wahl die Farbspektren sich nur geringfügig überlappen. Grüner Bereich – Caspase 3/7, gelber Bereich – TMRM, rot/infraroter Bereich – DRAQ7
Bildquelle: thermofischer

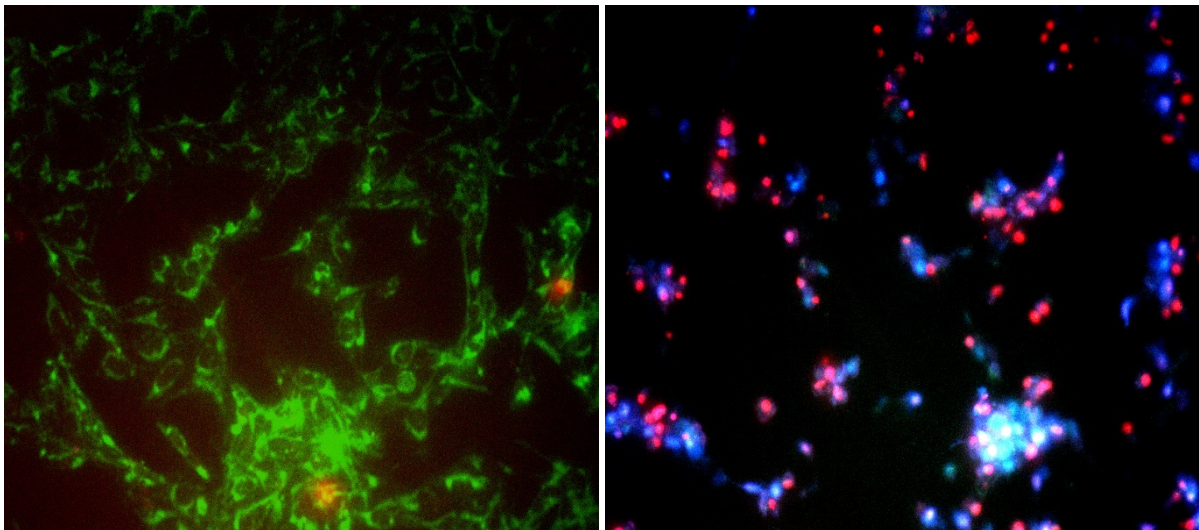


Abbildung 9: Farbbilder vom Anfang und Ende eines Versuches

Diese Farbbilder (beispielsweise vom Versuch BEAS-2B + Alectinib) verdeutlichen die Notwendigkeit von verschiedenen Farbspektren zur einfacheren Darstellung der verschiedenen Konditionen Mitochondrien- (grün), Apoptose (blau) und Nekrose Aktivität (rot). Das linke Bild zeigt die Zellenpopulation am Anfang. Viele dieser Zellen sind noch gesund und lebendig und speichern daher den Farbstoff für die Mitochondrien kräftig. Das rechte Bild wurde ca. nach drei Tagen aufgenommen. Viele dieser Zellen sind bereits apoptotisch oder sogar nekrotisch.

4.5.1 Phototoxizität und Photobleaching

In der Lebendzellmikroskopie ist die Toxizität des Lichtes, besonders die des fluoreszierenden Lichts, ein limitierter Faktor hinsichtlich der Expositionszeit und der daraus resultierenden Bildqualität (Magidson and Khodjakov, 2013; Watkins and St. Croix,

2013). Durch die wiederholte Anregung der Fluorophore kommt es zum sogenannten Photobleaching. Dieser Vorgang beruht darauf, dass die Moleküle durch Licht angeregt werden und die Struktur des Farbstoffes zerstören oder verändern. Dadurch verliert das Färbemittel seine Fluoreszenz und die Reaktionsprodukte, die dadurch entstanden sind, sind mitunter toxisch (Diaspro *et al.*, 2006; Waters, 2013). Reaktionsprodukte wie ROS (Sauerstoffradikale) sind wiederum Grund für die Phototoxizität. Physiologische Zellen sind in der Regel in der Lage Sauerstoffradikale zu eliminieren. Jedoch bei zu großer Menge können sie dieses nicht mehr bewältigen (Kiepas *et al.*, 2020). Neben den toxischen Produkten des Photobleachings kommt hinzu, dass einige Zusätze im Medium auch Phototoxizität auslösen können, wie z.B. HEPES. Um der Toxizität entgegenzuwirken, könnte man zusätzlich Antioxidantien, wie z.B. Pyruvat hinzufügen (Spierenburg *et al.*, 1984; Icha *et al.*, 2017). Ein großer Nachteil ist jedoch, dass diese Zusätze den Sauerstoffgehalt im Medium senken. Da die Zellgesundheit uns wichtiger war, verzichteten wir darauf. Um dennoch den Faktor des Photobleaching und der Phototoxizität zu minimieren, kann man die Aufnahmebedingungen an sich noch optimieren. Mit dem Programm Leica LASX lässt sich zum einen die Aufnahmezeit regulieren und zum anderen kann man computertechnisch eine maximale Signalverstärkung (Gain) einstellen, sodass die Zellen letztlich so wenig wie möglich dem Fluoreszenzlicht ausgesetzt sind. Somit optimiert man das System und erzielt ein maximales Signal zu geringsten Störungen. Durch den Gain-Faktor herrscht ein höheres Grundbildrauschen, welches aber hinterher mit diversen Programmen bearbeitet werden kann. Eine Photobleachingkorrektur könnte man zudem mit der ImageJ Software anwenden (Abbildungen 10 und 11).

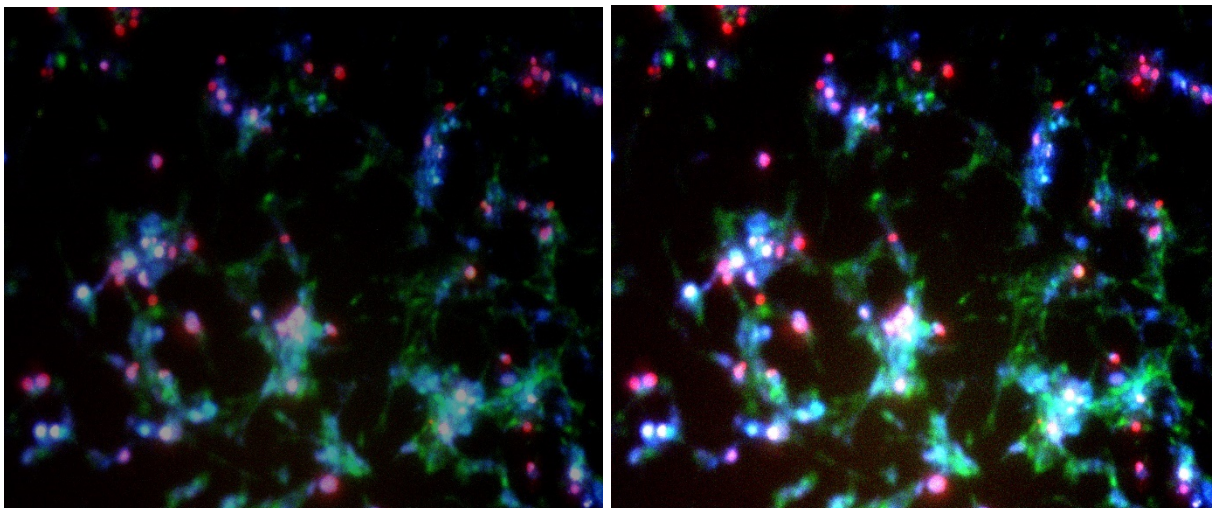


Abbildung 10: Photobleachingkorrektur

Linke Aufnahme (ca. 44 Belichtungen) vor der Bearbeitung, sowie rechts dieselbe Aufnahme nach Bearbeitung mit der Histogram Matching Methode des Programms ImageJ.

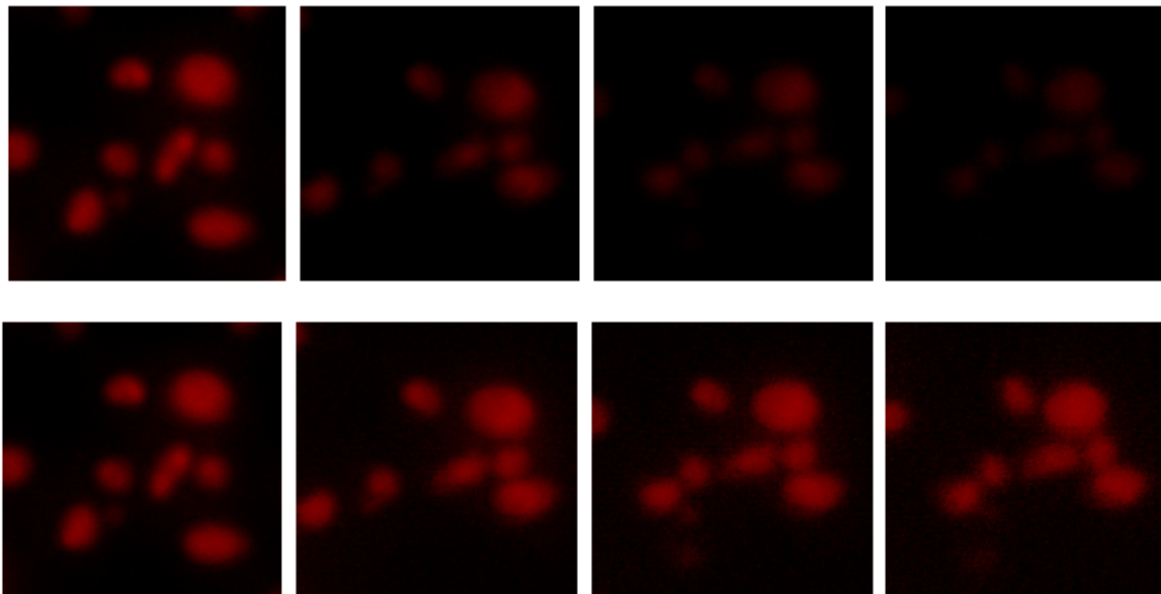


Abbildung 11: Photobleachingkorrektur (Bilderserie)

Obere Zeile: Unbearbeitete Aufnahmen nach 1, 288, 864 und 1728 Belichtungen. Untere Zeile: Dieselben Aufnahmen nach Bearbeitung mit der Histogram Matching Methode des Programms ImageJ

4.6 Zellkulturverfahren

4.6.1 Kultivieren von Zellen

Die Zellen wurden in T75-Kulturflaschen mit dem jeweiligen benötigten Medium (Kapitel 10) bei 37 °C, 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Bei zirka 80 % bewachsener Fläche wurden die Zellen gesplittet. Zunächst wurde hierfür das alte Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit sterilen PBS ausgewaschen. Danach wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin beschichtet und bei 37 °C für maximal vier Minuten inkubiert. So lösten sie sich von der Flasche ab. Durch Zugabe mit frischem Medium wurde die Trypsin Aktivität wieder aufgehoben. Je nach Zelldichte bzw. benötigter Konzentration wurden sie dann im Verhältnis von 1/3 oder 1/4 gesplittet und mit frischem Medium versetzt.

4.6.2 Bestimmung der Zellzahl

Der CASY® Cell Counter wurde zur Bestimmung der Zellzahl verwendet. Von den abgelösten Zellen wurden 100 µl Zellsuspension mit 10 ml CASY®-Ton pipettiert. Das passende Zählprogramm für die jeweilige Zellreihe wurde nun ausgewählt. Durch das Durchflussprinzip misst das CASY® Partikel, die durch die Messpore strömen. Unter

Berücksichtigung der Pulsfläche kann das Gerät zwischen vitaler und avitaler Zellen unterscheiden.

4.7 Detektion von Zell in Zell Ereignissen

4.7.1 Hintergrund

Das CiC-Phänomen, einschließlich Emperipoese, Entose und Kannibalismus, und deren biologischen Auswirkungen wurden in den letzten Jahren in der Forschung zunehmend untersucht. Es gab einige Studien dazu, dass CiC als potenzieller histopathologisch prädiktiver und prognostischer Marker bei Krebs gilt (Bauer *et al.*, 2021). Mit Hilfe von Lebendzellaufnahmen konnten wir die nicht-professionelle Phagozytose bei BEAS-2B Zellen zeitlich und systematisch aufzeichnen und genauer untersuchen.

4.7.2 Versuchsaufbau

Bei den ersten Versuchen wurden zwei Doppelkammern Rhombic Chamber Microfluidic Chips mit 250.000 Zellen pro Kammer 250 μ l beimpft und einen Tag lang im Mikroskop inkubiert. Nach 24 h Anwachsen wurden sie dann mit frischem Medium und der gleichen Menge an nekrotischen Zellen versetzt. Dabei ist aufgefallen, dass meistens beim Mediumwechsel Zellen untergingen und gleichzeitig leichter Luftblasen ins System gelangen. Die theoretische Überlegung war, dass wir somit einen guten Zellrasen generieren, aber die praktische Erfahrung zeigte, dass bei simultaner Beimpfung ein besseres Ergebnis entstand. Daher wurden die Zellen, die phagozytieren sollten, in einer T25 Zellkulturflasche mit 25 nM TMRM für 45 min bei 37 °C und 5 % CO₂ behandelt. Eine andere Zellkulturflasche wurde währenddessen für 45 min bei 60 °C im Wasserbad hitzenekrotisch bearbeitet. Nach der beschriebenen Zeit wurde die erste Zellkulturflasche mit PBS ausgespült und anschließend wurde 1 ml Trypsin dazu gegeben, um die Zellen von der Fläche zu lösen. Um die Trypsinaktivität schließlich wieder aufzuheben, wurde 3 ml farbloses FluoroBrite™ DMEM hinzugegeben. Die Zellsuspension der zweiten Flasche mit den hitzenekrotischen Zellen wurde mit Hilfe einer Pipette in ein Reaktionsröhrchen aufgenommen und bei 170 g für 5 min zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde dann im nächsten Schritt vorsichtig abgesaugt. Die übrig gebliebenen Zellen wurden anschließend mit etwas farblosen Medium vermengt und der anderen Zellsuspension dazu gegeben. Der Farbstoff DRAQ7 und Good-Puffer HEPES wurden danach noch mit einer Konzentration von 3 μ M und 10 mM beigefügt. Nach guter Durchmischung wurde das Gemisch unter sterilen

Bedingungen und ohne Luftblasen im System mit einer 1 ml Spritze aufgezogen und in Rhombic Chamber Microfluidic Chips mit einem Fassungsvermögen von 250 µl über Schläuche und Mini Male Luer Konus eingegeben. Danach wurden die Doppelkammer-Chips ins Mikroskop eingespannt und die Positionen der Aufnahmen bestimmt. Pro Kammer wurden vier verschiedene Markierungen festgelegt und alle 10 min nahm das Mikroskop Bilder auf. Bei jeder Aufnahme wurden je ein Bild mit der DIC-Lampe und zwei Bilder mit der Fluoreszenzlampe - für die verschiedenen Konditionen ‚Mitochondrien Aktivität‘ und ‚Nekrose‘- aufgenommen. Dabei war zu beachten, dass die Aufnahmezeit der Fluoreszenz so gering wie möglich zu halten ist. Im Schnitt wurden die DIC-Bilder zwischen 8 ms – 10 ms aufgenommen. Während die Aufnahmen für die Mitochondrienaktivität und Nekrose sich im Bereich von 50 ms – 60 ms befanden.

4.7.3 Auswertung

Wie schon unter 4.1.3 genannt, wurden alle Bilder am Computer mit Hilfe des Programms LASX von Leica aufgenommen und schließlich in TIFF-Dateien umgewandelt. Auf einer externen Festplatte gespeichert, konnten wir diese Daten dann mit dem Programm Optimas/Biomax nach ihren Konditionen (DIC, Mitochondrien- und Nekrose-Aktivität) sortieren. Das Fluoreszenzsignal der Zellen wurde anschließend verstärkt, indem wir den Hintergrund abzogen und das allgemeine Hintergrund-/Bildrauschen verminderten. Die korrigierten Bilder der einzelnen Konditionen wurden anschließend zu einem Farbbild vereinigt. Als ein Video zusammengefügt, ließen sich diese Dateien einfacher durchschauen. Ist beim Betrachten dieses Clips eine interessante Stelle aufgefallen, so ließen sich mit dem Programm Biomax Bildbereiche einfach eingrenzen und auch zuschneiden. Mit Photoshop wiederum haben wir dieses Farbbild mit den DIC-Bildern übereinandergelegt und dadurch konnten wir vorher erblickte CiC besser beurteilen und auch verifizieren.

4.8 Interaktion Tumorzelle mit Bestrahlung und Medikament

4.8.1 BEAS-2B/A549 + Alectinib und Crizotinib im Vergleich

4.8.1.1 Hintergrund

Die Hauptursache für krebsbedingte Todesfälle durch bösartige Tumore weltweit ist nach wie vor Lungenkrebs (Torre, Siegel and Jemal, 2016). Das anaplastische Lymphomkinase-Fusionsgen-Rearrangement (ALK-positiv) nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome (NSCLC) ist eine einzigartige Untergruppe, die 3-7% der NSCLC-Fälle

ausmacht (Allen *et al.*, 2020). In den letzten Jahren, mit Einführung der ALK-Inhibitoren, hat sich die Behandlung des fortgeschrittenen ALK-positiven NSCLC komplett verändert und die Prognose für die Patienten deutlich verbessert (Zhuang, 2018). Crizotinib ist der erste entwickelte ALK-Inhibitor, der bei NSCLC Patienten mit ALK-positiv im Vergleich zur Chemotherapie eine systematische Wirksamkeit und stark verbesserte Ergebnisse gezeigt hat (European Medicines Agency, 2017). Die *second generation* ALK-Inhibitoren, wie z.B. Alectinib, wurden speziell als wirksameres und selektiveres Anti-ALK-Therapeutikum entwickelt, welches die Crizotinib-Resistenz umgehen soll (Avrillon and Pérol, 2017). Mit Hilfe von Lebendzellaufnahmen unter Gabe beider Medikamente konnten wir die Unterschiede der zwei Inhibitoren bei den Zelllinien BEAS-2B und A549 zeitlich und systematisch aufzeichnen und genauer betrachten.

4.8.1.2 Versuchsaufbau

Die Zellbewachung von 70 – 80 % des Bodens einer T-25 Flasche entsprach der benötigten Zellanzahl für den Versuch (ca. $6 - 8 \times 10^5$ Zellen/ml). Für den Versuch wurde das Medium der Flasche auf 10ml reduziert und mit 25 nM TMRM versetzt. Die Flasche wurde für 45 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS ausgewaschen und mit 1 ml Trypsin versetzt, um sie vom Flaschenboden zu trennen. Mit 3 ml farblosem DMEM Fluorobrite™ wurde die Trypsinaktivität wieder aufgehoben. Das Gesamtvolumen von 4 ml Zellsuspension wurde dann im nächsten Schritt gleichmäßig in zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Dem ersten Gefäß wurde dann 3 µM DRAQ7, 10 µM CellEvent Caspase 3/7, 10 mM HEPES-Puffer und je nach Versuch 1 µM Alectinib oder Crizotinib hinzugefügt. Dem zweiten Gefäß wurde ebenso alles bis auf das Medikament dazugegeben. Nun wurden zwei 2-Kammer-Microfluidic Chips bereitgelegt. Diese wurden mit einem Schlauchsystem und Drei-Wege-Hähne ausgestattet. Nach guter Durchmischung der Zellsuspension wurde sie in die Microfluidic-Chips mit einer 1 ml Spritze eingegeben. Je Chip sollte dann eine Kammer mit und ohne Medikament befüllt sein. Beim Aufziehen der Spritze und Befüllen des Materials sollte penibel auf Vermeiden von Luftblasen im System geachtet werden, sowie auf das sterile Arbeiten. Danach wurden die beiden Teile in den Mikroskopisch eingespannt und es wurden alle 45 min Bilder in verschiedenen Wellenlängenbereichen aufgenommen. Je Kammer wurden vier Positionen festgelegt. Es wurden zudem vier verschiedene Aufnahmen aufgenommen: DIC (Aufnahmedauer (AD) 8 - 10 ms; DIC Lampe), Mitochondrien Aktivität (Farbstoff: TMRM; AD 50 ms; Fluoreszenzlampe mit

den Einstellungen Ex: 460-500, DC: 505, EM: 512-542), Apoptose Aktivität (Farbstoff: CellEvent Caspase 3/7; AD 60 ms, Fluoreszenzlampe mit den Einstellungen Ex: 390-410 + 487-503 + 560-580, DC: 415 + 510 + 590, EM: 455-475 + 515-545 + 620-660) und Nekrose Aktivität (Farbstoff: DRAQ7; AD 50-60 ms, Fluoreszenzlampe mit den Einstellungen Ex: 610-630, DC: 660, EM: 662-738). Bei den Aufnahmen wurde darauf geachtet, dass die Aufnahmezeit so gering wie möglich gehalten wurde, um Phototoxizität und Photobleaching zu vermeiden. Es wurde zudem so eingestellt, dass bei jedem fünften Durchgang der Autofocus die Zellenebene wieder scharf einstellte. Nach drei Stunden wurde einer der Chips einmalig mit 2 Gy bestrahlt und wieder eingesetzt. Insgesamt lief ein Versuch mindestens drei Tage lang.

Die erste Kammer (erster Chip) entsprach der Kontrolle (Zellen ohne Medikament, keine Bestrahlung). Die zweite Kammer (erster Chip) sollte die Behandlung darstellen (Zellen mit Medikament, keine Bestrahlung). Die dritte Kammer (zweiter Chip) stellte die reine Bestrahlung dar (Zellen ohne Medikament, Bestrahlung 2 Gy). Die vierte Kammer (zweiter Chip) zeigte die Kombinationstherapie an (Zellen mit Medikament, Bestrahlung mit 2 Gy).

4.8.1.3 Auswertung

Die Auswertung ähnelt der von 4.7.3. Auch hier wurden die Aufnahmen mit Hilfe des Programms LASX von Leica in TIFF-Dateien umgewandelt und extern gespeichert. Anschließend wurden diese Daten nach den folgenden Merkmalen sortiert: DIC-Bild, Mitochondrien-, Apoptose- und Nekrose-Aktivität. Im nächsten Schritt wurde das Signal der Fluoreszenzbildern mit Hilfe des Programmes Optimas/Biomas verstärkt, indem wir einen Hintergrundabzug durchführten, um das allgemeine Hintergrund-/Bildrauschen zu vermindern. Die einzelnen Hintergrundabgezogenen Bilder wurden anschließend zu einem Farbbild (merge) vereinigt. In diesem Merge-Bild wurden nun die einzelnen Bereiche (mittels einer Farbauswahl von grün, blau und rot) markiert, die gemessen werden sollen (Abbildungen 12 und 13).

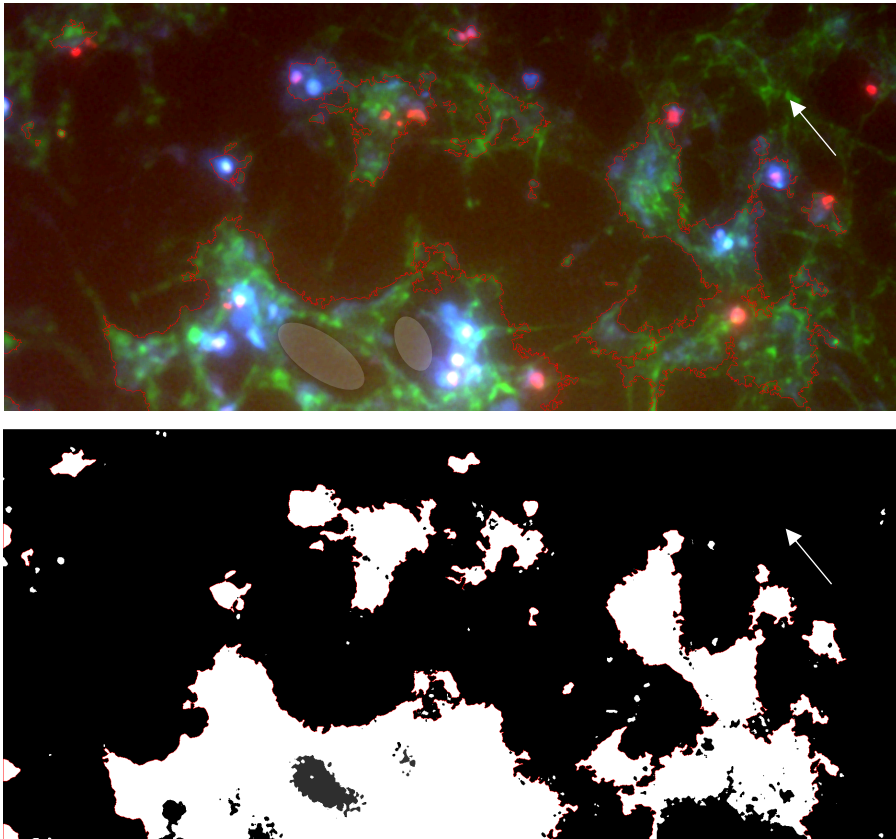


Abbildung 12: Farbbild Auswertung

Oben: Farbbild (beispielsweise vom Versuch BEAS-2B + Crizotinib) mit allen drei Zuständen (grün= Mitochondrien-, blau= Apoptose- und rot= Nekrose-Aktivität). Unten: dazugehöriges Threshold Bild, welches als Maske ein schwarz-weißes Bild bildet. Dieses lässt sich besser bearbeiten. Ausgewählt bzw. eingegrenzt wurden die auszumessenden Bereiche mit Hilfe von gezielter Farbauswahl. Wurden durch das Programm Positionen miteinbezogen, welche für uns uninteressant waren, konnte man diese dann noch nachträglich händisch mit dem Mauszeiger nachziehen und ausgrenzen (eigekreiste Fläche). Man könnte aber im Gegenzug auch interessante Stellen noch hinzufügen (Pfeil).

Die gemessenen Intensitäten der verschiedenen Farben (grün, blau, rot) wurden von Biomass direkt in einer Excel-Tabelle eingefügt. Aus diesen Werten bildeten wir den Mittelwert. Bei mehreren Versuchen (mind. 3) einer Versuchsreihe wurden zudem die gemittelten Werte gesammelt und nochmals gemittelt. Mit SPSS wurde die Statistik ausgerechnet (FISH) und mit Hilfe von GraphPad Prism9 wurden Boxplots und Diagramme erstellt. Einzelne Bilder konnte man zudem zu einem Video zusammenstellen. Folgende QR-Codes zeigen Kurzfilme des Versuchs BEAS-2B mit dem TKI Alectinib und A549 mit dem TKI Crizotinib.



BEAS-2B mit Alectinib:



A549 mit Crizotinib:

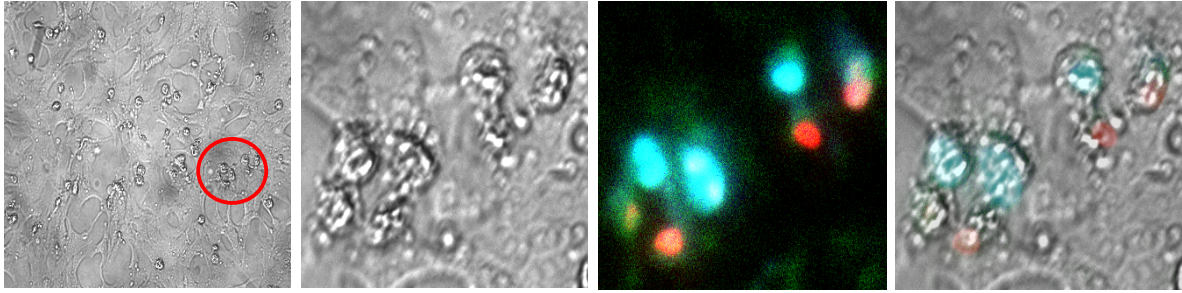


Abbildung 13: DIC-Bild und Farbbild Korrelat

Ausschnitt eines DIC-Bildes und dessen bereits zusammengefügt und Hintergrundabgezogenes Farbbild-Korrelat. Im letzten Bild wurden die beiden vorherigen schließlich übereinandergelegt, um Zellen und Zustände (grün = Mitochondrien-, blau = Apoptose-, rot = Nekrose – Aktivität) richtig zueinander zuordnen zu können.

4.8.2 U251 + Perampanel

4.8.2.1 Hintergrund

Patienten mit Glioblastomen leiden häufig gleichzeitig an nicht kontrollierbaren epileptischen Anfällen, die oft eine antikonvulsive Behandlung erfordern (Lange, Hörschemeyer and Kirschstein, 2021). Während klinische Leitlinien alle zugelassenen Antikonvulsiva empfehlen, ist bislang noch unklar, welches der verfügbaren Medikamente die beste Therapieoption zur Behandlung von Gliom-assoziierten Anfällen ist (Lian, Engelsen and Storstein, 2012). Es gibt einige Studien, die besagen, dass das Hemmen des Glutamat-Rezeptors eine positive Auswirkung hinsichtlich des verminderten Wachstums des Tumors habe, da Glioblastomzellen Glutamat-Rezeptoren wegen ihres Wachstums exprimieren (Lange *et al.*, 2019). Perampanel ist ein selektiver, nicht kompetitiver Antagonist des ionotropen AMPA-Rezeptors postsynaptischer Neuronen und wird häufig in der Behandlung von status epilepticus eingesetzt (Strzelczyk *et al.*, 2019). Zudem scheint bei simultaner Behandlung mit dem oben genannten Antiepileptikum eine Verzögerung des Wachstums des Glioms erkennbar zu sein (Rösche *et al.*, 2015).

4.8.2.2 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau dieser Versuchsreihe ist genauso aufgebaut wie unter 4.8.1.2 beschrieben, nur dass wir hier statt der Lungenepithel- und Lungenkarzinomzellen Glioblastomzellen verwendeten und anstatt den TKIs Alectinib und Crizotinib das Antiepileptikum Perampanel benutzten. Daher haben wir auch für diesen Versuch ca. $6 - 8 \times 10^5$ Zellen/ml in einer T-25 Zellkulturflasche anwachsen lassen. Das Medium wurde dann auf 10 ml reduziert und mit dem Farbstoff TMRM in einer Konzentration von 25 nM versetzt. Für 45 min wurde die Flasche bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Anschließend wurden die behandelten Zellen mit PBS gewaschen und 1 ml Trypsin wurde hinzugegeben, um sie vom Boden der Flasche abzulösen. Um die Trypsinaktivität wieder aufzuheben, wurde 3 ml farbloses DMEM Fluorobrite™ beigegeben. Die gut durchmischte Zellsuspension mit einem Gesamtvolumen von 4 ml wurde im nächsten Schritt gleichmäßig in zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Dem ersten Gefäß wurde 3 μ M DRAQ7, 10 μ M CellEvent Caspase 3/7, 10 mM HEPES-Puffer und 1 μ M Perampinel hinzugefügt. Dem anderen Gefäß wurde bis auf das Medikament die gleichen Stoffe beigegeben. Zwei 2-Kammer-Microfluidic Chips wurden mit einem Schlauchsystem, Linc-Konuse und Drei-Wege-Hähne ausgestattet und nach guter Durchmischung der Zellsuspension mit einer 1 ml Spritze gefüllt. Beim Aufziehen der Spritze und Befüllen des Materials sollte penibel auf Vermeiden von Luftblasen im System geachtet werden, sowie auf das sterile Arbeiten. Die beiden Chips sollten nun wie folgt befüllt sein: Je eine Kammer mit Medikament und je eine Kammer ohne Medikament. Im nächsten Schritt wurden die beiden Objekte in den Mikroskopisch eingespannt und alle 45 min wurden in verschiedenen Wellenlängenbereichen Aufnahmen durchgeführt. Pro Kammer wurden vier Positionen festgelegt. Pro Aufnahme wurden vier verschiedene Zustände aufgenommen: DIC (Aufnahmedauer (AD) 8 - 10 ms; DIC Lampe), Mitochondrien Aktivität (Farbstoff: TMRM; AD 50 ms; Fluoreszenzlampe mit den Einstellungen Ex: 460-500, DC: 505, EM: 512-542), Apoptose Aktivität (Farbstoff: CellEvent Caspase 3/7; AD 60 ms, Fluoreszenzlampe mit den Einstellungen Ex: 390-410 + 487-503 + 560-580, DC: 415 + 510 + 590, EM: 455-475 + 515-545 + 620-660) und Nekrose Aktivität (Farbstoff: DRAQ7; AD 50-60 ms, Fluoreszenzlampe mit den Einstellungen Ex: 610-630, DC: 660, EM: 662-738). Die Aufnahmedauer wurde so gering wie möglich gehalten, um Photobleaching und Phototoxizität zu vermeiden. Nach jedem fünften Durchgang wurde mit Hilfe des Autofocus die Zellebene wieder scharf eingestellt. Nach drei Stunden wurde einer der Chips einmalig mit 2 Gy bestrahlt und wieder eingesetzt. Je nach Zellgesundheit lief ein Versuch mindestens drei Tage lang. Mit den vier verschiedenen Kammern der zwei Microfluidic Chips konnte man vier Konditionen untersuchen: Kontrolle, Behandlung, Bestrahlung und Kombinationstherapie.

4.8.2.3 Auswertung

Wie der Versuchsaufbau ist auch die Auswertung der vorherigen Versuchsreihe gleich. So wurden auch hierfür die Aufnahmen, welche mit LASX aufgenommen wurden, in TIFF-Dateien auf einer externen Festplatte gespeichert. Diese wurden anschließend nach ihren Konditionen sortiert (DIC, Mitochondrien-, Apoptose-, Nekrose Aktivität).

Bei allen Bildern wurde der Hintergrund mit dem Programm Optimas/Biomias abgezogen und dadurch wurde die Fluoreszenzfarbe verstärkt und das Bildrauschen vermindert. Die einzelnen Bilder der verschiedenen Konditionen wurden dann im nächsten Schritt zu einem Farbbild (merge) zusammengefügt. In dieser Komposition markierten wir einzelne – für uns interessante – Zellen, dessen Fluoreszenzfarbstoffintensität anschließend gemessen und in einer Excel-Datei in Form einer Tabelle eingepflegt worden sind. Aus den gemessenen Intensitätswerten bildeten wir Mittelwerte. Mit SSPS wurde die Statistik ausgerechnet und mit Hilfe von Graph Pad Prism9 wurden Grafiken wie Boxplots und Diagramme erstellt.

5. Ergebnisse

5.1 Detektion von Zell in Zell (CiC) Ereignissen

In den folgenden Bildserien (Abbildungen 14 und 15) wurden mehrere CiC Ereignisse beobachtet. Man erkennt in Abbildung 14 besonders gut, wie normale Lungenepithelzellen als ‚Fresszellen‘ beginnen, die rot gefärbten hitzenekrotischen Zellen (gelber, weißer und schwarzer Pfeil) mit ihrer Zellmembran umhüllen. Die abgestorbene Zelle wird absorbiert und der Zellkern, welche mit dem Farbstoff DRAQ7 markiert ist, verliert im Laufe der Zeit seine Fluoreszenz. Wie unter 4.5 bereits beschrieben, verbleibt DRAQ7 im Medium und stellt nekrotische Vorgänge dar. Zellen mit intakter Zellmembran sind daher undurchlässig für den Farbstoff. Erst mit Auflösen der Schutzmembran der Zelle verbindet sich der Farbstoff mit der dsDNA der nekrotischen Zelle. Bildmorphologisch lassen sich die nekrotischen Zellen zwar noch abgrenzen, aber im Farbbild ist das rote Signal nicht mehr sichtbar. Selbst nach starker Bearbeitung mit der Histogram Matching Methode des Programms ImageJ ist dies nicht der Fall. Zwischen der Phagozytose und dem Fluoreszenzverlust vergeht ein Zeitraum von ca. acht Stunden, was auf eine Zelllyse hindeutet. Denn der Farbstoff benötigt nur wenige Minuten, um die Membran der nekrotischen Zellen zu passieren.

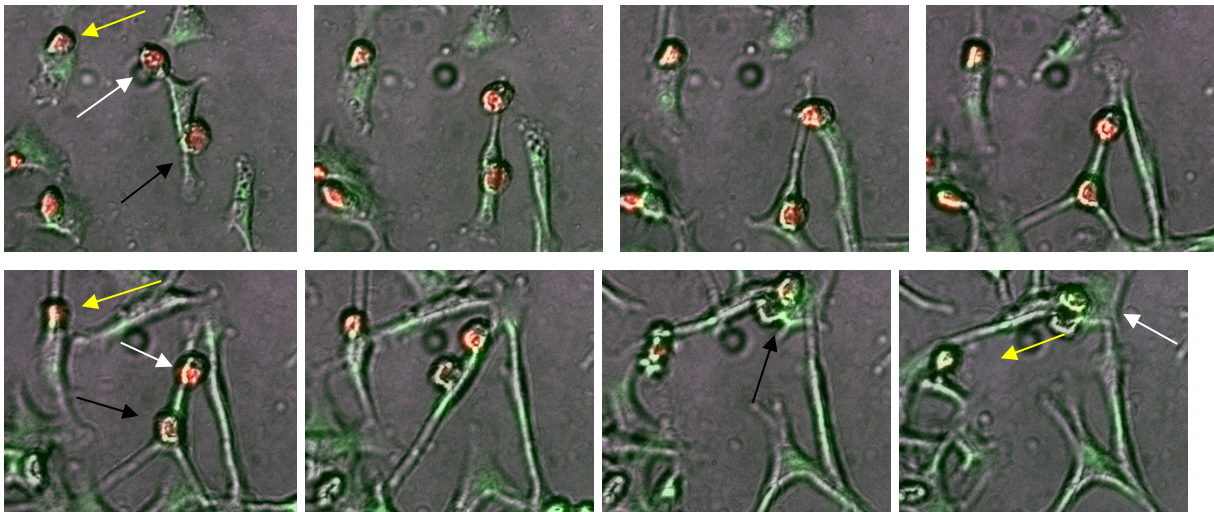


Abbildung 14: Zeitrafferaufnahmen mehrerer Phagozytosen

Zu sehen sind drei Phagozytosen in einem Bildausschnitt. Gekennzeichnet sind diese mit einem gelben, weißen und schwarzen Pfeil. Die Farben stellen wie folgt diese Zustände dar: grün = Mitochondrien Aktivität, rot = nekrotisch. Die Bilder sind von links nach rechts zu lesen und es sind Ausschnitte einer Zellposition nach 10 min, 60 min, 100 min, 200 min, 290 min, 330 min, 390 min, 430 min erkennbar.

Ergebnisse

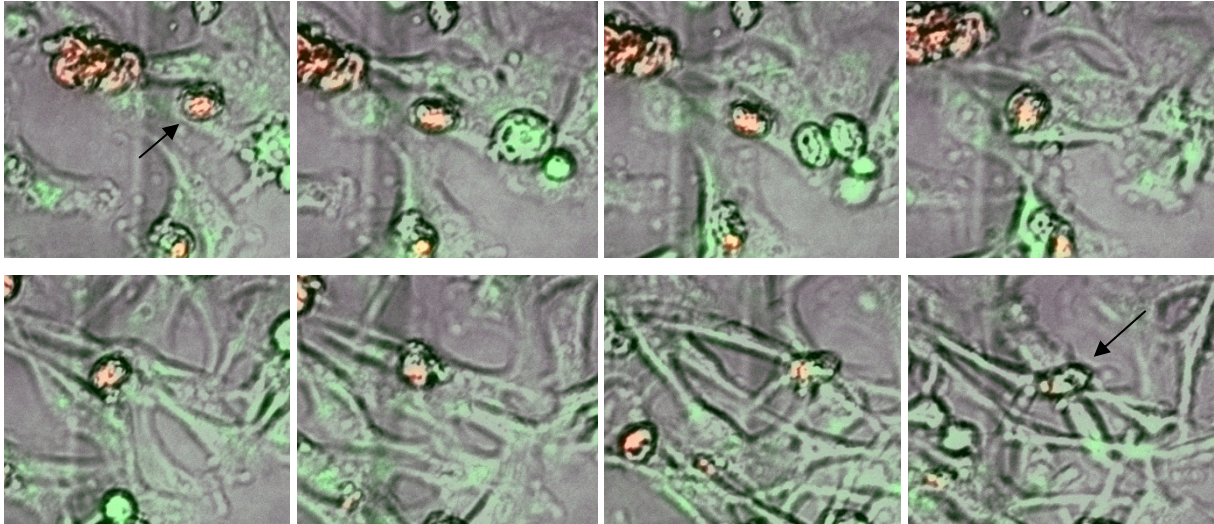


Abbildung 15: Zeitrafferaufnahme einer Phagozytose (schwarzer Pfeil)

Zu sehen ist eine nicht professionelle Phagozytose. Die Farben grün und rot stellen die Mitochondrien- und Nekrose Aktivität dar. Der zeitliche Abstand zwischen den Bildern ist (von rechts nach links und von oben nach unten zu lesen): 10 min, 20 min, 50 min, 100 min, 200 min, 300 min, 400 min, 460 min.

In unseren Versuchen zur Beobachtung von CiC Ereignissen konnten wir in fast allen Positionen mehrere nicht professionelle Phagozytosen erfassen. Jedoch war es ebenso möglich, genauso viele Situationen aufzuzeichnen, in denen die vitale Zelle nekrotische nur mit sich ‚herumtrug‘. Die folgende Bilderserie (Abbildung 16) soll dies verdeutlichen.

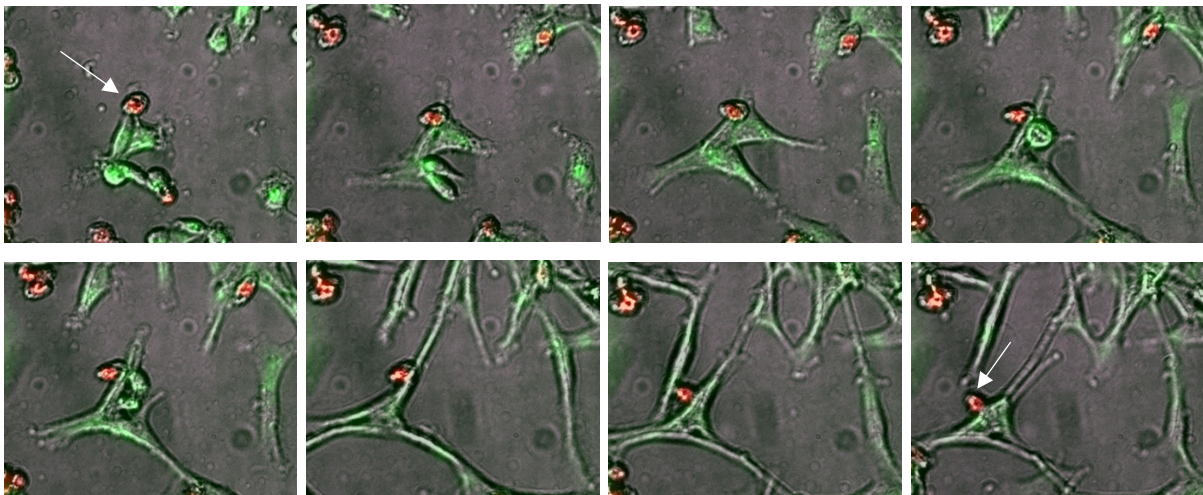


Abbildung 16: Zeitrafferaufnahmen von BEAS-2B Zellen

In diesem Bildausschnitt wurde die rot markierte nekrotische Zelle (Pfeil) nicht phagozytiert und ist auch noch nach 8h gut sichtbar. Grün gefärbte Zellen stellen vitale Zellen dar. Es sind Aufnahmen nach 20 min, 120 min, 220 min, 320 min, 420 min, 520 min, 620 min und 720 min zu sehen. Zu lesen sind die Bilder von links nach rechts und von oben nach unten.

5.2 BEAS/A549 + Alec/Crizo

Die Ergebnisse wurden bereits in ‚*Influence of alectinib and crizotinib on ionizing radiation - in vitro analysis of ALK/ROS1-wildtype lung tissue cells*‘ und auf einem Poster für die DEGRO 2021 vorgestellt.

Im Vergleich mit den Ergebnissen der anderen Versuchsreihen fallen die Kurven vom Versuch BEAS-2B mit dem Medikament Alectinib (Abbildung 17) optisch auf, da sie auf den ersten Blick anders aussehen. Dies liegt daran, dass wir hier alle 20 min eine Aufnahme gemacht haben. In den darauffolgenden Versuchen entschieden wir uns aber für alle 40 min ein Bild. Da die Speicherkapazität der einzelnen Versuche sonst zu groß wären und es im Endeffekt nichts geändert hätte. Schließlich betrachten wir den Verlauf der Versuche über mehrere Tage. Daher liegt unser Augenmerk nicht auf einzelne Zeitpunkte. Dennoch nahmen wir diesen Versuch mit in unsere Studie auf.

Betrachtet man die Kurven der verschiedenen Konditionen, so findet man optisch keinen großen Unterschied in den untersuchten Variablen. Statistisch betrachtet unterscheiden sich zum Zeitpunkt $t = 2160$ jedoch fast alle Aktivitätskurven der verschiedenen untersuchten Zustände (Behandlung, Bestrahlung oder Kombinationstherapie) verglichen mit der Kontrollgruppe wie die folgende Tabelle zeigt.

Tabelle 1: Verschiedene p-Werte vom t-Test unabhängiger Variablen des Versuchs BEAS-2B mit dem TKI Alectinib

Die untersuchten Variablen mit p-Werten kleiner gleich 0,05 unterscheiden sich signifikant.

t-Test bei unabhängigen Stichproben	Kontrollgruppe - Behandlung	Kontrollgruppe - Bestrahlung	Kontrollgruppe - Kombinationstherapie
Mitochondrienaktivität	p-Wert = 0,377	p-Wert = 0,021	p-Wert = 0,020
Apoptoseaktivität	p-Wert = 0,244	p-Wert = 0,001	p-Wert = 0,001
Nekroseaktivität	p-Wert = 0,197	p-Wert = 0,03	p-Wert = 0,001

Ergebnisse

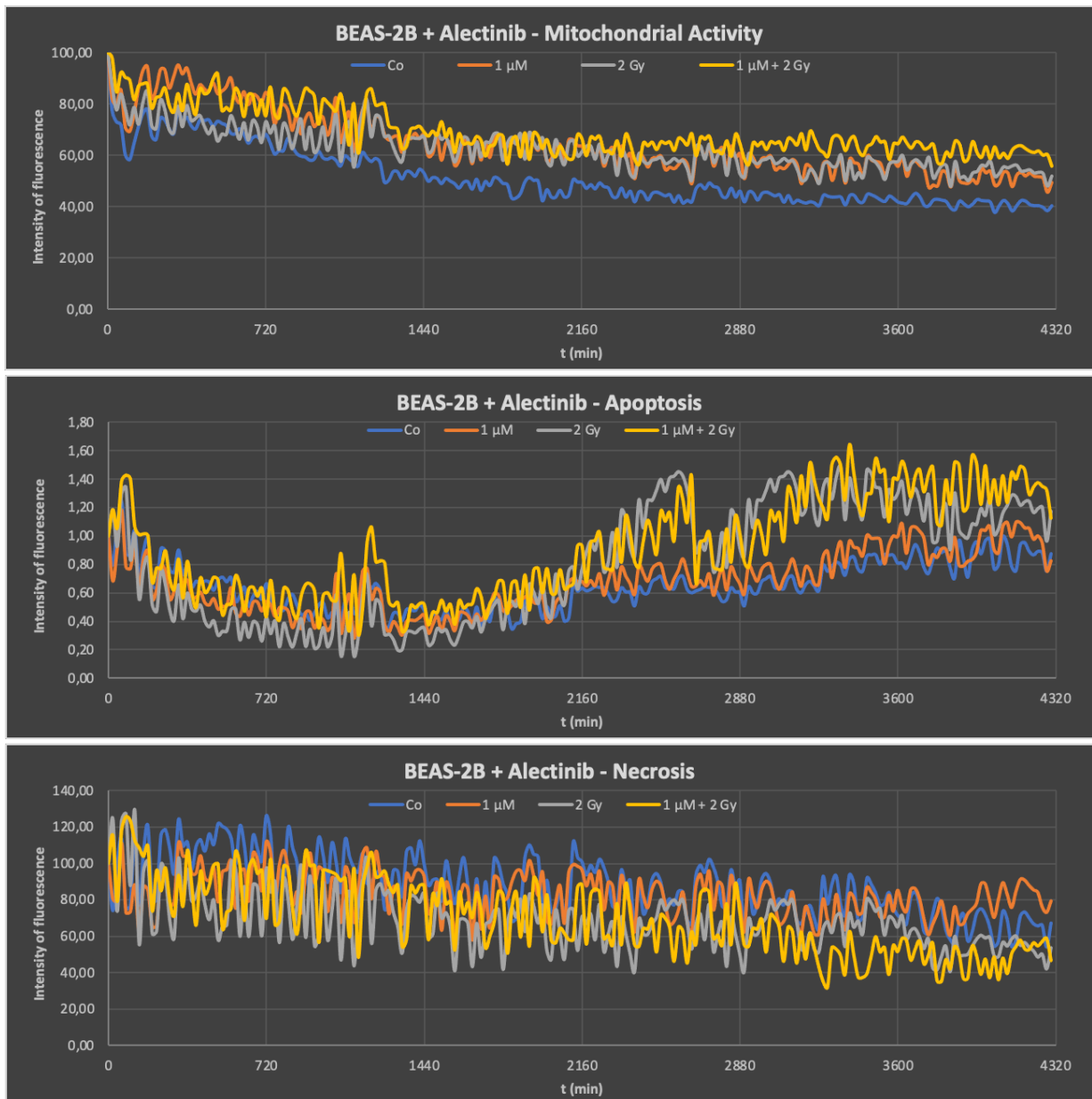


Abbildung 17: Fluoreszenz-Intensitätskurven vom Versuch BEAS-2B mit Alectinib

Von oben nach unten: Mitochondrien-Aktivität, Apoptose-Aktivität, Nekrose-Aktivität. Die blauen Kurven beschreiben die Zellen der Kontrolle, die orangenen Kurven die der Behandlung mit 1 μM des TKIs, die grauen Kurven die der reinen Bestrahlung mit 2 Gy und die gelben Kurven die der Kombinationstherapie mit 1 μM TKI und gleichzeitiger Bestrahlung mit 2 Gy. Man erkennt keine großen Unterschiede zwischen den einzelnen Konditionen. Nur einen leichten Anstieg der Apoptoseaktivität (Abb.9) nach Bestrahlung bzw. Kombinationstherapie bei ca. t (2560).

Ergebnisse

Die erste Grafik der nächsten Versuchsreihe (Abbildungen 18) zeigt die Aktivität der Mitochondrien der BEAS-2B Zellen. Man erkennt anfangs keine großen Unterschiede der einzelnen Kurven. Jedoch wenn man sie einzeln betrachtet, fällt auf, dass der Abfall der Kurven bei $t = 2250$ min am stärksten in denen der Bestrahlung und der Kombinationstherapie ausfällt, sowie beim Zeitpunkt $t = 2160$ unterscheiden sich fast alle Kurven signifikant zur Kontrollgruppe. Die p-Werte bewegen sich zwischen $p = 0,318 - 0,04$. In der nächsten Figur, welche die Apoptose Aktivität zeigt, kann man eine Tendenz erkennen, dass sowohl das Medikament Crizotinib (orangene Kurve, $p = 0,146$) als auch die einmalige Bestrahlung mit 2 Gy (graue Kurve, $p = 0,467$) eine Wirkung auf die Zellen hat. Am stärksten lösten die ionisierende Strahlung und die Kombination aus Medikament und Bestrahlung (gelbe Kurve, $p = 0,126$) die Apoptose aus (Tabelle 1: Apoptose Maximalwerte). Auch in der nächsten Grafik erkennt man, dass bei der alleinigen Behandlung keine erhöhten Nekrose Werte zu erkennen sind. Die bereits sehr hohen Startpunkte der Kurven im Diagramm der Nekrose lassen sich auf einige bereits nekrotischen Zellen zurückführen, welche von Anfang an mit in den Chip eingesetzt worden waren. Proportional zu den anderen Kurven sind auch hier die Kurven der Bestrahlung und Kombinationstherapie am steilsten.

Tabelle 2: Apoptose-Maximalwerte des Versuchs BEAS-2B mit dem TKI Crizotinib

Die einmalige Bestrahlung mit 2 Gy und die Kombinationstherapie lösten bei den BEAS-2B Zellen eine starke Apoptose aus

	t (min)	Maximalwerte (Intensität)
Kontrolle	t (3810)	2,5
Behandlung mit Crizotinib (1 μ M)	t (2100)	3,2
Bestrahlung (1x 2Gy)	t (2400)	6,2
Kombination (2 Gy + 1 μ M)	t (2400)	6,2

Ergebnisse

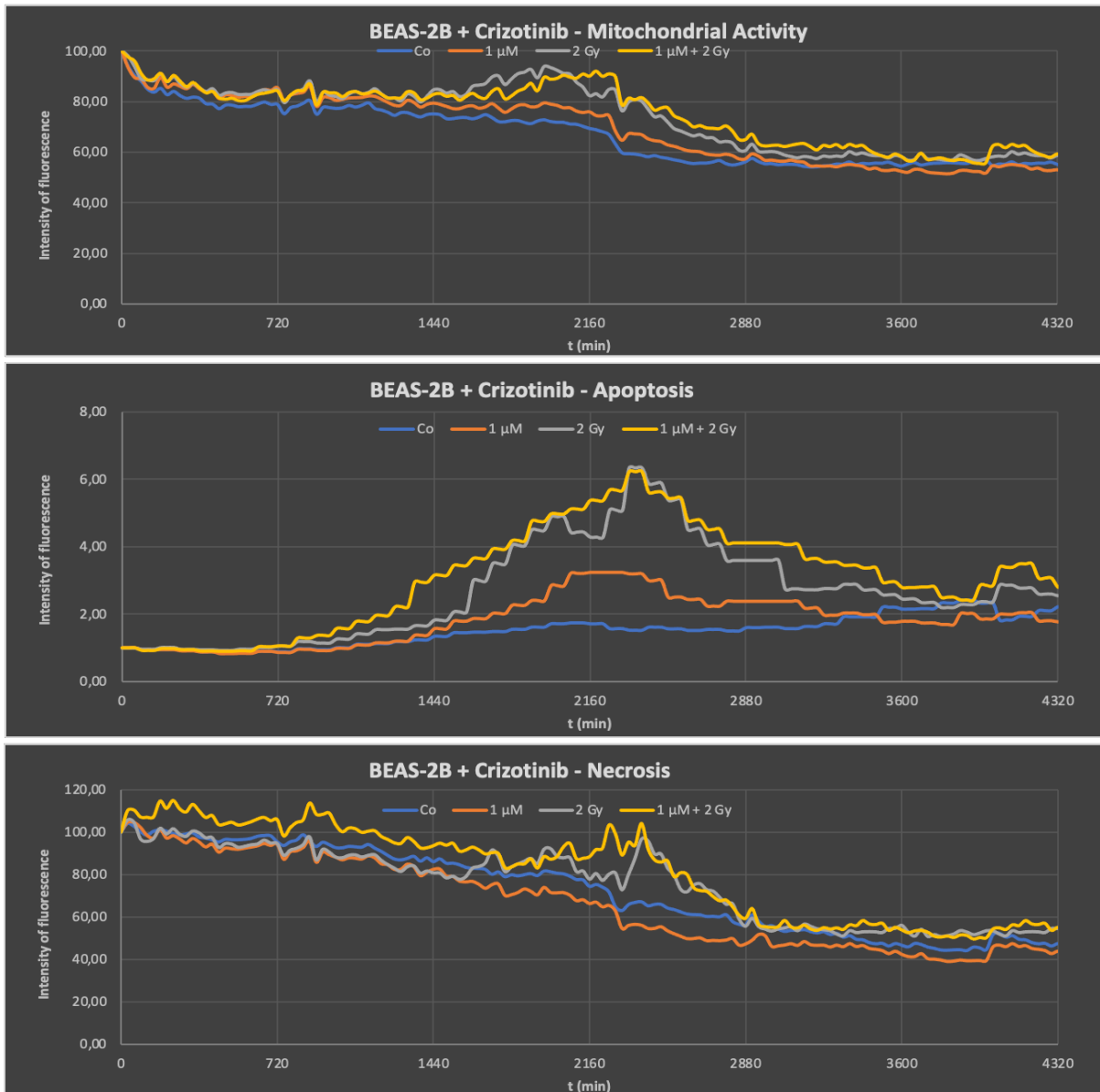


Abbildung 18: Fluoreszenz-Intensitätskurven vom Versuch BEAS-2B mit Crizotinib

Von oben nach unten: Mitochondrien-, Apoptose- und Nekrose-Aktivität. Die blauen Kurven beschreiben die Zellen der Kontrolle, die orangenen Kurven die der Behandlung mit 1 μM des TKIs, die grauen Kurven die der reinen Bestrahlung mit 2 Gy und die gelben Kurven die der Kombinationstherapie mit 1 μM TKI und gleichzeitiger Bestrahlung mit 2 Gy. Die Bestrahlung und die Kombinationstherapie lösen bei den BEAS-2B Zellen am ehesten eine Apoptose aus. Die Behandlung allein scheint weniger wirksam zu sein.

Ergebnisse

Mehrere Versuche der A549 Zellreihe mit gleichzeitiger Behandlung von Alectinib und Bestrahlung (Abbildungen 19) zeigten, dass - zumindest mit dieser Methodik - keine relevanten Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Reaktion der Zellen darauf war nicht nur verzögert, sondern gar nicht vorhanden. Statistisch betrachtet lassen sich nur p-Werte über 0,05 abgrenzen. Es zeigte sich keine Apoptose Aktivität, auch wenn die Graphen ab ca. $t = 1200$ min zu steigen scheinen. Die Intensitätswerte der Apoptose in dieser Versuchsreihe bewegten sich alle in einem Bereich von ca. 0,20 – 1,00 (Tabelle 2 zum Vergleich: Intensitätswerte der Apoptose des Versuches BEAS-2B + Crizotinib -> ca. 1,0 – 6,5). Die Mitochondrien- und Nekrose Werte waren in allen Konditionen ähnlich, mit der Ausnahme, dass jene Zellen, die entweder die einmalige Bestrahlung oder die Bestrahlung in Kombination mit dem Medikament bekamen, geringfügig schneller nekrotisch wurden als die anderen. Die hohen Anfangswerte in allen drei Diagrammen lassen sich durch die anfängliche Form der Zellen erklären. Da sie vor der Adhäsion noch kugelig vorliegen, konzentriert sich der Farbstoff und das Signal wird an einer Stelle summiert und dementsprechend hoch fallen die Intensitätswerte aus. Sobald sich die Zellen jedoch anheften und langziehen, pendelt sich dieser ein. Dieser Effekt scheint bei den Tumorzellen (A549) stärker auszufallen als bei den physiologischen Zellen (BEAS-2B). Der rapide Abfall der Mitochondrien Aktivität um ca. 3600 min herum lässt sich zudem durch Photobleaching und durch den Computer nicht mehr mögliche Nachbelichtung erklären. Denn bildmorphologisch lässt sich kein Massenzellsterben abgrenzen. Ebenso wie im vorherigen Textabschnitt, lassen sich die hohen Nekrose Werte durch bereits im Chip befindenden nekrotischen Zellen erklären.

Ergebnisse

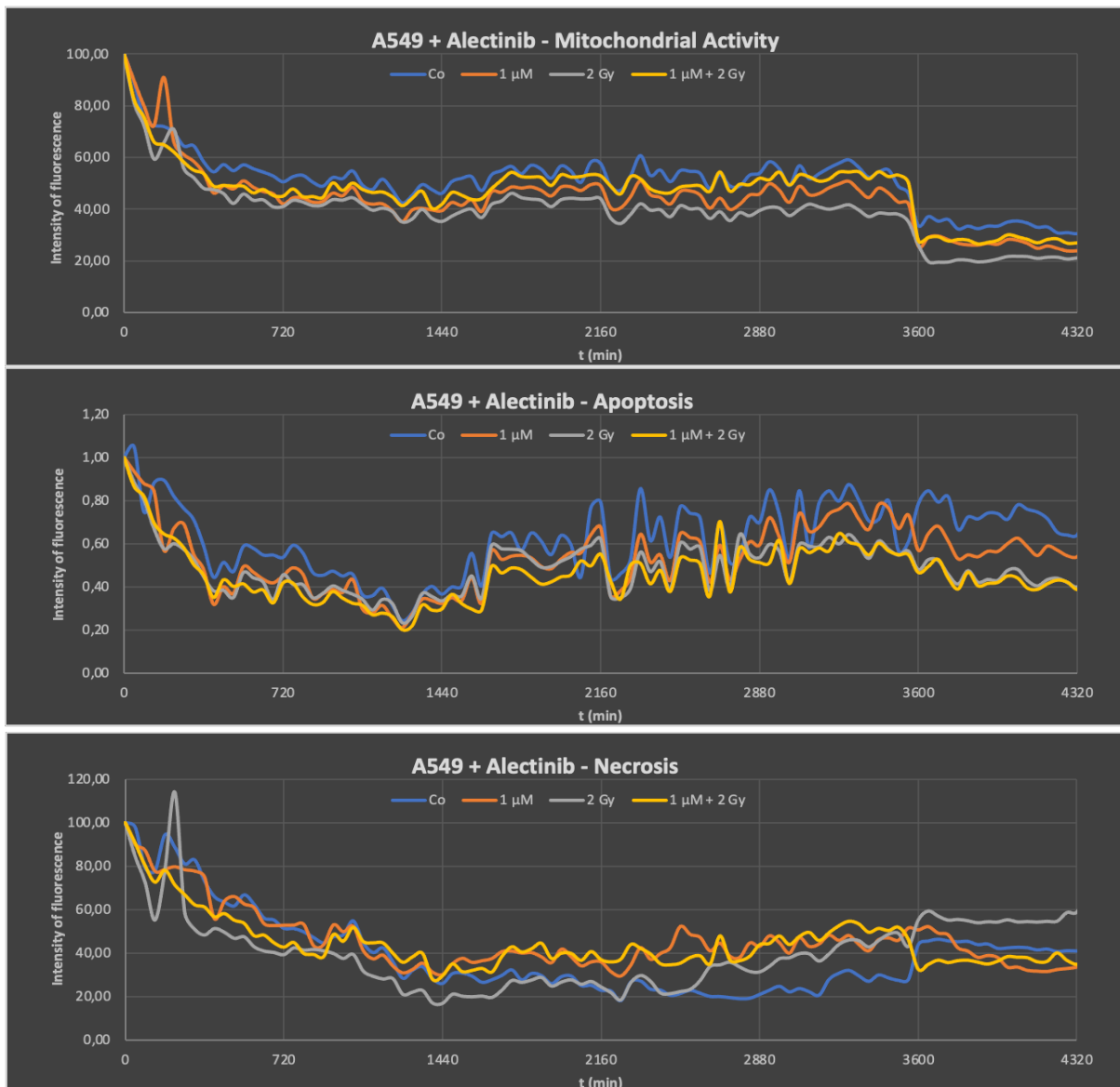


Abbildung 19: Fluoreszenz-Intensitätskurven vom Versuch A549 mit Alectinib

Die Grafiken zeigen von oben nach unten die Fluoreszenz-Intensitätskurven der Mitochondrien-, Apoptose- und Nekrose Aktivität vom Versuch A549 mit dem TKI Alectinib. Die vier Kurven der verschiedenen Konditionen (Kontrolle, Behandlung, Bestrahlung und Kombinationstherapie) unterscheiden sich kaum in den verschiedenen Zuständen.

Ergebnisse

Die drei Graphen der Abbildung 20 zeigen den Versuch der A549 mit dem Medikament Crizotinib und gleichzeitiger einmaliger ionisierender Bestrahlung mit 2 Gy. Diese Versuchsreihe stellte sich genau wie die vorherigen Experimente dar. Die Tumorzellen reagierten kaum bis gar nicht, weder auf die Gabe vom Medikament noch auf Bestrahlung. Man konnte keine nennenswerten Veränderungen bei der Beobachtung von Mitochondrien-, Apoptose- oder Nekrose Aktivität feststellen. Die hohen Mitochondrien- und Nekrosewerte lassen sich ebenfalls durch die Ausgangsform der Zellen und bereits abgestorbene erklären.

Tabelle 3: Gemessene Intensitätsbereich der Apoptose Aktivität der verschiedenen Versuchsreihen

Erwartungsgemäß würde man nach ca. 1,5 Tage eine Reaktion der Zellen auf das Medikament oder die Bestrahlung erwarten. Wir konnten jedoch nur bei der Behandlung von BEAS-2B Zellen mit dem TKI Crizotinib eine Apoptose Reaktion erfassen.

Versuchsreihen (Zellen + TKI)	Intensitätsbereich der Apoptose zwischen t = 2160 und t = 2880
BEAS-2B + Alectinib	Ca. 0,5 – 1,4
BEAS-2B + Crizotinib	Ca. 1,5 – 6,2
A549 + Alectinib	Ca. 0,3 – 0,8
A549 + Crizotinib	Ca. 1,0 – 2,0

Ergebnisse

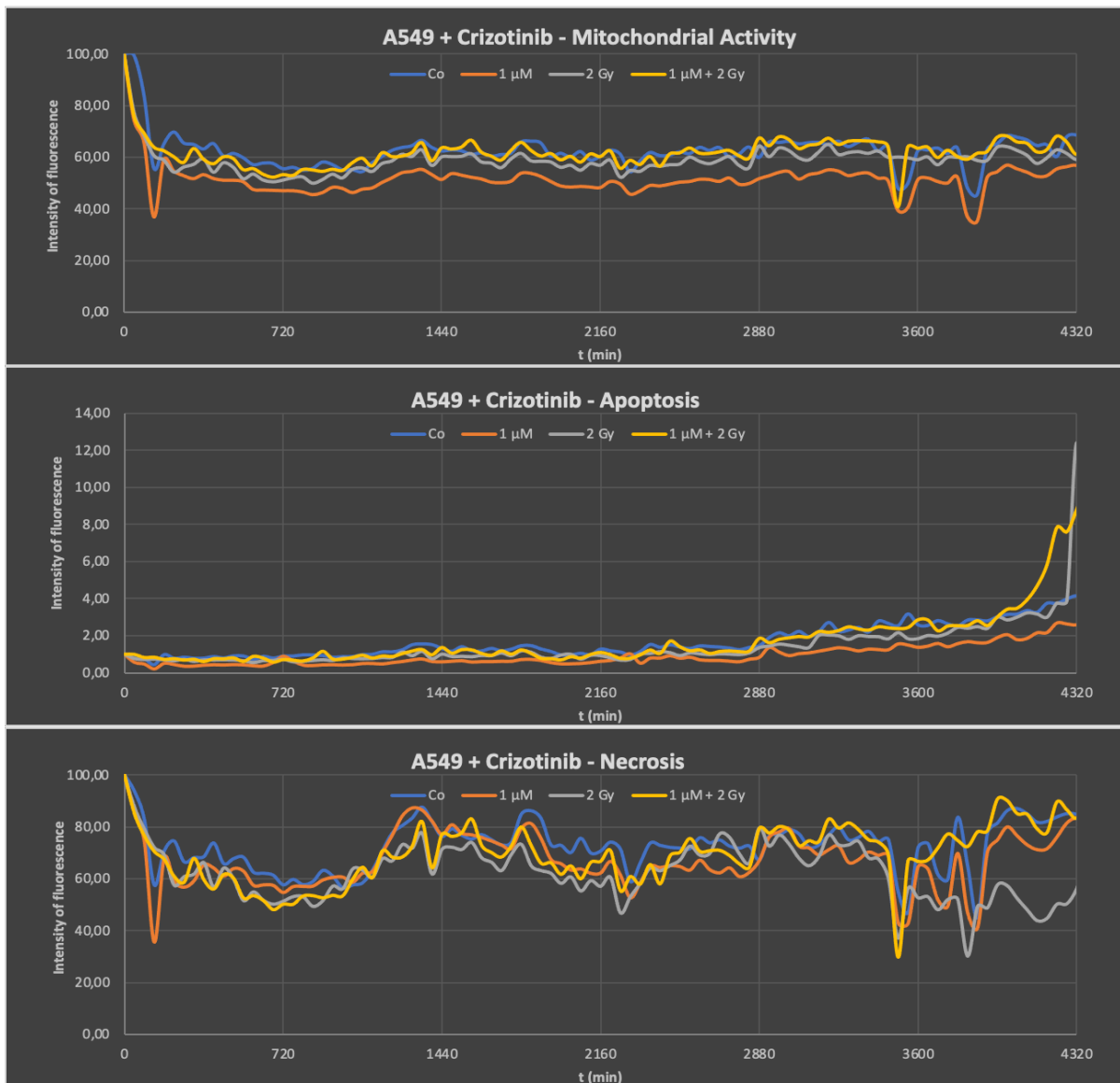


Abbildung 20: Fluoreszenz-Intensitätskurven vom Versuch A549 mit Crizotinib

Von oben nach unten sind dargestellt die Fluoreszenz-Intensitätskurven der Zustände: Mitochondrien-, Apoptose- und Nekrose-Aktivität der Zellen des Versuchs A549 mit dem TKI Crizotinib. Auch hier, wie in den bereits beschriebenen oberen Grafiken zu A549, gibt es keine große Reaktion der Zellen auf das Medikament. Alle Kurven der verschiedenen Konditionen der verschiedenen Zustände unterscheiden sich kaum.

5.3 U251 + Perampanel

Abbildung 21 gibt den Versuch U251 Zellen mit der Behandlung von Perampanel wieder. Man erkennt, dass die Mitochondrienaktivität von Anfang bis Ende hoch erhalten bleibt und nur gegen Ende findet man nekrotische Signale. Schaut man sich die Nekroseaktivität an, so sieht man, dass alle Konditionen zum Zeitpunkt $t = 2160$ (verglichen mit der Kontrollgruppe) sich signifikant unterscheiden. Die p-Werte des t-Test lagen alle unter 0,05. Jedoch muss man dies kritisch betrachten, da auch die Zellen der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt unabhängig von Medikament oder Bestrahlung nekrotische Aktivität aufweist. Obwohl die Apoptose um ca. $t = 1000$ min herum zu steigen scheint, ist diese irrelevant, da sie sich nur in einem Bereich von 0,0 – 0,2 bewegt (zum Vergleich: BEAS-2B + Alectinib: 1,0 – 6,2).

Ein anderer Versuch dieser Versuchsreihe zeigt Abbildung 22. Dieser verhält sich ebenfalls wie der Vorherige. Die Mitochondrienaktivität ist von Anfang bis zum Ende hin kräftig, was man im Farbbildkorrelat auch gut sehen kann (Abbildung 23). Die Apoptose fällt geringfügig stärker aus als im vorherigen Versuch, aber die Nekroseaktivität dagegen steigt nicht proportional. Zwar wurden die Zellen der Kombinationstherapie ($1\mu\text{M} + 2 \text{ Gy}$) schneller nekrotisch, aber die Zellen der anderen Konditionen verhalten sich konstant zum vorherigen Versuch.

Ergebnisse

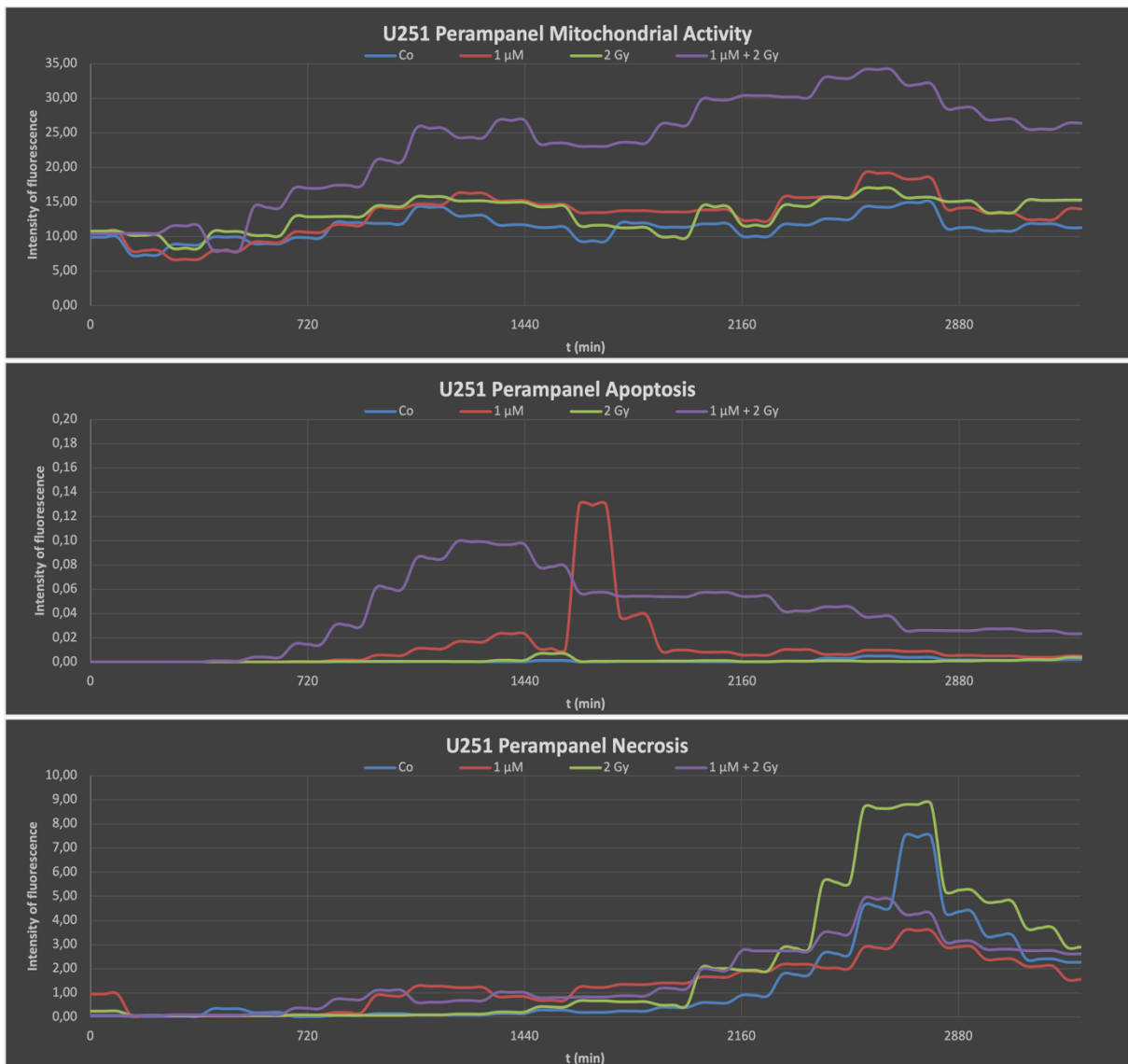


Abbildung 21: Fluoreszenz-Intensitätskurven vom Versuch U251 mit Perampanel (V1)

Die Grafiken zeigen von oben nach unten die Fluoreszenz-Intensitätskurven der Mitochondrien-, Apoptose- und Nekroseaktivität vom Versuch U251 mit Perampanel. Es sind keine nennenswerten Unterschiede in allen drei Kurvendiagrammen zu sehen. Die scheinbare Steigung der Apoptose Aktivität ist mit einem Bereich von 0,0 – 0,2 nicht aussagekräftig und somit zu vernachlässigen. Ebenso die Intensitätssteigerung der Nekrose gegen Ende des Versuchs lässt sich nicht auf die Behandlung oder Bestrahlung zurückführen.

Ergebnisse

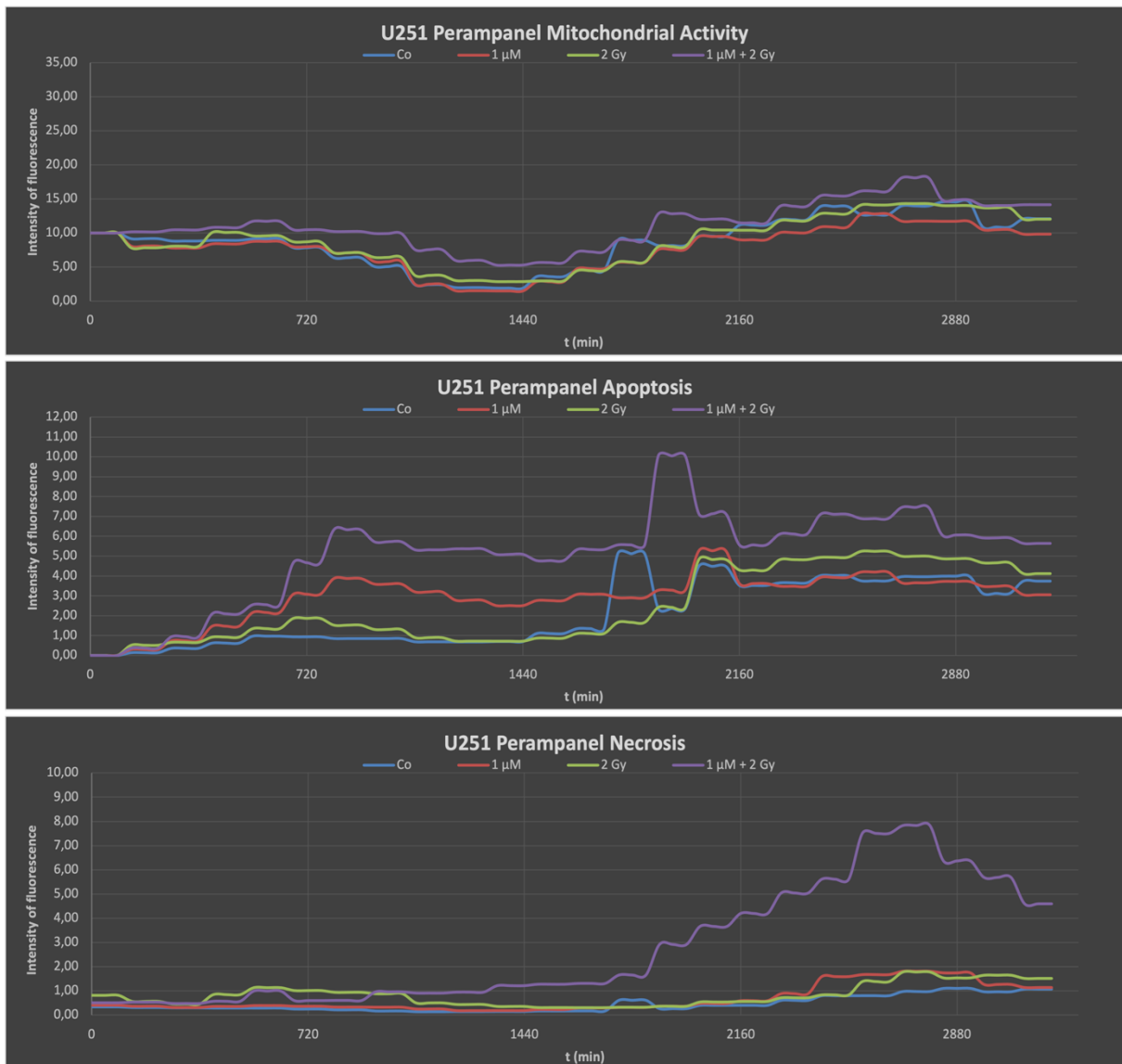


Abbildung 22: Fluoreszenz-Intensitätskurven vom Versuch U251 mit Perampanel (V2)

Von oben nach unten werden hier die Fluoreszenz-Intensitätskurven der Mitochondrien-, Apoptose- und Nekroseaktivität vom Versuch U251 mit Perampanel gezeigt. Auch dieser Versuch verhält sich ähnlich wie der zuvor gezeigte. Es gibt kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Konditionen der beobachteten Zustände. Hier reagierten die U251 Zellen nach der Kombinationstherapie etwas mehr apoptotisch und wurden schließlich nekrotisch als im Vorversuch.

Ergebnisse

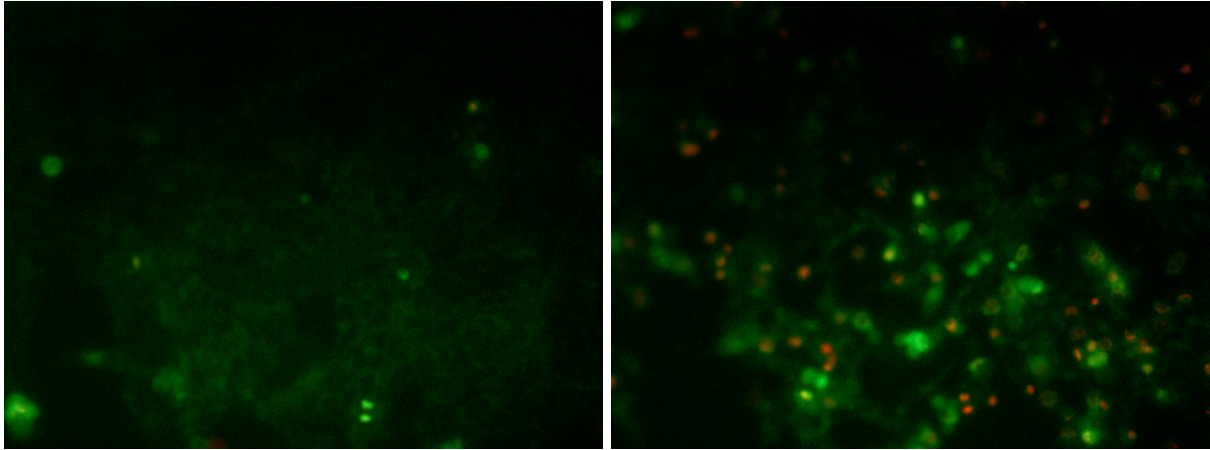


Abbildung 23: Fluoreszenzfarbbild vom Versuch U251 mit Perampanel

Das linke Bild wurde ca. 2 h nach Einsäen in den Chip aufgenommen und das rechte Bild zeigt eine Aufnahme nach ca. 48 h. Es wurden dieselben Fluoreszenzfarbstoffe wie in den vorherigen Versuchen verwendet (TMRM/grün = Mitochondrienaktivität, CellEvent Caspase 3/7 /blau =Apoptoseaktivität, DRAQ7/rot = Nekroseaktivität). In der Spätaufnahme (rechts) erkennt man neben dem grünen Signal nur wenig von den anderen Farbstoffen (vereinzelt rote Stellen, aber kein blau).

6. Diskussion

Mit unserer Methode der Lebendzellaufnahmen konnten wir zelluläre Vorgänge gut beobachten und beschreiben. So haben wir bei unseren Versuchen hinsichtlich der CiC Aktionen von BEAS-2B Zellen in fast jeder aufgenommenen Position mehrere nicht professionelle Phagozytosen beobachten können. Wir konnten diese zeitlich und bildlich aufzeichnen. Den Mechanismus der Beseitigung nekrotischer Zellen durch ‚normale‘ Zellen, welche keine Makrophagen sind (Schwegler, Wirsing, Dollinger, *et al.*, 2015), konnten wir durch diese Methodik bestätigen. Als Ursachen für den Farbverlust der phagozytierten Zellen sind sowohl ein schneller Abbau der aufgenommenen Zellen als auch eine Verdünnung des Farbstoffes denkbar. Denn die Phagozytenzelle nimmt mit Aufnahme und Zersetzung der nekrotischen Zelle ebenso etwas Farbstoff aus der ursprünglichen Zelle mit auf, weshalb dieser möglicherweise nicht mehr in ausreichender Konzentration vorliegend ist und daher nicht genügend an die dsDNA beider Zellen anreichert und anfärbt. Jedoch weshalb und wann eine solche Zelle eine nicht professionelle Phagozytose durchführt, lässt sich daraus nicht schließen. Wir können nur vermuten, dass mehrere Faktoren dies begünstigen. Zum einen wären der allgemeine Platz- und Nährstoffmangel denkbar, sowie die Verminderung freigesetzter Mediatoren durch nekrotische Zellen (Schwegler, Wirsing, Dollinger, *et al.*, 2015; Joffe, Bakalar and Fletcher, 2020). Was schlussendlich dafür in Frage kommt, müsste man in einer anderen Versuchsreihe genauer untersuchen. Dass dieser Vorgang jedoch großen Einfluss hinsichtlich der Tumorprognose hat, ist durchaus denkbar. Da CiC bereits auch im Tumorgewebe beobachtet worden ist (Schenker *et al.*, 2017).

Die Ergebnisse zur Versuchsreihe der BEAS-2B/A549 Zellen mit gleichzeitiger Bestrahlung und Behandlung von TKIs (Alectinib und Crizotinib) wurden bereits in ‚*Influence of alectinib and crizotinib on ionizing radiation - in vitro analysis of ALK/ROS1-wildtype lung tissue cells*‘ vorgestellt. Weshalb hier nur kurz auf die wichtigsten Punkte eingehen werden. Die gleichzeitige Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren und Strahlentherapie kann zu unerwarteten und teilweise schweren Nebenwirkungen führen (Hecht *et al.*, 2018). Es liegen jedoch zu wenige Daten vor, um dies genau zu definieren. Daher wurden sukzessiv Versuche durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine Kombinationstherapie der ALK/ROS1-Kinase-Inhibitoren Crizotinib (*first generation TKI*) oder Alectinib (*second generation TKI*) mit ionisierender Strahlung die Wirkung der Strahlentherapie insbesondere im normalen Gewebe (ALK/ROS1-Wildtyp) beeinflussen könnte. Lebendzellaufnahmen wurden für einen Nachweis der

mitochondrialen Aktivität, Apoptose und Nekrose im zeitlichen Kontext verwendet. Zeitaufgelöste Daten geben direkt nach der Behandlung tiefere Einblicke in zelluläre Prozesse. Im Allgemeinen führte die Behandlung mit beiden Inhibitoren gleichzeitig mit ionisierender Strahlung meist nicht zu einer Erhöhung der Toxizität bei BEAS-2B und A549 (ALK/ROS1 wt). Allein Crizotinib scheint bei BEAS-2B im Vergleich zu A549 mit Crizotinib eine stärkere apoptotische Reaktion auszulösen. Hier sehen wir möglicherweise einen Einfluss des malignen und nicht-malignen Ursprungs der beiden Zelllinien. Entsprechend den Kennzeichen von malignem Gewebe ist es wahrscheinlich, dass Tumorzellen (wie z.B. A549) blockierte oder unzureichende Apoptose-Signalwege besitzen (Zhou *et al.*, 2014). Eine zusätzliche Bestrahlung führte nicht zu einer Erhöhung des Zelltods. Dies könnte im Hinblick auf das Risiko einer Strahlenpneumonitis als einer der häufigsten Nebenwirkungen bei der Behandlung von NSCLC von Interesse sein. Wir konzentrierten uns auf die Behandlung der Zellen mit 1 μ M TKI, was eine physiologisch relevante Konzentration darstellt (Alecensa; FDA-Zulassung „prescribing information“). Die G2-Blockierung nach Behandlung mit Crizotinib (Zhou *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2019) und die damit einhergehende Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung (Sinclair, 2012), was wiederum zu erhöhtem Zelltod führt, sahen wir mit unserer Methode nicht. Dies könnte an mehreren Faktoren liegen. Zum einen kann ein G2-Arrest auch zu ausgeprägter Seneszenz (Gire and Dulić, 2015, p. 2) statt zum Zelltod führen und zum anderen könnte die Konzentration des TKIs nicht ausreichend hoch gewesen sein. Auch wenn 1 μ M, wie oben genannt, der physiologisch relevanten Konzentration entsprach, konnten wir keine Toxizität anhand steigender Nekroseaktivität feststellen. Eventuell hätte man bei längerer Aufnahmedauer (>3 Tage) und/oder höherer TKI-Konzentration andere Ergebnisse erzielen können. Jedoch würde dies weitere technische Hürden mit sich bringen. Wir machten die Erfahrung, dass die Zellen nach Wechsel des Mediums schneller nekrotisch wurden. Dies könnte an dem zu hohen Druck durch das Eingeben der Flüssigkeit durch die 1 ml Spritze und Schlauchsystem liegen, weshalb man bei längeren Aufnahmen die Aufbewahrung der Zellen überdenken sollte und gegebenenfalls ein größeres Behältnis wählen müsste. Außerdem müsste man durch vermehrte Aufnahmen mit Fluoreszenz, ebenfalls einen erhöhten Photobleaching und Phototoxizitätseffekt beachten. Würde man jedoch nur die Konzentration des TKIs erhöhen bei gleichbleibender Aufnahmedauer, sollten die Experimente ohne Probleme durchführbar sein.

Nach den bestehenden Erkenntnissen über den Zusammenhang von neuronaler Aktivität, Aktivität des Glutamat-Rezeptors und progredientem Wachstum von Glioblastomen (Lange *et al.*, 2019; Venkataramani *et al.*, 2019) wurden mehrere Studien über den Mehrwert von Inhibitoren des AMPA-Rezeptors durchgeführt. Das Antiepileptikum Perampanel, welches bereits zugelassen ist (Strzelczyk *et al.*, 2019; European Medicines Agency, 2020), spielt dabei eine zentrale Rolle (Rösche *et al.*, 2015; Lange *et al.*, 2019). Wie in der vorherigen Versuchsreihe konnten wir hier mittels Lebendzellaufnahmen die Prozesse auf zellulärer Ebene hinsichtlich Mitochondrien-, Apoptose- und Nekroseaktivität als zeitaufgelöste Daten wiedergeben. Wir verwendeten die U251 Zellreihe, da diese dem IDH/MGMT Wildtyp entspricht. Da bereits für Glioblastome mit IDH Mutation bzw. Translokation des MGMT-Rezeptors eine Therapie nach Goldstandard besteht (Gritsch, Batchelor and Gonzalez Castro, 2022), konzentrierten wir uns auf die Fragestellung, wie der Wildtyp mit dem Medikament Perampanel, welches ein selektiver, nicht-kompetitiver Antagonist des ionotropen AMPA-Rezeptors ist, interagiert. Im Allgemeinen wirkte die Behandlung der Zellen bei gleichzeitiger ionisierender Bestrahlung nicht toxisch. Die Mitochondrienaktivität war in allen Versuchen vom Anfang bis Ende hoch. Mit dem Hintergrundwissen, dass bei Blockierung des Glutamat-Rezeptors, welcher durch den AMPA-Rezeptor dargestellt wurde, lediglich das progrediente Wachstum der Tumorzellen gehemmt wird (Takano *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2019), konnten wir dieses durch unsere Beobachtung bestätigen. Wir konnten zum einen zeigen, dass die Zellpopulation sich bildmorphologisch nicht verändert hat. Man konnte lediglich sehen, dass gegen Ende des Versuchs sich eher Zellhaufen gebildet haben, anstatt dass diese verstreut lagen. Zudem war, wie oben bereits beschrieben, die Mitochondrienaktivität konstant hoch, was für eine gute Zellgesundheit, selbst am Ende des Versuches, spricht. Jedoch konnte keine Steigerung der Fluoreszenzintensität der Mitochondrien festgestellt werden. Dies spricht auch wieder für kein progredientes Wachstum der Tumorzellen. Auch die zusätzliche einmalige Behandlung mit ionisierender Strahlung zeigte beim IDH/MGMT Wildtyp keine Wirkung. Hier sehen wir möglicherweise die Unempfindlichkeit der Glioblastomzellen gegenüber der Bestrahlung und die damit einhergehende Schwierigkeit in der derzeitigen Behandlung vom IDH/MGMT Wildtypen (Noch, Ramakrishna and Magge, 2018). Die fehlende Reaktion der Tumorzellen auf die Bestrahlung könnte aber auch an der zu geringen und nur einmalig durchgeführten Methode liegen. Zudem könnte die Ursache auch die zu kurze Beobachtung sein. Somit wäre auch in dieser Versuchsreihe eine längere

Aufnahmedauer eventuell interessant. Dies bringt jedoch die gleichen Schwierigkeiten mit sich, wie zuvor im Text bereits genannt.

Unsere verschiedenen Versuche mit der Lebendzellmikroskopie zeigten uns die Vor- und Nachteile mit dieser Methode auf. Gut geeignet für diese bestimmte Durchführung sind Aufnahmen in einem Zeitraum von ca. drei bis fünf Tagen. Es sind sehr gute bildmorphologische Beobachtungen auf zellulärer Ebene möglich, welche als eine Verlaufskontrolle oder als zusätzliche Ergebnisse für bestehende Studien dienen können. Zellprozesse, wie zum Beispiel unsere Versuche der CiC Ereignisse, können mit Hilfe dieser Methode optimal aufgezeichnet werden. Auch die Fluoreszenzfarbstoffauswahl ist, trotz leichter Überlappung der Spektren, ausreichend unterschiedlich, sodass die drei Zustände (Mitochondrien-, Apoptose- und Nekroseaktivität) gut voneinander abgrenzbar sind. Sollten Zellen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, wobei ein Wechsel des Zellenmediums notwendig ist, müsste ein anderes Behältnis für die Zellen gewählt werden. Denn, wie oben bereits beschrieben, gehen die Zellen möglicherweise durch den zu hohen Druck oder die zu großen Scherkräfte durchs Einbringen neuer Flüssigkeiten unter. Zudem limitieren die Effekte des Photobleaching und der Phototoxizität die Möglichkeit längerer Aufnahmen mit der Fluoreszenzlampe (Diaspro *et al.*, 2006; Icha *et al.*, 2017). Man müsste den kompletten Aufbau überdenken, eventuell unmittelbar mit höheren Konzentrationen starten bzw. die Beleuchtung mit der Fluoreszenz-Quelle zeitlich minimieren.

7. Literaturverzeichnis

- abcam (no date) 'DRAQ7™ (ab109202)'. Available at: <https://www.abcam.com/draq7trade-ab109202.html> (Accessed: 30 August 2021).
- Abramowitz, M., et al. (no date) 'Anatomy of the Fluorescence Microscope'. Available at: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-re-source/primer/techniques/fluorescence/anatomy/fluoromicroanatomy/> (Accessed: 26 October 2021).
- Alice T. Shaw, M.D., Ph.D (2014) 'Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer', *The New England Journal of Medicine*, 20 November. Available at: https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1406766#article_citing_articles.
- Allen, T. *et al.* (2020) 'Prevalence of ALK mutations in advanced NSCLC patients in the United States: Analysis with a real world oncology database.', *Journal of Clinical Oncology*, 38(15_suppl), pp. e21586–e21586. Available at: https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e21586.
- Avrillon, V. and Pérol, M. (2017) 'Alectinib for treatment of ALK-positive non-small-cell lung cancer', *Future Oncology*, 13(4), pp. 321–335. Available at: <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0386>.
- Bade, B.C. and Dela Cruz, C.S. (2020) 'Lung Cancer 2020', *Clinics in Chest Medicine*, 41(1), pp. 1–24. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>.
- Baselet, B. *et al.* (2019) 'Pathological effects of ionizing radiation: endothelial activation and dysfunction', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(4), pp. 699–728. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2956-z>.
- Bauer, M.F. *et al.* (2021) 'Cell-in-cell phenomenon: leukocyte engulfment by non-tumorigenic cells and cancer cell lines', *BMC Molecular and Cell Biology*, 22(1), p. 39. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12860-021-00377-3>.
- Centonze Frohlich, V. (2008) 'Phase Contrast and Differential Interference Contrast (DIC) Microscopy', *Journal of Visualized Experiments*, (17), p. 844. Available at: <https://doi.org/10.3791/844>.
- Chen, S. and Gouaux, E. (2019) 'Structure and mechanism of AMPA receptor — auxiliary protein complexes', *Current Opinion in Structural Biology*, 54, pp. 104–111. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.01.011>.
- Cole, R. (2014) 'Live-cell imaging: The cell's perspective', *Cell Adhesion & Migration*, 8(5), pp. 452–459. Available at: <https://doi.org/10.4161/cam.28348>.
- Cooper, J.R. *et al.* (2016) 'Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II

- Pneumocyte Phenotype', *PLOS ONE*. Edited by F. Cappello, 11(10), p. e0164438. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164438>.
- Diaspro, A. *et al.* (2006) 'Photobleaching', in J.B. Pawley (ed.) *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*. Boston, MA: Springer US, pp. 690–702. Available at: https://doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2_39.
- European Medicines Agency (2017) 'Xalkori crizotinib'. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/xalkori-epar-summary-public_en.pdf (Accessed: 29 October 2021).
- European Medicines Agency (2018) 'Alecensa (alectinib) An overview of Alecensa and why it is authorised in the EU'. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/alecensa-epar-summary-public_en.pdf (Accessed: 29 October 2021).
- European Medicines Agency (2020) 'Fycompa (perampanel) An overview of Fycompa and why it is authorised in the EU'. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/fycompa-epar-medicine-overview_en.pdf (Accessed: 29 October 2021).
- Fais, S. and Overholtzer, M. (2018) 'Cell-in-cell phenomena in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 18(12), pp. 758–766. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0073-9>.
- Fournier, M. (1996) *The fabric of life: microscopy in the seventeenth century*. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Gadgeel, S.M., Ramalingam, S.S. and Kalemkerian, G.P. (2012) 'Treatment of Lung Cancer', *Radiologic Clinics of North America*, 50(5), pp. 961–974. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2012.06.003>.
- Gerabek, W.E. (2005) *Enzyklopädie Medizingeschichte*. Berlin New York: Walter de Gruyter.
- Gerlach, D. (2009) *Geschichte der Mikroskopie*. 1. Aufl. Frankfurt am Main: Harri Deutsch.
- Gire, V. and Dulić, V. (2015) 'Senescence from G2 arrest, revisited', *Cell Cycle*, 14(3), pp. 297–304. Available at: <https://doi.org/10.1080/15384101.2014.1000134>.
- Good, N.E. *et al.* (1966) 'Hydrogen Ion Buffers for Biological Research *', *Biochemistry*, 5(2), pp. 467–477. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi00866a011>.
- Gritsch, S., Batchelor, T.T. and Gonzalez Castro, L.N. (2022) 'Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system', *Cancer*, 128(1), pp. 47–58. Available at:

<https://doi.org/10.1002/cncr.33918>.

Han, X. *et al.* (2020) 'Human lung epithelial BEAS-2B cells exhibit characteristics of mesenchymal stem cells', *PLOS ONE*. Edited by G. Papaccio, 15(1), p. e0227174. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227174>.

Hecht, M. *et al.* (2018) 'Clinical outcome of concomitant vs interrupted BRAF inhibitor therapy during radiotherapy in melanoma patients', *British Journal of Cancer*, 118(6), pp. 785–792. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.489>.

Hida, T. *et al.* (2017) 'Alectinib versus crizotinib in patients with ALK -positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial', *The Lancet*, 390(10089), pp. 29–39. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30565-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30565-2).

Huang, R.-X. and Zhou, P.-K. (2020) 'DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), p. 60. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0150-x>.

Icha, J. *et al.* (2017) 'Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it', *BioEssays*, 39(8), p. 1700003. Available at: <https://doi.org/10.1002/bies.201700003>.

Ishiuchi, S. *et al.* (2002) 'Blockage of Ca²⁺-permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells', *Nature Medicine*, 8(9), pp. 971–978. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm746>.

Iwahara, T. *et al.* (1997) 'Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system', *Oncogene*, 14(4), pp. 439–449. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200849>.

Jiang, W. and Yin, Z. (2016) 'Seeing the invisible in differential interference contrast microscopy images', *Medical Image Analysis*, 34, pp. 65–81. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.media.2016.04.010>.

Joachim Herz Stiftung (no date) 'Mikroskop-Geschichte'. Available at: <https://www.leifiphysik.de/optik/optische-linsen/geschichte/mikroskop-geschichte> (Accessed: 3 August 2022).

Joffe, A.M., Bakalar, M.H. and Fletcher, D.A. (2020) 'Macrophage phagocytosis assay with reconstituted target particles', *Nature Protocols*, 15(7), pp. 2230–2246. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0330-8>.

Jost, T. *et al.* (2022) 'Influence of alectinib and crizotinib on ionizing radiation - in vitro analysis of ALK/ROS1-wildtype lung tissue cells', *Neoplasia*, 27, p. 100780. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100780>.

- Kazandjian, D. *et al.* (2014) 'FDA Approval Summary: Crizotinib for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer With Anaplastic Lymphoma Kinase Rearrangements', *The Oncologist*, 19(10), pp. e5–e11. Available at: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0241>.
- Kiepas, A. *et al.* (2020) 'Optimizing live-cell fluorescence imaging conditions to minimize phototoxicity', *Journal of Cell Science*, p. jcs.242834. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.242834>.
- Komori, T. (2022) 'Grading of adult diffuse gliomas according to the 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System', *Laboratory Investigation*, 102(2), pp. 126–133. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41374-021-00667-6>.
- Lange, F. *et al.* (2019) 'AMPA receptor antagonist perampanel affects glioblastoma cell growth and glutamate release in vitro', *PLOS ONE*. Edited by S.-G. Lee, 14(2), p. e0211644. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211644>.
- Lange, F., Hörnschemeyer, J. and Kirschstein, T. (2021) 'Glutamatergic Mechanisms in Glioblastoma and Tumor-Associated Epilepsy', *Cells*, 10(5), p. 1226. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells10051226>.
- Leica (no date) 'Automatisiertes, aufrechtes Mikroskop-System für Life-Science Forschung auf höchstem Niveau Leica DM6000 B'. Available at: <https://www.leica-microsystems.com/de/produkte/lichtmikroskope/p/leica-dm6000-b/> (Accessed: 10 September 2021).
- Lian, K., Engelsen, B. and Storstein, A. (2012) 'Epilepsi ved gliom', *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 132(15), pp. 1752–1756. Available at: <https://doi.org/10.4045/tidsskr.11.0812>.
- Magidson, V. and Khodjakov, A. (2013) 'Circumventing Photodamage in Live-Cell Microscopy', in *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 545–560. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407761-4.00023-3>.
- Mißfeld, M. (no date) 'Die Geschichte des Mikroskops'. Available at: <https://www.lichtmikroskop.net/geschichte/> (Accessed: 2 August 2022).
- Monici, M. (2005) 'Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications', in *Biotechnology Annual Review*. Elsevier, pp. 227–256. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11007-2](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11007-2).
- Morris, S.W. *et al.* (1997) 'ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK)', *Oncogene*, 14(18), pp. 2175–2188.

Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201062>.

Noch, E.K., Ramakrishna, R. and Magge, R. (2018) 'Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance', *World Neurosurgery*, 116, pp. 505–517. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.04.022>.

O'Bryant, C.L. *et al.* (2013) 'Crizotinib: A New Treatment Option for ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer', *Annals of Pharmacotherapy*, 47(2), pp. 189–197. Available at: <https://doi.org/10.1345/aph.1R002>.

Ockenga, W. (2011) 'Differential Interference Contrast (DIC)'. Available at: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/differential-interference-contrast-dic/> (Accessed: 10 September 2021).

Omuro, A. (2013) 'Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review', *JAMA*, 310(17), p. 1842. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319>.

Ostrom, Q.T. *et al.* (2014) 'The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review', *Neuro-Oncology*, 16(7), pp. 896–913. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>.

Overholtzer, M. *et al.* (2007) 'A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion', *Cell*, 131(5), pp. 966–979. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.040>.

Patil, . *et al.* (2019) 'Targeted therapies for ROS1-rearranged non-small cell lung cancer', *Drugs of Today*, 55(10), p. 641. Available at: <https://doi.org/10.1358/dot.2019.55.10.3030646>.

PubMed (no date) 'Live Cell Imaging'. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=live+cell+imaging> (Accessed: 7 November 2021).

Qi, S. and Liu, Y. (2016) 'Differences in protein expression between the u251 and u87 cell lines', *Turkish Neurosurgery* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.17746-16.1>.

Rebohm, S. (2017) *Frühe Mikroskopie: Beobachtung als Forschungspraxis*. Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften. Available at: <https://doi.org/10.34663/9783945561140-00>.

Reuss, D.E. *et al.* (2015) 'IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO', *Acta Neuropathologica*, 129(6), pp. 867–873. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1438-8>.

Rösche, J. *et al.* (2015) 'Perampanel in der Behandlung eines Patienten mit

- Glioblastoma multiforme ohne IHD-1-Mutation und ohne MGMT-Promotor-Methylierung', *Fortschritte der Neurologie · Psychiatrie*, 83(05), pp. 286–289. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0034-1399459>.
- Rzeski, W., Ikonomidou, C. and Turski, L. (2002) 'Glutamate antagonists limit tumor growth', *Biochemical Pharmacology*, 64(8), pp. 1195–1200. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01218-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01218-2).
- Schenker, H. *et al.* (2017) 'Cell-in-cell structures are more potent predictors of outcome than senescence or apoptosis in head and neck squamous cell carcinomas', *Radiation Oncology*, 12(1), p. 21. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13014-016-0746-z>.
- Schwegler, M., Wirsing, A.M., Dollinger, A.J., *et al.* (2015) 'Clearance of primary necrotic cells by non-professional phagocytes: Necrotic cell uptake by non-professional phagocytes', *Biology of the Cell*, 107(10), pp. 372–387. Available at: <https://doi.org/10.1111/boc.201400090>.
- Schwegler, M., Wirsing, A.M., Schenker, H.M., *et al.* (2015) 'Prognostic Value of Homotypic Cell Internalization by Nonprofessional Phagocytic Cancer Cells', *BioMed Research International*, 2015, pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/359392>.
- Shaw, A.T. *et al.* (2014) 'Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer', *New England Journal of Medicine*, 371(21), pp. 1963–1971. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406766>.
- Shrestha, N. *et al.* (2019) 'Mechanisms of suppression of cell growth by dual inhibition of ALK and MEK in ALK-positive non-small cell lung cancer', *Scientific Reports*, 9(1), p. 18842. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55376-4>.
- Sinclair, W.K. (2012) 'Cyclic X-Ray Responses in Mammalian Cells *in Vitro*¹', *Radiation Research*, 178(2), pp. AV112–AV124. Available at: <https://doi.org/10.1667/RRAV09.1>.
- Soda, M. *et al.* (2007) 'Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer', *Nature*, 448(7153), pp. 561–566. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature05945>.
- Song, Z., Wang, M. and Zhang, A. (2015) 'Alectinib: a novel second generation anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor for overcoming clinically-acquired resistance', *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(1), pp. 34–37. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2014.12.007>.
- Spierenburg, G.T. *et al.* (1984) 'Phototoxicity of N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-

ethanesulfonic acid-buffered culture media for human leukemic cell lines', *Cancer Research*, 44(5), pp. 2253–2254.

Strzelczyk, A. *et al.* (2019) 'Perampanel for treatment of status epilepticus in Austria, Finland, Germany, and Spain', *Acta Neurologica Scandinavica*, 139(4), pp. 369–376. Available at: <https://doi.org/10.1111/ane.13061>.

Takano, T. *et al.* (2001) 'Glutamate release promotes growth of malignant gliomas', *Nature Medicine*, 7(9), pp. 1010–1015. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm0901-1010>.

Thermo Fischer Scientific Inc. (2017) 'Tetramethylrhodamine (TMRM)'. Available at: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016517_TMRM_UG.pdf (Accessed: 4 September 2021).

Thermo Fischer Scientific Inc. (no date) 'CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent'. Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10723#/C10723> (Accessed: 2 September 2021).

Torre, L.A., Siegel, R.L. and Jemal, A. (2016) 'Lung Cancer Statistics', in A. Ahmad and S. Gadgeel (eds) *Lung Cancer and Personalized Medicine*. Cham: Springer International Publishing (Advances in Experimental Medicine and Biology), pp. 1–19. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_1.

Van Helden, A. (ed.) (2010) *The origins of the telescope*. Amsterdam: KNAW Press (History of Science and Scholarship in the Netherlands, v. 12).

Venkataramani, V. *et al.* (2019) 'Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression', *Nature*, 573(7775), pp. 532–538. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1564-x>.

Waters, J.C. (2013) 'Live-Cell Fluorescence Imaging', in *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 125–150. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407761-4.00006-3>.

Watkins, S.C. and St. Croix, C.M. (2013) 'Building a Live Cell Microscope: What You Need and How to Do It', *Current Protocols in Cytometry*, 65(1). Available at: <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0221s65>.

Wirsching, H.-G., Galanis, E. and Weller, M. (2016) 'Glioblastoma', in *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp. 381–397. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2>.

Witthayanuwat, S. *et al.* (2018) 'Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(9). Available at: <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.9.2613>.

Xu, G. *et al.* (2015) 'REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition', *Nature*, 521(7553), pp. 541–544. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature14328>.

Yamaguchi, K., Tamura, Z. and Maeda, M. (1997) 'Molecular Structure of the Zwitterionic Form of Phenolsulfonphthalein.', *Analytical Sciences*, 13(3), pp. 521–522. Available at: <https://doi.org/10.2116/analsci.13.521>.

Zeiss (no date) 'Geschichte der Mikroskopie Wie alles begann'. Available at: <https://www.zeiss.de/corporate/ueber-zeiss/geschichte/technische-meilensteine/mikroskopie.html> (Accessed: 1 August 2022).

Zhou, Y. *et al.* (2014) 'Off-Target Effects of c-MET Inhibitors on Thyroid Cancer Cells', *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(1), pp. 134–143. Available at: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0187>.

Zhuang, H. (2018) 'Research progress on the impact of radiation on TKI resistance mechanisms in NSCLC', *Journal of Cancer*, 9(20), pp. 3797–3801. Available at: <https://doi.org/10.7150/jca.26364>.

8. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CiC	Cell-in-Cell (- Ereignis)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPU	Central Processing Unit
DIC	Differential Interference Contrast
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
FKS	Fetales Kälber Serum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
IDH-1	Isocitrat Dehydrogenase 1
LASX	Leica Application Suite X
MGMT - Promoter	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase - Pro- moter
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
PIS	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
TIFF - Datei	Tagged Image File Format – Datei
TMRM	Tetramethylrhodamin-methylester

9. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: DIC (links) und Breiffeld-Beleuchtung (rechts) eines Zellhaufens.....	11
Abbildung 2: Amplituden- und Phasenobjekte	12
Abbildung 3: Fotografie des Inkubationssystem (links).....	13
Abbildung 4: Fotografie vom Inneren des Inkubationssystem (rechts)	13
Abbildung 5: Fotografie der Befestigung des Microfluidic-Chiphalters.....	14
Abbildung 6: Autofocus	15
Abbildung 7: Fotografie zweier Rhombic Chamber Mikrofluidic Chips	16
Abbildung 8: Exzitations- und Emissionsmaxima.....	19
Abbildung 9: Farbbilder vom Anfang und Ende eines Versuches.....	19
Abbildung 10: Photobleachingkorrektur	21
Abbildung 11: Photobleachingkorrektur (Bilderserie).....	21
Abbildung 12: Farbbild Auswertung	26
Abbildung 13: DIC Bild und Farbbild Korrelat	27
Abbildung 14: Zeitrafferaufnahmen mehrerer Phagozytosen	30
Abbildung 15: Zeitrafferaufnahme einer Phagozytose (schwarzer Pfeil)	31
Abbildung 16: Zeitrafferaufnahmen von BEAS-2B Zellen	31
Abbildung 17: Fluoreszenz-Intensitätskurven vom Versuch BEAS-2B mit Alectinib.....	33
Abbildung 18: Fluoreszenz-Intensitätskurven vom Versuch BEAS-2B mit Crizotinib	35
Abbildung 19: Fluoreszenz-Intensitätskurven vom Versuch A549 mit Alectinib.....	37
Abbildung 20: Fluoreszenz-Intensitätskurven vom Versuch A549 mit Crizotinib	39
Abbildung 21: Fluoreszenz-Intensitätskurven vom Versuch U251 mit Perampanel (V1).....	41
Abbildung 22: Fluoreszenz-Intensitätskurven vom Versuch U251 mit Perampanel (V2).....	42
Abbildung 23: Fluoreszenzfarbbild vom Versuch U251 mit Perampanel.....	43

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verschiedene p-Werte des Versuchs BEAS-2B mit dem TKI Alectinib	32
Tabelle 2: Apoptose-Maximalwerte des Versuchs BEAS-2B mit dem TKI Crizotinib	34
Tabelle 3: Gemessene Intensitätsbereich der Apoptose Aktivität der verschiedenen Versuchsreihen	38
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien.....	59
Tabelle 5: Medium für BEAS-2B	59
Tabelle 6: Medium für A549	59
Tabelle 7: Medium U251	59
Tabelle 8: Farbloses Medium für die Inkubation in den Microfluidic Chips.....	60
Tabelle 9: Working solution TMRM SL1 (=10 mM)	60
Tabelle 10: Working solution TMRM SL2 (=100 μ M).....	60
Tabelle 11: Working solution CellEvent Caspase 3/7 (=20 μ M).....	60
Tabelle 12: Verwendete Medikamente	60
Tabelle 13: Verwendete Medien und Reagenzien	61
Tabelle 14: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	62
Tabelle 15: Verwendete Geräte	63

Tabellenverzeichnis

10.1 Zelllinien

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Zellart
BEAS-2B	Lungenepithelzellen
A549	Lungenadenokarzinomzellen
U251	Glioblastomzellen

10.2 Zellkulturmedien

Tabelle 5: Medium für BEAS-2B

Substanz	Menge
Medium DMEM	500 ml
FBS	50 ml (=10 %)
Penicillin/Streptomycin	5 ml (=1 %)

Tabelle 6: Medium für A549

Substanz	Menge
Medium DMEM	500 ml
FBS	25 ml (=5 %)
Penicillin/Streptomycin	5 ml (=1 %)

Tabelle 7: Medium U251

Substanz	Menge
Medium DMEM	500 ml
FBS	50 ml (=10 %)
Penicillin/Streptomycin	5 ml (=1 %)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 8: Farbloses Medium für die Inkubation in den Microfluidic Chips

Substanz	Menge
FluoroBrite™ DMEM	500 ml
FBS	50 ml (=10 %)
L-Glutamin	2 ml (=4 mM)
Penicillin/Streptomycin	5 ml (=1 %)

10.3 Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Tabelle 9: Working solution TMRM SL1 (=10 mM)

Substanz	Menge
TMRM	25 mg
DMSO	5 ml

Tabelle 10: Working solution TMRM SL2 (=100 µM)

Substanz	Menge
SL1 TMRM	10 µl
DMSO	990 µl

Tabelle 11: Working solution CellEvent Caspase 3/7 (=20 µM)

Substanz	Menge
CellEvent Caspase 3/7	1 µl
PBS	19 µl

10.4 Medikamente

Tabelle 12: Verwendete Medikamente

Substanz	Hersteller
Alectinib	Selleck Chemicals, Planegg, Deutschland
Crizotinib	Selleck Chemicals, Planegg, Deutschland

Tabellenverzeichnis

Perampanel	Selleck Chemicals, Planegg, Deutschland
------------	---

10.5 Medien, Farbstoffe und Reagenzien

Tabelle 13: Verwendete Medien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
CASY-ton	Innovatis AG
CellEvent Caspase 3/7	Life Technologies GmbH
DHE (Dihydroethidium)	Sigma-Aldrich
DMEM	Pan Biotech GmbH
DRAQ7	Beckman Coulter Inc.
FluoroBrite™ DMEM	Life Technologies GmbH
FKS	Merck KGaA
HEPES	Biochrom GmbH
L-Glutamine	Life Technologies GmbH
PBS	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies GmbH
RPMI-Medium	Sigma-Aldrich
TMRM	Life Technologies GmbH
Trypsin	Life Technologies GmbH

10.6 Verbrauchsmaterial

Tabelle 14: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
CASY-Ton Röhrchen	Innovatis AG
Dreiwegehahn	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG
Einmal-Pipetten	Greiner Bio-One International GmbH
Heizmatte	Witte+Sutor GmbH
Microfluidic Rhombic Chamber Chips	Microfluidic ChipShop
Miniluer male & female	Microfluidic ChipShop
Pipettenspitzen	Gilson Inc.
Petrischalen	Nunc A/S
Schlauch	Microfluidic ChipShop
Spritze 1ml Injekt®	B. Braun SE
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One International GmbH
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One International GmbH

10.7 Geräte

Tabelle 15: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH
CASY	Innovatis AG
CPU-Lüfter	Akasa Ltd.
Durchflusszytometer Gallios Flow Cytometer	Beckman Coulter
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Lichtmikroskop Primo Vert	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Magnetrührer MR 2002	Heidolph Instruments GmbH
Pipettierhilfe „Pipetboy“	IBS Integra Biosciences
Schüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH
Temperaturmessgerät	Conrad Electronic AG
Thermostat UT 200-2	ELV Elektronik AG
Vortex-Schüttler MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH
Zentrifuge Megafuge 1.0RS	Heraeus Instruments GmbH
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich AG

11. Danksagung

Danke an alle, die mich auf verschiedenen Wegen bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. R. Fietkau, Direktor der Strahlenklinik der Universität Erlangen-Nürnberg bedanken, dass mir die Möglichkeit gegeben worden ist, diese Arbeit mit allen verfügbaren Materialien und Geräten durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. med. Luitpold Distel, der stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte. Danke auch für die vielen Gespräche, welche zu neuen Ideen und Versuchen geführt haben.

Allen Mitarbeitern des strahlenbiologischen Labors danke ich für die stets freundliche Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich Doris Mehler und Tina Jost danken für ihre Unterstützung und ihre geduldigen Anleitungen und Erklärungen.

Mein Dank gilt zudem meiner Familie und meinen Freunden, die mich moralisch bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Martin danke ich fürs Lektorieren. Beistriche und der Genitiv sind jetzt meine besten Freunde.

Sara und Nata gilt ein besonderer Dank dafür, dass sie in der ganzen Zeit stets ein offenes Ohr für meine Probleme hatten. Danke für die vielen Gespräche und Kaffees auf dem Sofa.

Und zuallerletzt danke ich Jan, der mich auf den letzten Metern der Arbeit bei der ein oder anderen Hürde unterstützt hat und immer wieder daran erinnerte das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren. Danke für die Stütze, welche ich fürs Fertigstellen der Arbeit benötigte.

12. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Jennifer My Huyen Vu
Geburtsdatum: 13.11.1994
Geburtsort: Lichtenfels
Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg

24.05.2023 3. Staatsexamen Medizin
07.04.2022 2. Staatsexamen Medizin
Oktober 2018 - April 2022 Humanmedizin (Klinik) an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
20.09.2018 1. Staatsexamen Medizin
April 2016 - August 2018 Humanmedizin (Vorklinik) an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
26. Juni 2013 Abitur

Berufsweg

August 2015 – April 2016 Rettungsassistentin in der Rettungswache Lichtenfels
August 2014 – August 2015 Ausbildungsjahr absolviert in der Rettungswache Lichtenfels
November 2013 – Juli 2014 Ausbildung zur Rettungsassistentin an der staatlich anerkannten Berufsfachschule für Notfallsanitäterinnen und Notfallsanitäter in Werdau

Praktika & wissenschaftliche Arbeiten

26.12.2022 – 16.04.2023 Praktisches Jahr, 3. Tertial in der Chirurgie am USZ in Zürich
05.09.2022 – 25.12.2022 Praktisches Jahr, 2. Tertial in der Inneren Medizin (Hämatologie/Onkologie) in der Klinik Favoriten in Wien
16.05.2022 – 04.09.2022 Praktisches Jahr, 1. Tertial im Fachbereich der Nuklearmedizin am Uniklinikum Erlangen
12.03.2021 – 11.04.2021 Famulatur im Universitätsklinikum Erlangen im Fachbereich der Nuklearmedizin

18.03.2020 - 17.04.2020	Famulatur in der Gemeinschaftspraxis Dr. med. Judith May, Dr. med. Matthias Dülk, Arzt Klaus Baierl für Allgemeinmedizin in Michelau i.OFr.
02.09.2019 – 01.10.2019	Famulatur im Universitätsspital Zürich in der Fachrichtung Radio-Onkologie
01.03.2019 – 30.03.2019	Famulatur im Klinikum Lichtenfels im Fachbereich der Allgemein Chirurgie
Oktober 2018 – Mai 2023	Experimentelle Dissertationsarbeit in der Strahlentherapie, Uniklinik Erlangen unter Anleitung von Prof. Dr. med. L. Distel zum Thema: <i>Lebendzellaufnahmen mit einem aufrechten Lichtmikroskop zur Detektion von physiologischen oder tumorösen Zellvorgängen und deren Interaktion mit Bestrahlung und Medikamenten</i>
Sommer 2014	Praktikum im Klinikum Lichtenfels im Fachbereich der Anästhesie und Intensivmedizin
Herbst 2013	Pflegepraktikum im Bezirksklinikum Kutzenberg im Fachbereich der Psychiatrie

Publikationsliste

Jost, T., Schultz, A.-K., Frey, B., **Vu, J.**, Fietkau, R., Distel, L.V., Hecht, M., 2022. Influence of alectinib and crizotinib on ionizing radiation - in vitro analysis of ALK/ROS1-wildtype lung tissue cells. *Neoplasia* 27, 100780. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100780>

Vu, E., Schröder, C., Dülk, J., Stelmes, J.-J., **Vu, J.**, Schilling, J., Förster, F.G., Förster, R., Berufsverband Niedergelassener Gynäkologischer Onkologen in Deutschland e.V., 2022. Nationwide Survey of German Outpatient Gynecologic Oncology Practices during the Coronavirus Disease 2019 Pandemic: Reactions to the First Wave and Future Perspectives. *Breast Care* 17, 257–263. <https://doi.org/10.1159/000518858>

Abstracts DEGRO 2021, 2021. . *Strahlenther Onkol* 197, 1–246. **Vu, J.** P15 – 33 <https://doi.org/10.1007/s00066-021-01791-4>