

Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Katharina Faust

**Präklinische Untersuchung des Therapieeffekts von
Radiotherapie, Tumortheraiefeldern und personalisierter
Chemotherapie auf zerebrale Metastasen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sebastian Jeising

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Michael Sabel

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Jörg Felsberg

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Jeising S, Nickel AC, Trübel J, Felsberg J, Picard D, Leprivier G, Wolter M, Huynh MK, Olivera MB, Kaulich K, Häberle L, Esposito I, Klau GW, Steinmann J, Beez T, Rapp M, Sabel M, Dietrich S, Remke M, Cornelius JF, Reifenberger G, Qin N. A clinically compatible in vitro drug-screening platform identifies therapeutic vulnerabilities in primary cultures of brain metastases. *J Neurooncol.* 2024 Sep;169(3):613-623. doi: 10.1007/s11060-024-04763-7. Epub 2024 Jul 10. PMID: 38985431; PMCID: PMC11341655.

I Zusammenfassung

Hirnmetastasen (engl.: *brain metastases*; BM) sind insgesamt die häufigsten Tumoren des zentralen Nervensystems. Es wird geschätzt, dass etwa 25% aller Krebspatienten intrazerebrale Metastasen ihrer Tumorerkrankung entwickeln, und obwohl sich die neurochirurgische Resektion sowie die strahlentherapeutische und medikamentöse Behandlung in den letzten Jahren verbessert haben, überleben die meisten Patienten kaum ein Jahr nach Diagnosestellung.

Aus dem Bestreben nach lokoregionaler Kontrolle des Tumorwachstums wurden sogenannte Tumortheraiefelder (engl.: *Tumor Treating Fields*; TTFelds) entwickelt. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass TTFelds eine Verringerung der Lebensfähigkeit von Zellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (engl.: *non-small-cell lung cancer*; NSCLC) bewirken und eine additive Wirkung in Kombination mit Chemotherapeutika *in vitro* entfalten. Eine klinische Studie mit Beteiligung der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf untersucht derzeit den Therapieeffekt von TTFelds für NSCLC Patienten mit Hirnmetastasen. Darüber hinaus konnten klinische Studien mit zielgerichteten Wirkstoffen gegen Treibermutationen sowie mit Immuntherapeutika deutliche Effekte auf das Überleben von Patienten mit Hirnmetastasen; insbesondere von NSCLC nachweisen.

Ziel der eigenen experimentellen Forschungsarbeit war es, aus Patientenmaterial Zellmodelle aus Hirnmetastasen zu generieren, diese zu validieren und folgend die Therapieeffekte von Radiotherapie, Tumortheraiefeldern und personalisierter Chemotherapie zu untersuchen.

Dazu wurden zunächst Bedingungen für die Etablierung von primären Zellkulturen aus intrazerebralen Metastasen erarbeitet. Mittels *Next-Generation Sequencing* (NGS) wurden genetische Ziele für personalisierte Pharmakotherapien identifiziert und folgend mit Standard-Chemotherapien in Wirkstoff-Screenings im Hinblick auf das Zellüberleben *in vitro* verglichen. Weiterhin wurden die Zellmodelle bestrahlt oder mit TTFelds behandelt sowie einem zielagnostischen Hochdurchsatzwirkstoffscreening zugeführt.

Insgesamt konnten 26 primäre Zellmodelle aus Hirnmetastasen unterschiedlichen Ursprungs etabliert werden. Davon wurde in sieben Fällen NGS-Untersuchungen des Tumorgewebes der Hirnmetastasen und der daraus abgeleiteten Primärkulturen durchgeführt. Diese zeigten für alle untersuchten Modelle übereinstimmende Treibermutationen. Für elf Zellmodelle wurden gezielte Therapiescreens *in vitro* durchgeführt, während sechs Zellmodelle im Hochdurchsatzwirkstoffscreening untersucht wurden. Die Bestrahlung der Zellmodelle zeigte keine signifikante Reduktion des Zellüberlebens. Eine Behandlung mit TTFelds reduzierte das Zellüberleben in allen untersuchten Modellen. Die gezielte Wirkstofftestung sowie das Hochdurchsatzwirkstoffscreening ergaben konkordante Ergebnisse zu den genetisch nachgewiesenen prädiktiven Mutationen. Darüber hinaus identifizierte das Hochdurchsatzwirkstoffscreening eine Reihe weiterer relevanter Therapeutika, die auf individueller Basis neue Behandlungsoptionen für Patienten mit Hirnmetastasen eröffnen könnten.

II Summary

Brain metastases (BM) are the overall most common tumors in the central nervous system. It is estimated that about 25% of all cancer patients develop cerebral metastases, and although neurosurgical resection and radiotherapy have improved in recent years, most patients barely survive more than one year after diagnosis.

Tumor Treating Fields (TTFields) have been developed to improve the locoregional control of tumor growth. It has already been demonstrated that TTFields reduce the viability of non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells and have an additive effect *in vitro* in combination with chemotherapeutic agents. A clinical study with participation of the Department of Neurosurgery at the University Hospital Düsseldorf is currently investigating the therapeutic effect of TTFields in NSCLC patients with BM. Furthermore, clinical studies recently achieved significant effects on the survival of patients with BM by utilizing pharmacological therapies specifically targeting driver mutations or immune checkpoints, in particular in BM of NSCLC patients.

The aim of this experimental thesis was to generate primary cell models of BM from patient tissues, validate them and subsequently investigate the therapeutic effects of radiotherapy, TTFields and personalized drug treatment.

To achieve this, conditions for establishment of primary cultures from BM tissues were successfully developed. In a next step, targets for molecularly based personalized pharmacotherapies were identified using next-generation sequencing (NGS) and subsequently compared with standard chemotherapies in small scale drug screenings focusing on cell survival. Furthermore, the established cell models were subjected to radiation treatment, TTFields or high-throughput drug screening.

In total, 26 primary cell models were established from BM. Among these, NGS analyses from primary BM tissues and the derived cell culture models were performed in seven cases, revealing consistent driver mutations between tissue and cell culture models. Eleven cell models were subjected to focused therapy screenings, with an additional six models undergoing high-throughput drug screening. While radiotherapy showed no significant effect on cell survival, TTFields significantly reduced cell survival in all models examined. Both small-scale drug testing and high-throughput drug screening yielded pharmacogenetically concordant results as indicated by *in vitro* response to drugs targeting the detected predictive genetic alterations. In addition, high-throughput drug screening identified several other promising drugs that could be candidates for novel treatment options on an individual basis.

III Abkürzungsverzeichnis

BM	<i>brain metastases</i>
TTFields	<i>Tumor Treating Fields</i>
NSCLC	<i>non-small-cell lung cancer</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
Gy	Gray
h	Stunden
kHz	Kilohertz
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma virus gene</i>
RET	<i>RET proto-oncogene</i>
GBM	Glioblastoma multiforme
MRT	Magnetresonanztomografie
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
ca.	<i>circa</i>
SCLC	<i>small-cell lung cancer</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
TNBC	<i>triple-negative breast cancer</i>
BRCA1	<i>breast cancer 1 gene</i>
vs.	<i>versus</i>
ER	<i>estrogen receptor</i>
KPS	<i>Karnofsky performance status</i>
PR	<i>progesterone receptor</i>
CT	Computertomographie
bspw.	beispielsweise
mm	Millimeter
3D	dreidimensional
PET	Positronenemissionstomografie
HE	Hämatoxylin-Eosin
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition

CTCs	<i>circulating tumor cells</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ctDNA	<i>cell-free tumor DNA</i>
FGR	Fluoreszenzgestützte Resektion
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
kHz	Kilohertz
WBRT	<i>Whole Brain Radiotherapy</i>
QUARTZ	<i>Quality of Life after Treatment for Brain Metastases</i>
inkl.	inklusive
mind.	mindestens
SRT	Stereotaktische Radiotherapie
FDG	¹⁸ F-Fluorodeoxyglucose
BBB	<i>blood-brain barrier</i>
BTB	<i>blood-tumor barrier</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
ROS1	<i>c-ros oncogene 1</i>
RET	<i>Ret proto-oncogene</i>
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
PFS	<i>progression-free survival</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogen</i>
NNT	<i>Number needed to treat</i>
NNH	<i>Numer needed to harm</i>
TME	<i>tumor microenvironment</i>
PD-1	<i>anti-programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
HDAC	Histondeacetylase
HIF-1 α	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-alpha
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
LITT	<i>laser interstitial thermal therapy</i>
AI	<i>artificial intelligence</i>

BAC	<i>bronchioloalveolar carcinoma</i>
HR	Hormonrezeptorstatus
GBM	Glioblastom
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
NTRK	<i>neurotrophic tyrosine kinase receptor</i>
NF1	Neurofibromin 1
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
TIC	<i>tumor initiating cells</i>
CSC	<i>cancer stem cells</i>
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
z.T.	zum Teil
IC	<i>inhibitory concentration</i>
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
MGMT	O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase
GB	Glioblastom
Rx	Radiotherapie
TMZ	Temozolomid
NR	<i>non-responder</i>
R	<i>responder</i>
GB-PDOC	<i>Glioblastoma patient-derived organotypic cultures</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)	pHEMA
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
HTS	<i>High-Troughput Screening</i>
SD	<i>standard deviation</i>
AF	Allelfrequenz

TPS	<i>Tumor Proportion Score</i>
SISH	<i>Silber in situ Hybridisierung</i>
EC ₅₀	<i>median effective concentration</i>
CV	<i>coefficient of variation</i>
AUC	<i>area under the curve</i>
HFB	<i>human fibroblasts</i>
PBC	<i>peripheral blood cells</i>
MAPK	<i>Mitogen-aktivierten Proteinkinase</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
LKB1	<i>Liver kinase B1</i>
CAMKK2	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2</i>
FBP	<i>fructose 1,6-bisphosphate</i>
PFK	<i>6-phosphofructo-2-kinase</i>
ULK1	<i>unc-51-like autophagy activating kinase 1</i>
AMOTL1	<i>angiomin like 1</i>
YAP	<i>Yes-associated protein</i>
PGC	<i>Proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
ACC	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>
HMGR	<i>HMG-CoA reductase</i>

IV Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Hirnmetastasen	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Klinik	5
1.1.3. Diagnostik	6
1.1.4. Therapie	9
1.1.5. Prognose	19
1.2. Personalisierte Neuroonkologie	20
1.2.1. Gensequenzierung	22
1.2.2. Zellmodelle zerebraler Metastasen	23
1.3. Ziele der Arbeit	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Zellmodelle	27
2.2. Gensequenzierung	28
2.3. Personalisierte Wirkstofftestung	29
2.4. Radiotherapie	30
2.5. TTFields Behandlung	31
2.6. Hochdurchsatzwirkstofftestung	31
3. Ergebnisse	32
3.1. Validierte Zellmodelle	32
3.2. Personalisierte Wirkstofftestung	37
3.3. Radiotherapie	41
3.4. TTFields Behandlung	43
3.5. Hochdurchsatzwirkstofftestung	44
4. Diskussion	56
4.1. Etablierung validierter Zellmodelle	56
4.2. In vitro Therapietestung	58
4.2.1. Personalisierte Wirkstofftestung	58
4.2.2. Radiotherapie	59

4.2.3. TTFields-Behandlung	60
4.3. Hochdurchsatzwirkstofftestung	62
4.4. Limitationen	73
4.5. Schlussfolgerungen	74
5. Anhang	74
6. Literatur- und Quellenverzeichnis	78
7. Danksagung	99

1. Einleitung

1.1. Hirnmetastasen

Hirnmetastasen (*brain metastases*; BM) sind die häufigste Tumorerkrankung im zentralen Nervensystem und treten insgesamt etwa zehnmal häufiger auf als primäre Tumoren des Gehirns. Die häufigsten Primärtumoren, die in das Gehirn metastasieren, sind Karzinome der Lunge oder der Mamma sowie maligne Melanome der Haut. Zusammen machen diese einen Anteil von bis zu 80% der Primärtumoren bei Patienten¹ mit Hirnmetastasen aus (Nayak et al., 2012). Insgesamt wird geschätzt, dass etwa 25% aller Krebspatienten zerebrale Metastasen entwickeln. Obwohl sich sowohl die neurochirurgische Resektion als auch die strahlentherapeutische und medikamentösen Behandlungsoptionen in den letzten Jahren verbessert haben, überleben die meisten Patienten kaum länger als ein Jahr nach Diagnosestellung einer Hirnmetastasierung (Ostrom et al., 2018).

1.1.1. Epidemiologie

Die Häufigkeit von BM lässt sich nicht eindeutig beziffern. Autopsiestudien an Krebspatienten zeigen eine Häufigkeit von ca. 25%, die je nach Primärtumor variiert und für Lungen- und Hautkrebs Patienten am höchsten ist (Ostrom et al., 2018). In einer Vielzahl an Studien wurde die Inzidenzrate in der Normalbevölkerung ermittelt und variiert zwischen 8,3 und 14,3 pro 100.000 Einwohnern (Nayak et al., 2012). Die Inzidenzrate steigt mit dem Alter und erreicht mit 53,7 pro 100.000 Einwohnern ihren Höhepunkt in der Kohorte der 65-74-Jährigen (Counsell et al., 1996). Ein Rückgang der Inzidenzrate in den darauffolgenden Alterskohorten ist möglicherweise damit assoziiert, dass ältere Patienten seltener weiterführender Diagnostik zugeführt werden (Nayak et al., 2012). Das spiegelt sich auch im Auftreten von BM zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors und ist besonders deutlich für das Bronchialkarzinom (Abbildung 1).

¹ Diese Arbeit verwendet das generische Maskulinum; spricht aber alle Geschlechteridentitäten gleichermaßen an. Hinweise zur Verwendung einer gendergerechten Sprache finden Interessierte unter <https://www.hhu.de/geschlechtergerechtesprache>.

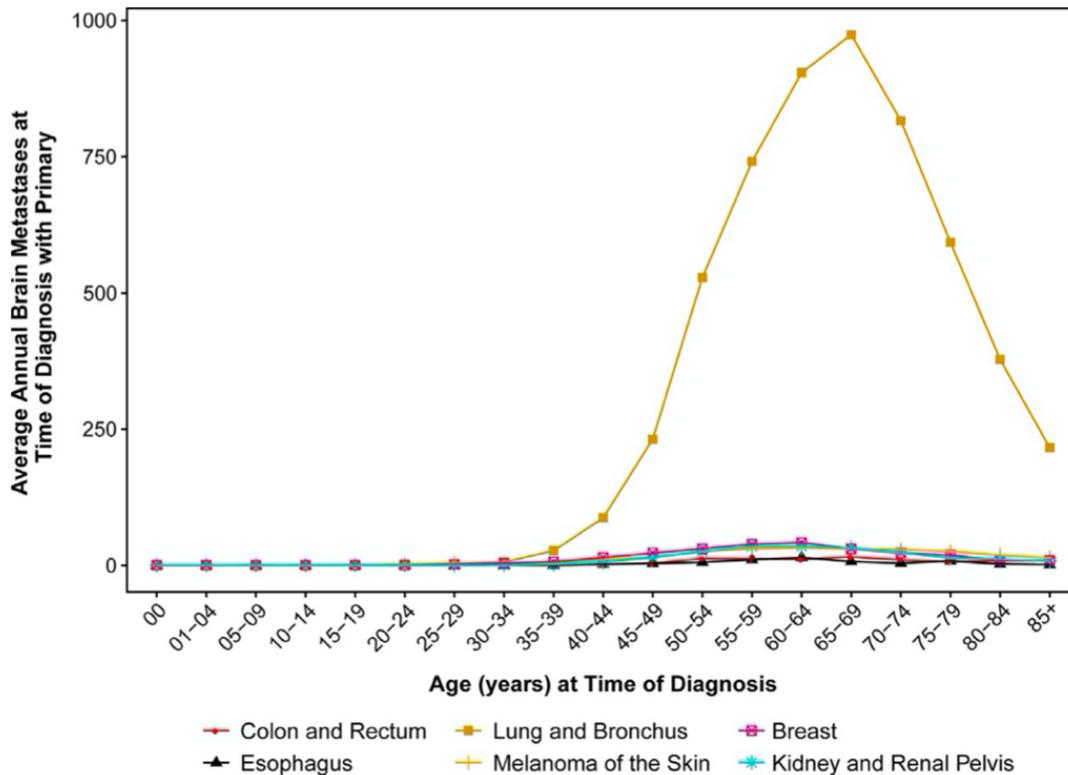


Abb. 1: Durchschnittliche jährliche Anzahl an zeitgleich mit dem Primarius diagnostizierten BM nach Alter und Primarius zwischen 2010-2013 (aus Ostrom et al., 2018, basierend auf Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program (2016)²)

Es gibt einen Trend hin zur Zunahme der Inzidenz für BM. Dies lässt sich zum einen durch die zunehmend flächendeckende Versorgung an modernen Bildgebungsverfahren erklären. So werden inzwischen auch Magnetresonanztomographien (MRT) von asymptomatischen Bronchialkarzinom-Patienten angefertigt. Zum anderen sind BM immer noch häufiges Ausschlusskriterium zur Teilnahme an klinischen Studien. Daher werden MRT-Aufnahmen im Screening-Verfahren durchgeführt und tragen möglicherweise zur Erstdiagnose vom BM bei (Nayak et al., 2012). Hinzu kommt, dass einerseits die Krebsprävalenz gestiegen ist und andererseits auch die Kohorte der älteren Krebsüberlebenden deutlich größer geworden ist. Dies liegt insbesondere in der Verbesserung der onkologischen Therapien begründet (Miller et al., 2022). Ein

² Das Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Programm repräsentiert ca. 30% der US-Population indem es Daten von 18 Krebsregistern inklusive Krebsdiagnosen, Therapien sowie Überleben erfasst (siehe: PARK, H. S., LLOYD, S., DECKER, R. H., WILSON, L. D. & YU, J. B. 2012. Overview of the Surveillance, Epidemiology, and End Results database: evolution, data variables, and quality assurance. *Curr Probl Cancer*, 36, 183-90.).

besonderes Problem besteht allerdings darin, dass viele der Pharmakotherapien keine intrakranielle Wirkung zeigen. So überschreitet der HER2-Inhibitor Trastuzumab nicht die Blut-Hirn-Schranke. Bei der Behandlung von fortgeschrittenem Brustkrebs zeigte sich eine Inzidenz von 30% für BM ein Jahr nach Therapiebeginn mit Trastuzumab. Darüber hinaus lag bei Patienten die klinisch von der Therapie des Primarius profitierten zu 75% eine isolierte Progression im ZNS vor, Insofern stellt das ZNS möglicherweise einen Schutzraum für metastasierte Zellen vor modernen Pharmakotherapien dar und trägt über die Zeit zu erheblicher Morbidität und Mortalität durch das Auftreten von BM bei (Yau et al., 2006).

Etwa 50% der BM stammen von Primärtumoren in der Lunge, welche damit die häufigste Krebserkrankung darstellt, die in das Gehirn metastasiert (Suh et al., 2020, Jiang et al., 2023). So entwickeln ca. 11-19,9% der Patienten mit Lungenkrebs im Laufe ihrer Erkrankung BM (Barnholtz-Sloan et al., 2004, Jiang et al., 2023). Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) entwickeln BM in ca. 9% der Fälle, da dieses aber 85% der Lungenkrebsfälle ausmacht, stellt es insgesamt die häufigste Primärtumorentität für BM dar (Ostrom et al., 2018). Das kleinzellige Bronchialkarzinom (engl.: *small-cell lung cancer*; SCLC) hat einen Anteil von 15% aller Lungenkrebsfälle und metastasiert in dieser Population in 18% der Fälle in das Gehirn (Goncalves et al., 2016). Das Erkrankungsstadium des NSCLC ist hierbei für das Risiko der Ausbildung von Hirnmetastasen entscheidend: Während das 5-Jahresrisiko für Patienten, die in UICC-Stadium I oder II des NSCLC operativ versorgt wurden, etwa 10% beträgt, steigt das Risiko in Stadium III auf bis zu 55% (Ostrom et al., 2018). Diese Korrelation besteht auch für das SCLC. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine vollständige Resektion des Primarius beim SCLC dieses Risiko reduziert (Gong et al., 2013).

Das Mammakarzinom stellt den nächsthäufigsten Primärtumor für BM mit einem Anteil von 15-17,3% dar (Suh et al., 2020, Jiang et al., 2023). So entwickeln ca. 2-5% der Betroffenen im Laufe ihrer Erkrankung BM (Barnholtz-Sloan et al., 2004, Jiang et al., 2023). Histologische und genetische Untergruppen sind auch beim Brustkrebs prognostisch für die Ausbildung von Hirnmetastasen: Dreifach-negativer Brustkrebs (engl.: *triple-negative breast cancer*; TNBC) macht etwa 31% der Brustkrebs-BM aus (Anders et al., 2011). Weitere Risikofaktoren sind ein positiver HER2-Rezeptorstatus (Pestalozzi et al., 2006) sowie die Mutation des *Breast Cancer 1*-Gens (BRCA1), bei der bis zu 67% der Träger BM ausbilden (Albiges et al., 2005).

An dritter Stelle der häufigsten Primärtumoren für BM steht das maligne Melanom. Etwa 6-11% der BM stammen von kutanen Melanomen ab (Nayak et al., 2012). Mit einer Inzidenz von 6,9-10,4% für BM haben Patienten mit malignem Melanom ein besonders

hohes Risiko für einen zerebralen Krankheitsprogress (Ostrom et al., 2018). Hierbei besteht eine Tendenz zur Ausbildung von BM bei Melanomen des Kopf- und Nackenbereiches im Vergleich zu Melanomen an Extremitäten oder dem Körperstamm (8% vs. 5,2%) (Daryanani et al., 2005).

BM anderer Ursprünge sind insgesamt seltener. So machen Nierenzellkarzinome etwa 6% aller BM aus (Nayak et al., 2012). Bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren liegt die Inzidenz der BM für das Kolonkarzinom zwischen 1-4% und für das Ösophaguskarzinom zwischen 1,7-3,6%. Die Inzidenz für BM bei gastralen und gynäkologischen Tumoren sowie Karzinomen des Urogenitaltraktes liegt für die meisten Entitäten bei unter 1% (Ostrom et al., 2018) (Tabelle 1).

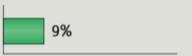
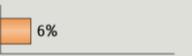
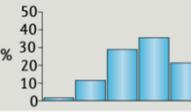
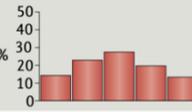
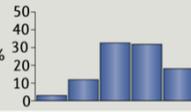
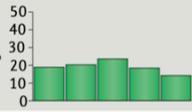
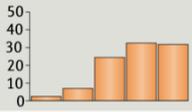
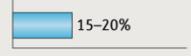
	Lung cancer	Breast cancer	Renal cell carcinoma	Melanoma	Colorectal or gastrointestinal cancer
Relative incidence	 50%	 15%	 10%	 9%	 6%
Female:male ratio	1:2	–	1:1	1:2	1:1
Frequency of brain metastases by age					
Risk of brain metastases	 15–20%	 5%	 7%	 7%	 2%
Histologies	<ul style="list-style-type: none"> • Adenocarcinoma • Squamous-cell carcinoma • Large-cell neuroendocrine carcinoma • Small-cell lung cancer 	<ul style="list-style-type: none"> • Adenocarcinoma 	<ul style="list-style-type: none"> • Clear cell 	<ul style="list-style-type: none"> • Melanoma 	<ul style="list-style-type: none"> • Adenocarcinoma
Disease-specific prognostic factors	<ul style="list-style-type: none"> • Age (<50, 50–60, >60) • KPS (<70, 70–80, 90–100) • Extracellular matrix (present versus absent) • Number of brain metastases (1, 2–3, >3) 	<ul style="list-style-type: none"> • Age (<60, ≥60) • KPS (≤50, 60, 70–80, 90–100) • Subtype (basal, luminal A, HER2, luminal B) 	<ul style="list-style-type: none"> • KPS (<70, 70–80, 90–100) • Number of brain metastases (1, 2–3, >3) 	<ul style="list-style-type: none"> • KPS (<70, 70–80, 90–100) • Number of brain metastases (1, 2–3, >3) 	<ul style="list-style-type: none"> • Age (<60, ≥60) • KPS (<80, 80, 90–100) • Extracellular matrix (present versus absent) • Number of brain metastases (1, 2–3, >3)
Molecular prognostic features	<ul style="list-style-type: none"> • EGFR mutation • ALK rearrangement 	<ul style="list-style-type: none"> • ER, PR and HER2 status 	<ul style="list-style-type: none"> • None 	<ul style="list-style-type: none"> • BRAF^{V600E} mutation 	<ul style="list-style-type: none"> • None

Tabelle 1: Eigenschaften von BM der fünf häufigsten Primärtumoren.

Die Epidemiologie, prognostischen Faktoren sowie molekularen Charakteristika sind je nach Primärtumor unterschiedlich und hier zusammenfassend dargestellt. ER (*estrogen receptor*): engl. für Östrogen-Rezeptor; KPS (*Karnofsky performance status*): engl. für Karnofsky Performance Status; PR (*progesterone receptor*): engl. für Progesteron-Rezeptor (aus Suh et al., 2020).

Tatsächlich ist die mediane Zeitspanne zwischen Diagnose eines Primärtumors und dem Auftreten von BM je nach Entität unterschiedlich lang. Für das Mammakarzinom liegt diese bei 46 Monaten (Fabi et al., 2011). Diametral dazu sind die Daten für Bronchialkarzinome, welche in zwei Dritteln der Fälle als Primärtumor identifiziert werden, wenn die Patienten erstmalig mit zerebralen Metastasen vorstellig werden (Giordana et al., 2000). Das

mediane Zeitintervall zwischen der Diagnose eines malignen Melanoms der Haut und dem Auftreten von BM liegt zwischen 22 und 37 Monaten (Ostrom et al., 2018). Zusammenfassend werden BM in ca. 40% der Fälle synchron zur onkologischen Grunderkrankung diagnostiziert (*per definitionem* innerhalb der ersten zwei Monate) und in ca. 60% der Fälle metachron (Jiang et al., 2023).

Dass BM im Falle des Mammakarzinoms und Melanoms erst Jahre nach der Diagnose des Primärtumors auftreten, könnte unter anderem am hohen Bewusstsein für Früherkennungsprogramme liegen, in deren Konsequenz die Grunderkrankung häufiger als andere Krebsarten in frühen Stadien erkannt wird (Ostrom et al., 2018). Umso wichtiger ist folglich, das Risikobewusstsein für die Ausbildung von BM in der Phase der posttherapeutischen Betreuung und eine leitliniengerechte diagnostische Vorsorge.

1.1.2. Klinik

BM verursachen lokalisationsbedingt unterschiedliche Symptome. Zunächst müssen singuläre (engl. *single*) von solitären (engl. *solitary*) BM unterschieden werden. Solitäre BM sind singuläre ZNS Läsionen ohne andere Metastasierungen (Nayak et al., 2012). Dies gilt für 45% der Patienten mit BM. 26% weisen singuläre und 28% mehr als zwei zerebrale Läsionen auf (Stark et al., 2011). Grundlage dieser Zahlen war jedoch ein Patientenkollektiv mit mindestens einer resektablen Metastase, wodurch der Anteil solitärer Metastasen nach oben verzerrt sein könnte. In alten Untersuchungen lag dieser Anteil bei 42-47% (Posner and Chernik, 1978, Tsukada et al., 1983). Tatsächlich hängt die Anzahl an BM auch mit ihrem Ursprung zusammen. Multiple BM treten häufiger bei Lungenkarzinomen und malignen Melanomen auf, wohingegen Brustkrebs sowie gastrointestinale und renale Primärtumoren eher mit singulären BM assoziiert sind (Delattre et al., 1988, Nussbaum et al., 1996).

In einer retrospektiven Studie basierend auf Daten aus den Jahren 1973 bis 1993 lag der Anteil an Patienten mit asymptomatischen BM bei 10% (Nussbaum et al., 1996). Dieser Anteil wird sich durch den verstärkten Einsatz von zerebralen MRT im Staging-Verfahren, wie oben erläutert, vergrößert haben. Die allermeisten Patienten werden jedoch aufgrund ihrer klinischen Symptome vorstellig, die abhängig von der Lokalisation der Raumforderung unterschiedlich sein kann. Läsionen des Frontalhirns erreichen teils größere Volumina, da lokalisationsbedingte Verhaltensauffälligkeiten nur subtil sein können und mitunter erst ein Masseneffekt auffällige Verwirrheitszustände hervorruft. In eloquenten Hirnarealen verursachen BM schon bei kleineren Volumina manifeste Defizite wie Sprach- oder Bewegungsstörungen. Zerebelläre Lokalisationen führen durch einen

Masseneffekt oder die Verlegung von Liquorräumen zu neurologischen Symptomen wie etwa Antriebsstörungen, Verwirrung, Hirnnervenläsionen sowie Ataxie oder Hirndruckzeichen.

Zusammenfassend sind sensorische sowie motorische Defizite, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen (Rostami et al., 2016, Ostrom et al., 2018) sowie bei 10% der Patienten Krampfanfälle symptomatische Ursachen für eine ärztliche Konsultation (Lamba et al., 2021a).

1.1.3. Diagnostik

Bei Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines malignen zerebralen Prozesses erfolgt zunächst regelhaft eine klinisch-neurologische Untersuchung unter besonderer Beachtung neurologischer Defizite sowie allgemeiner Hirndruckzeichen. Eine allgemeinkörperliche Untersuchung in Kombination mit der Erhebung einer Anamnese kann Hinweise auf Manifestationen eines Primarius geben (Weller, 2015). Daneben ist auch die Erhebung eines neurokognitiven Status zur Erhärtung der Verdachtsdiagnose sowie zur Verlaufskontrolle krankheits- und therapieassoziiertes Veränderungen von Relevanz. Dabei sollten Gedächtnis- und Ausführungsfunktionen sowie die Verarbeitungsgeschwindigkeit untersucht werden. Dies ist im Rahmen einer 25-30-minütigen Untersuchung mittels einer standardisierten Testbatterie möglich, welche den Hopkins Verbal Learning Test – Revised (dem Patienten wird eine Liste von Wörtern vorgelesen, die er dann verbal wiederholen und die Wörter aus einer Wortliste identifizieren soll), den Trail Making Test A und B (beide Teile des Trail Making Test bestehen aus 25 Kreisen mit Zahlen oder Buchstaben, die auf einem Blatt Papier verteilt sind. Der Patient wird gebeten, Linien zu ziehen, um die Kreise in aufsteigender Reihenfolge zu verbinden) sowie den Controlled Word Association Test enthält (der Patient wird aufgefordert, Wörter mit bestimmten Anfangsbuchstaben zu bilden) (Lin et al., 2013b).

Bildgebende Diagnostik

In der weiterführenden bildgebenden Diagnostik der BM ist die zerebrale MRT führend (Abbildung 2). Gegenüber der Computertomographie (CT) weist die MRT hinsichtlich der Bestimmung von Größe, Anzahl und Lokalisation zerebraler Läsionen eine höhere Sensitivität auf (Schellinger et al., 1999). Hierbei sollte eine T1-gewichtete MRT ohne und mit Gadolinium-haltigem Kontrastmittel jeweils in identischer Schichtführung und -dicke erfolgen, sodass hyperintense Signale, wie bspw. bei subakuten Einblutungen, von pathologischen Kontrastmittelanreicherungen differenziert werden können. Weiterhin

empfehlen sich eine Schichtdicke von kleiner 5 mm sowie die Anfertigung einer 3D-Sequenz, in der auch verzögert Kontrastmittel-aufnehmende Metastasen zur Darstellung kommen (Weller, 2015). Bei der Gabe von Kontrastmittel ist auf eine ein- bis fünf-minütige Wartephase zu achten, da in dieser Zeit die meisten BM sichtbar kontrastmittelaufnehmend werden (Jeon et al., 2014). Außerdem sollten eine T2-gewichtete sowie eine T2-FLAIR und diffusionsgewichtete Aufnahmen angefertigt werden (Le Rhun et al., 2021). Schließlich nehmen zerebrale Metastasen typischerweise solide oder ringförmig Kontrastmittel auf. Sie sind von kugelförmiger Gestalt und in 80% der Fälle an der Rinden-Mark-Grenze der Großhirnhemisphären, in 15% im Kleinhirn und in weniger als 5% im Hirnstamm lokalisiert (Suh et al., 2020).

Sofern bei Krebspatienten eine singuläre zerebrale Läsion dargestellt wird, liegt die Diagnose einer BM nahe und die Wahrscheinlichkeit für die Differentialdiagnose eines Glioms, Abszesses oder einer Inflammation bei lediglich 11% (Patchell et al., 1990). Zur Abgrenzung von einem zerebralen Abszess kann eine Diffusionsbildgebung hilfreich sein, da die Diffusion im Vergleich zum umliegenden Gewebe bei einem Abszess deutlicher vermindert ist als bei einer Neoplasie (Tomczak et al., 2003).

Nach operativer Exstirpation von BM sollte ein frühes postoperatives MRT innerhalb von 72 h durchgeführt werden, da in ca. 20% der Resektionen residuale Tumormasse verbleibt und dies einen Risikofaktor für Lokalrezidive darstellt (Kamp et al., 2015).

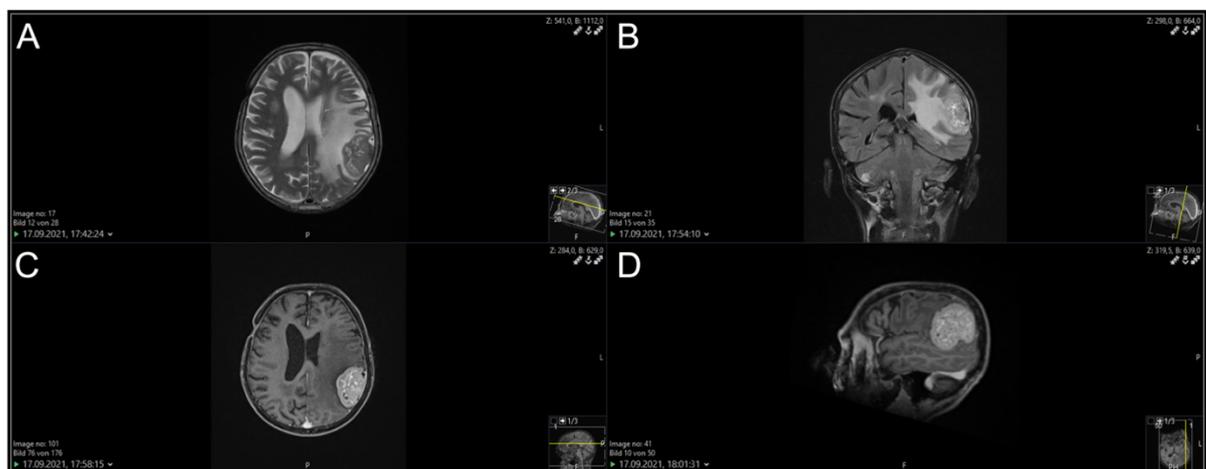


Abb. 2: MRT eines Patienten mit multiplen zerebralen Raumforderungen.

Dargestellt ist eine links parietale Raumforderung eines Patienten mit multiplen supra- und infratentoriellen Läsionen und vorbekanntem NSCLC. Die auf dieser Schicht zentrierte Raumforderung misst ca. 4,4 x 3,3 cm, ist schrankengestört, nimmt inhomogen Kontrastmittel auf und zeigt eine breitbasige Infiltration der Dura mater (T1-gewichtete Sequenz mit KM transversal und sagittal; C und D) sowie ausgedehnte T2/FLAIR-Signalalterationen im Sinne eines Perifokalödems (T2-gewichtete sowie FLAIR-Sequenz; A und B). Zudem besteht eine Pelottierung des linken Seitenventrikels mit Mittellinienverlagerung um ca. 6 mm. Dieser Befund ist angesichts der Krankheitsgeschichte und des bildgebenden Befundes am ehesten mit einer multiplen intrazerebralen Metastasierung vereinbar. Quelle: Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf.

Zur Therapieplanung ist die Identifikation des zugehörigen Primärtumors unerlässlich. Diese erfolgt nach Leitlinie durch ein Staging-Verfahren mittels CT des Thorax. Anhand dieser kann in 97% der Fälle ein Biopsieort lokalisiert werden, dessen Punktion den Primärtumor identifizieren wird. Insofern ist eine zusätzliche Diagnostik durch CT des Beckens, Abdomens und Halses oder eine Positronenemissionstomografie (PET) sowie weiterführende fachärztliche Konsultationen und endokrinologische Untersuchungen nur in Einzelfällen angezeigt (Mavrakis et al., 2005).

Neuropathologische Diagnostik

Das übergeordnete Ziel der histopathologischen Untersuchung des eingesandten Gewebes ist die Sicherung der Diagnose. Daneben können Testungen auf Zielstrukturen personalisierter Therapien für die weitere Therapieplanung sowie auf prognostische Marker durchgeführt werden. Nur im Einzelfall bei bekanntem Primarius und multipler zerebraler Metastasierung kann von einer Gewebegewinnung und konsekutiver histopathologischer Untersuchung abgesehen werden, auch weil diese durch den klinischen Status des Patienten erschwert sein kann (Weller, 2015).

Für diese Untersuchungen wird ein repräsentativer Anteil vitalen Tumorgewebes möglichst zügig und nativ in das jeweilige Institut für Neuropathologie eingesandt. Ein Teil des Gewebes wird tiefgefroren für molekulare Zusatzuntersuchungen asserviert, während die histopathologische Begutachtung zur Sicherung der Diagnose an in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben erfolgt, von denen mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbte Schnittpräparate zur histologischen Begutachtung unter dem Lichtmikroskop hergestellt werden (Weller, 2015). Dabei handelt es sich oft um niedrig oder entdifferenzierte Karzinome, sodass der rein histopathologische Rückschluss auf

einen Primärtumor erschwert ist. Hier zeigt sich zunächst häufig ein großer Nekroseanteil sowie ein vom umliegenden Gewebe abgegrenztes, verdrängendes Wachstum. Metastasen kleinzelliger Tumore und maligne Melanome zeigen gelegentlich ein infiltrierendes Wachstum. Zur genaueren Klassifikation des Gewebes stehen inzwischen eine Reihe histochemischer Färbungen sowie immunhistochemischer Analysen zur Verfügung. Diese erlauben nicht nur die Klassifikation und Typisierung einer Metastase, sondern sogar die organspezifische Zuordnung zu einem bestimmten Primärtumor. Darüber hinaus haben bspw. Untersuchungen hinsichtlich des Hormonrezeptorstatus bei Metastasen eines Mammakarzinoms (Progesteron, Östrogen und HER2/neu) oder der Proliferationsaktivität (Antigen Ki-67) auch prädiktiven und prognostischen Gehalt (Felsberg and Reifenberger, 2000, Castaneda et al., 2018).

1.1.4. Therapie

Nach Abschluss der initialen Diagnostik schließt sich für Patienten mit BM ein multimodales Therapiekonzept an, welches aus neurochirurgischer Resektion, Radio- und Pharmakotherapie bestehen kann.

Operative Therapie

Die alleinige neurochirurgische Resektion einer BM ohne adjuvante Radiotherapie erbrachte lange Zeit keine adäquaten Behandlungserfolge. In etwa der Hälfte der Patienten wurden im weiteren Verlauf Lokalrezidive festgestellt (Patchell et al., 1990). Zwischen 1988 und 2000 nahm die Anzahl der jährlich durchgeführten neurochirurgischen Resektionen um 79% zu (Barker, 2004). Damit einher entwickelten sich auch neuroonkologische Resektionstechniken weiter. Die sogenannte supramarginale Resektion beschreibt eine Technik, bei der die Exstirpation von Gewebe um 5 mm über den Rand des malignen Gewebes hinaus fortgesetzt wird. Im Kontext hirneigener Tumore wird diese Technik kontrovers diskutiert, da Überlebensvorteile mit der Rate an neurologischen Defiziten konkurrieren und prospektive Studien fehlen (Kamp et al., 2019, Certo et al., 2019). Für BM hingegen konnte gezeigt werden, dass eine supramarginale Resektion ohne adjuvante Radiotherapie gleichwertig hinsichtlich der Rate an Lokalrezidiven ist im Vergleich mit einer Standardresektion mit adjuvanter Radiatio (Yoo et al., 2009). Außerdem zeigt sich ein Vorteil für die En-Bloc-Resektion im Vergleich zu einer stückweisen Entfernung des Gewebes in Fragmenten im Hinblick auf das Risiko für Lokalrezidive sowie für eine meningeale Aussaat von Tumorzellen. Bei größeren Tumoren kann jedoch eine initiale interne Dekompression erforderlich sein (Patel et al., 2015).

Die Erweiterung der Operationstechnik um neurophysiologisches Monitoring und Wach-Eingriffe macht die neurochirurgische Resektion heute zu einem sicheren und erfolgreichen Therapieansatz. Unter der Resektion kann hierbei eine 60 Hertz (Hz)-Sonde zur kortikalen und subkortikalen Stimulation bei simultanem Monitoring von Motorik, Sensorik, Kognition und Sprache eingesetzt werden. In einer groß angelegten Analyse aus dem Jahr 1998 lag die Rate neurologischer Komplikationen nach Kraniotomie zur Resektion intraaxialer Tumoren bei 8,5% (Sawaya et al., 1998). Unter den modernen Kautelen dieses Verfahrens konnte in einer Serie von 19 Patienten die supramarginale Resektion einer eloquent gelegenen BM durchgeführt werden ohne permanente Defizite zu induzieren (Kamp et al., 2012).

Für maligne Gliome gilt die fluoreszenzgestützte Resektion (FGR) mittels 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) als Goldstandard, da diese das progressionsfreie Überleben signifikant verlängert. 5-ALA wird dabei spezifisch in Tumorzellen zu Protoporphyrin IX umgewandelt, welches unter Blaulicht rötlich fluoresziert (Stummer et al., 2006). Nach der oralen Applikation von 5-ALA kann intraoperativ jedoch nur in 40% der Patienten mit BM eine Fluoreszenz induziert werden (Kamp et al., 2016). Es zeigt sich kein verbessertes operatives Ergebnis oder ein verlängertes Überleben für BM-Patienten, die mit einer 5-ALA induzierter FGR behandelt wurden (Shah et al., 2022). Fluoreszein hingegen ist ein intravenös applizierter Fluoreszenzfarbstoff, der Regionen mit gestörter Bluthirnschranke unter ultraviolettem Licht visualisiert. Diese korrelieren mit den kontrastmittelaufnehmenden Tumorbereichen und es konnte gezeigt werden, dass sich unter FGR mittels Fluoreszeins im Vergleich zur konventionellen Resektion unter Weißlicht das postoperative Tumolvolumen signifikant reduzieren und das Ausmaß der Resektion sowie das Gesamtüberleben signifikant erhöhen lässt (Schebesch et al., 2023). Dieses Verfahren wird daher auch in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf standardmäßig zur Resektion von BM angewandt.

Im Rahmen der evidenzbasierten Indikationsstellung zur operativen Therapie muss die klinische Situation des Patienten vor dem Hintergrund eines möglichen Therapieerfolges kritisch diskutiert werden. Um einen Therapieerfolg an standardisierten Patientengruppen systematisch zu untersuchen, wurden auf Grundlage prognostischer Faktoren folgende Untergruppen klassifiziert: RPA Klasse 1: KPS \geq 70, $<$ 65 Jahre mit kontrolliertem Primarius und keiner extrakraniellen Metastasierung; RPA Klasse 3: KPS $<$ 70; RPA Klasse 2: alle anderen (Gaspar et al., 1997). Hinsichtlich multipler BM zeigte sich dabei in einer retrospektiven Analyse lediglich ein signifikanter Vorteil im medianen Überleben nach Operation bis zu einer Anzahl von vier BM. Bei der Entscheidung zur Operation sind demnach Patienten mit RPA Klasse 1, prä- und postoperativem KPS \geq 70 sowie einer möglichen Kompletresektion und adjuvanten Ganzhirnbestrahlung (engl.: *Whole Brain*

Radiotherapy (WBRT)) zu bevorzugen. Bei multiplen BM inklusive großen Läsionen ($\geq 27 \text{ cm}^3$) kann durch die Operation ein Masseneffekt reduziert und Zeit bis zum adjuvanten Therapiebeginn gewonnen werden, wenngleich dabei kein Effekt auf das Gesamtüberleben erzielt werden kann (Schackert et al., 2013).

In einer aktuellen bi-zentrischen, retrospektiven Studie mit 750 Patienten, die zwischen 2010 und 2019 behandelt wurden, konnte jedoch gezeigt werden, dass sich der KPS postoperativ sogar verbessert. Der mediane präoperative KPS von 80 verbesserte sich nach Resektion auf 90. Doch auch Patienten mit deutlich verschlechtertem KPS profitierten in dieser Studie von einer Resektion, wenn schwerwiegende Symptome trotz kleiner Läsionen aufgrund eloquenter Lokalisationen oder eines begleitenden Ödems auftraten. Somit waren von 139 Patienten, die präoperativ der RPA Klasse 3 zuzuordnen waren, 82 postoperativ in die RPA Klassen 1 und 2 zu verorten. Dies schafft Evidenz für die Rolle der Resektion im Hinblick darauf, dass Patienten nach der OP und assoziierter Molekulardiagnostik in einen klinischen Zustand versetzt werden, ihre personalisierte adjuvante Therapie zu erhalten (Schodel et al., 2020). Bei einzelnen BM galt bisher die Indikation zur histologischen Diagnosesicherung vom Intervall seit Diagnose des Primarius abhängig zu machen. Je länger diese zurücklag, desto eher sollte eine Probenentnahme erfolgen (Weller, 2015). Besonders auf dem Weg in ein Zeitalter personalisierter Therapieansätze unter Berücksichtigung sichererer Operationstechniken ist die Indikation zur Probengewinnung im Rahmen eines operativen Zugangs jedoch zunehmend weiter zu fassen.

Radiotherapie

Für Patienten mit multiplen Metastasen, meningealer Aussaat oder schlechtem klinischen Status, die nicht von einer operativen Resektion profitieren würden, bietet sich die WBRT als Therapieoption an. Das Zielvolumen der Bestrahlungsplanung wird auf Grundlage eines CT erstellt und umfasst die Schädelbasis sowie die basalen Zisternen (Weller, 2015). Dabei besteht ein Cochrane-basierter Konsens, 30 Gy in zehn Fraktionen zu applizieren (Tsao et al., 2018), welche homogen im Zielvolumen verteilt werden. Über den zweiwöchigen Zeitraum der Bestrahlungen sowie üblicherweise jeweils eine Woche vor und nach der Therapie müssen systemische Pharmakotherapien aufgrund möglicher toxischer Begleiterscheinungen pausiert werden. Daher und auch aufgrund der limitierten Prognose in dieser Konstellation besteht der Ansatz, die Bestrahlung auf 20 Gy Gesamtdosis in fünf Fraktionen zu verkürzen. In einer Phase-III Studie, dem QUARTZ-Trail (engl.: *Quality of Life after Treatment for Brain Metastases*), wurden 538 Patienten mit NSCLC BM in die Gruppen Best Supportive Care (engl. für bestmögliche unterstützende Behandlung im palliativen Konzept) inkl. Dexamethason und einer WBRT

von 20 Gy in fünf Fraktionen oder nur Best Supportive Care inkl. Dexamethason randomisiert. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich des Gesamtüberlebens, der Lebensqualität oder der benötigten Glukokortikoid-Dosis gezeigt werden. Hingegen traten in der WBRT Gruppe signifikant häufiger Episoden von Schläfrigkeit, Haarausfall, Übelkeit und trockener oder juckender Kopfhaut auf. Für Patienten mit geringem klinischen Performancestatus (KPS \leq 60) und limitierter Prognose (Gesamtüberleben $<$ 4 Monate) besteht demnach keine Evidenz zur Applikation von WBRT (Mulvenna et al., 2016).

Für singuläre Metastasen nach kompletter Resektion konnte ein signifikanter Vorteil im Hinblick auf ein Lokalrezidiv für die postoperative WBRT gefunden werden (46% vs. 10%). Das Gesamtüberleben wird hierdurch jedoch nicht verbessert (Patchell et al., 1998).

In den vergangenen Jahrzehnten sind die Nebenwirkungen der WBRT besonders in den Vordergrund gerückt. Akut können Fatigue, Erytheme, Alopezie, seröse Otitis und ein veränderter Geruchs- und Geschmackssinn auftreten. Im Langzeitverlauf sind Patienten besonders von Gedächtnis- sowie Konzentrationsstörungen betroffen (Suh et al., 2020). Um diesen neurokognitiven Veränderungen vorzubeugen, werden unterschiedliche Konzepte diskutiert wie bspw. die Antagonisierung der durch Bestrahlung induzierten exzessiven neuronalen Erregung (Dye et al., 2015) mittels Memantin (Brown et al., 2013) oder die Schonung hippocampaler Stammzellen bei der Bestrahlungsplanung zur Protektion der Gedächtnisfunktion (Brown et al., 2020).

Neben diesen Ansätzen hat sich die Stereotaktische Radiotherapie (SRT; Synonym auch Radiochirurgie, Gamma- oder Cyber-Knife) ohne eine Reduktion des Gesamtüberlebens bei uneingeschränkter Neurokognition als Alternative zur WBRT herausgestellt. Im Rahmen der SRT kann eine gute lokale Kontrolle bei zeitgleicher Schonung des umliegenden Gewebes erreicht werden, indem die hohe Strahlendosis im Tumor nach peripher stark abfällt (Weller, 2015). In einer Vielzahl von Studien wurde dabei die SRT gegen SRT plus WBRT verglichen. Das Gesamtüberleben unterschied sich dabei nicht zwischen beiden Gruppen (Suh et al., 2020). Die SRT ist daher für singuläre, solitäre und operativ schlecht zugängliche Metastasen, sowie oligometastasierte, internistisch vorerkrankte oder Patienten mit Rezidiv nach WBRT oder Resektion leitliniengerecht (Weller, 2015).

Inzwischen haben mehrere Studien gezeigt, dass sich das Gesamtüberleben von Patienten mit \leq 15 BM nicht signifikant von Patienten mit zwei bis vier Metastasen nach SRT unterscheidet (Hughes et al., 2019, Joshi et al., 2019). Die Entscheidung über SRT oder WBRT sollte daher nicht ausschließlich auf der Anzahl der Läsionen basieren (Suh et al., 2020). Die SRT stellt darüber hinaus eine adjuvante Therapieoption nach operativer

Exstirpation dar. Das Gesamtüberleben von Patienten mit bis zu vier resezierten BM in einer Phase-III Studie mit Randomisierung in die Gruppen WBRT oder SRT unterschied sich dabei nicht (Kayama et al., 2018).

Die Dosis einer Einzeitbestrahlung bei SRT richtet sich nach dem Durchmesser der Läsion, beträgt > 20 mm 18 Gy (Weller, 2015) und erreicht ab dieser Größe häufig keine lokale Kontrolle (Vogelbaum et al., 2006). Eine fraktionierte Bestrahlung in drei Sitzungen mit einer kumulativen Dosis von 27 Gy zeigte für BM Läsionen > 20 mm im Vergleich mit einer Einzeitbestrahlung mit 18 Gy hingegen signifikante Vorteile hinsichtlich der lokalen Kontrolle (91% vs. 77%) und halbierte das Risiko für die Entstehung einer Strahlennekrose (9% vs. 18%) (Minniti et al., 2016).

In der Therapie des Nierenzellkarzinoms und malignen Melanoms hat die Radiotherapie keinen Stellenwert, da diese Entitäten als strahlenresistent gelten. In einem Modell, basierend auf mit Strahlenresistenz-assoziierten Genen, konnte gezeigt werden, dass diese über alle Entitäten von BM hinweg exprimiert werden (Ahmed et al., 2017). Die Annahme, dass BM strahlenresistenter Primärtumoren nicht strahlentherapeutisch behandelt werden könnten, wurde jedoch widerlegt, da der Therapieerfolg der SRT von diesen Resistenzen nicht tangiert wird: In einer retrospektiven Analyse mit 126 Patienten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die lokale Kontrolle zwischen BM strahlensensibler und BM strahlenresistenter Primärtumoren (Yaeh et al., 2015).

Zur Überwachung eines Therapieerfolges sowie zur Differenzierung Strahlentherapie-induzierter Veränderungen von möglichem Krankheitsprogress kann die Positronenemissionstomographie (PET) herangezogen werden. Bei diesem nuklearmedizinischen Verfahren ist bei der Darstellung zerebraler Prozesse die Verwendung radioaktiv-markierter Aminosäuren als Tracer (bspw. ^{18}F -Fluorethylthymosin, FET-PET) der Verwendung von ^{18}F -Fluorodeoxyglucose (FDG-PET) überlegen, weil FDG von gesundem Hirngewebe verstoffwechselt und die Sensitivität somit limitiert wird (Galldiks et al., 2019, Le Rhun et al., 2021).

Pharmakotherapie

Die Paradigmen der Pharmakotherapie von BM haben sich in den letzten Jahren drastisch verändert. Die Blut-Hirn-Schranke (engl. *blood-brain barrier*, (BBB)) ist für Pharmaka permeabel, Infiltrate von Immunzellen dringen in das Gehirn ein, BM sind kein konsequentes Exklusionskriterium für klinischen Studien mehr und insofern gibt es auch bereits Daten mit Überlebensvorteilen für Systemtherapien. Inwiefern die MRT-Kontrastmittelaufnahme prädiktiv für die Penetration tumorspezifischer

Pharmakotherapien wie bspw. monoklonaler Antikörper oder deren Konjugate in das Tumorgewebe ist, bleibt unklar (Le Rhun et al., 2021). Zerebrale Tumoren verändern jedoch immer die physiologische BBB; es kommt zur heterogenen Ausbildung permeabler Abschnitte trotz aktivem Efflux. Diese vaskulären Veränderungen an Gehirntumoren werden als *blood-tumor barrier* (deutsch: Blut-Tumor Schranke (BTB)) bezeichnet. Es besteht eine starke Heterogenität bei der Penetration von Pharmaka in eine Läsion und auch zwischen Läsionen unterschiedlicher Entitäten. Zytotoxische Chemotherapeutika(-kombinationen) wie Cisplatin/Pemetrexed, Cisplatin/Vinorelbine, Cisplatin/Paclitaxel, sowie Temozolomid erwiesen sich bei der Behandlung von BM in multiplen klinischen Studien als insuffizient, womöglich u.a. aufgrund der unzureichenden BBB-Penetration (Suh et al., 2020). Um diesem Problem zu begegnen sind verschiedene Ansätze Gegenstand aktueller Untersuchungen. Hier zu nennen sind bspw. Effluxpumpen-Inhibitoren oder disruptive Ansätze mittels fokussierten Ultraschalls oder Radiotherapie (Arvanitis et al., 2020).

Bei der Indikationsstellung für eine personalisierte Systemtherapie sollte die Molekulargenetik der BM und weniger die des zugehörigen Primärtumors herangezogen werden (Le Rhun et al., 2021), da in 53% der BM personalisiert therapierbare Alterationen gefunden werden, die nicht im Primärtumor detektiert werden konnten (Brastianos et al., 2015). Es gilt aber weiterhin dass BM-Patienten hinsichtlich der Verfügbarkeit zielgerichteter Therapien von der erfolgreichen Entwicklung neuer Pharmaka profitieren können, die bereits Wirksamkeit gegen onkogene Alterationen gezeigt haben.

Onkogene Treibermutationen im NSCLC betreffen zumeist den *epidermal growth factor receptor* (EGFR), die *anaplastic lymphoma kinase* (ALK), das *c-ros oncogene 1* (ROS1) oder das *Ret proto-oncogene* (RET) und sind zudem mit einer höheren kumulativen Inzidenz für BM assoziiert (Le Rhun et al., 2021). In *EGFR*-mutierten NSCLCs gilt der Einsatz des Tyrosinkinase-Inhibitors (TKI) Osimertinib inzwischen als Erstlinientherapie (Suh et al., 2020). Dieser wirkt zum einen auch gegen die *EGFR* T790M-Mutation, ein häufiger Mechanismus der Resistenzentwicklung unter früheren *EGFR*-Inhibitoren, und zeigte in einer Phase-III Studie eine bessere Protektion vor der Ausbildung von BM gegenüber *EGFR*-Inhibitoren der ersten beiden Generationen (Soria et al., 2018). Während *EGFR*-Mutationen bei zwischen 15 und 35% der NSCLC auftreten, findet sich die ALK-Translokation lediglich in bis zu 7%. Bei der zielgerichteten Behandlung von ALK-mutierten NSCLC BM hat sich Alectinib oder Brigatinib als Erstlinientherapie etabliert (Suh et al., 2020, Camidge et al., 2018).

Amplifikationen des *fibroblast growth factor receptor* (*FGFR*) Gens hingegen kommen in etwa 17% der NSCLC BM vor, sind damit bis zu fünfmal häufiger in BM im Vergleich zu

primären NSCLC (Preusser et al., 2014) und prädestinieren auch bei Mammakarzinomen für eine zerebrale Metastasierung und schlechte Prognose (Xie et al., 2020). Im Rahmen der Phase-III LUME-Lung 1 Studie konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie aus dem FGFR-Inhibitor Nintedanib und Docetaxel in Patienten mit vorbehandeltem NSCLC signifikant zur Verlängerung des progressionsfreien und Gesamtüberlebens führt (Reck et al., 2014). Dies sind Hinweise für einen potentiellen Therapieansatz in *FGFR*-amplifizierten BM, der bisher nur im Rahmen einer Phase-I Studie für solide Tumoren untersucht worden ist (Bahleda et al., 2020).

Zur Behandlung *ROS1*-translozierter NSCLC BM sind Entrectinib oder Lorlatinib Gegenstand aktueller Studien, da neue Daten eine anhaltende Krankheitskontrolle zeigen (Drilon et al., 2020b, Schneider et al., 2022). Diese Mutation tritt nur in 1-2% der NSCLC BM auf; die Identifikation dieser Alteration ist jedoch insofern relevant, als dass bei *ROS1*-alterierten NSCLC Patienten unter Crizotinib-Therapie (Crizotinib ist neben ALK- auch ein *ROS1*-Inhibitor) häufig BM auftreten und daher die Verwendung ZNS-wirksamer TKIs wie Entrectinib oder Lorlatinib bedacht werden sollte (Patil et al., 2018).

Mutationen im *Kirsten rat sarcoma viral oncogene* (*KRAS*) treten in ca. 30% der NSCLC BM auf. Die Bemühungen der vergangenen Dekaden, *KRAS*-spezifische Therapien zu entwickeln resultierten im Januar 2022 in der erstmaligen Zulassung von Sotarasib beim NSCLC. Sotarasib führte zu einem Gesamtüberleben von 8,3 Monaten bei Patienten mit stabilen NSCLC BM, die zuvor bestrahlt oder operiert worden waren (Ramalingam et al., 2021). Eine zurzeit rekrutierende Studie untersucht den Effekt von Sotarasib auf aktive, unbehandelte BM (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04185883). Daneben werden in diesem Kontext auch Adagrasib (MRTX849) (Sabari et al., 2022) und Naporafenib (LXH254) (Wolf et al., 2020) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02607813) in klinischen Studien untersucht.

Eine Therapie mit Selpercatinib in *RET*-fusionierten NSCLC BM-Patienten zeigte eine intrakranielle objektive Ansprechrate von 91%. Diese kommt zwar nur in 1-2% aller NSCLC vor (Drilon et al., 2020a), ist aber im Hinblick auf die selektive *RET* Inhibition durch Selpercatinib hoch prädiktiv. Etwa ein Drittel aller NSCLC weisen einen Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens *STK11* auf, welcher unter anderem über eine Dysregulation des Hypoxie-induzierbaren Faktor 1-alpha (*HIF-1 α*) onkogen wirkt. Patienten mit dieser Mutation zeigen ein unterlegenes Ansprechen auf PD-L1 gerichtete Immuntherapien und weisen ein zumeist kühles immunologisches Mikromilieu im Tumor auf (Laderian et al., 2020). Präklinische Daten zeigen zum einen eine Sensitivität *STK11*-mutierter NSCLC Zellmodelle gegenüber dem ERK-Inhibitor Ulixertinib (Caiola et al., 2020), der eine gute Hirnpenetration zeigt (Sigaud et al., 2023). Zum anderem kann der *HIF*-Signalweg durch eine Reihe von Wirkstoffen zielgerichtet adressiert werden (Masoud and Li, 2015).

Etwa ein Viertel aller NSCLC BM-Patienten weist keine bekannten onkogenen Treibermutationen auf, die Ziel personalisierter Therapien sind. In einer aktuellen Untersuchung konnte gezeigt werden, wie unterschiedlich das Tumormikromilieu (engl. *tumor microenvironment* (TME)) zwischen hirneignen Tumoren, BM und BM diverser Primärtumoren zusammengesetzt ist. Wohingegen Gliome überwiegend immunologisch kalt erschienen, konnten im TME von BM Lymphozyten und neutrophile Granulozyten detektiert werden. Darüber hinaus wurden bei Melanom BM eine Vielzahl an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gefunden, während in Mammakarzinom BM Neutrophile die größte Fraktion darstellten (Klemm et al., 2020). So erklärt sich die Wirksamkeit von Immuncheckpoint-Inhibitoren in der Behandlung von BM, deren Einsatz besonders relevant in Abwesenheit von Treibermutationen ist. Im fortgeschrittenen NSCLC ohne Treibermutation stellt die Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen das *anti-programmed cell death protein 1* (PD-1) oder den *programmed death-ligand 1* (PD-L1) in oder ohne Kombination mit Platinbasierter Chemotherapie inzwischen die Standardtherapie dar. Der PD-1-Inhibitor Pembrolizumab zeigte in einer Phase-II Studie Ansprechraten von 33% in NSCLC BM und 22% in Melanom BM (Goldberg et al., 2016). Die aktuelle Auswertung der ATEZO-BRAIN Studie, einer multizentrischen Phase-II Untersuchung der Wirksamkeit von Atezolizumab (PD-L1-Inhibitor) in Kombination mit Carboplatin und Pemetrexed bei Patienten mit fortgeschrittenem EGFR- und ALK-Wildtyp NSCLC und bisher unbehandelten BM, zeigt vielversprechende Ergebnisse mit einem 2-Jahres-Gesamtüberleben von 30,5% (Nadal et al., 2022). Nivolumab (PD-1-Inhibitor) in Kombination mit der Inhibition des *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) durch Ipilimumab zeigt ebenso vielversprechende Ansprechraten von 57% bei Patienten mit Melanom BM (Tawbi et al., 2018). Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse ist diese Kombinationstherapie als Erstlinie ungeachtet des *BRAF*-Mutationsstatus einzusetzen (Le Rhun et al., 2021). Da die Effektivität dieser Immuntherapie unter Kortikosteroideinnahme bei symptomatischen BM jedoch stark reduziert ist (Long et al., 2018), ist ab einer Tagesdosis von 4 mg Dexamethason eine *BRAF*-zielgerichtete Therapie angezeigt (Le Rhun et al., 2021). Für die Behandlung dreifach negativer BM des Mammakarzinoms rekrutiert eine Phase-II Studie aktuell zur Kombination eines neuen PD-L1-Inhibitors (SHR-1316) mit Cisplatin und Carboplatin sowie Bevacizumab (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04303988). Im SCLC konnte ein signifikanter Überlebensvorteil für eine Kombinationstherapie aus Durvalumab (PD-L1-Inhibitor), Platin und Etoposid gegenüber der alleinigen Verwendung der zytotoxischen Chemotherapie nachgewiesen werden (Paz-Ares et al., 2019). Die Untersuchung der Effekte auf SCLC BM ist bislang ausstehend.

Histondeacetylase (HDAC)-abhängige epigenetische Veränderungen sind ein Schlüsselmechanismus bei der Karzinogenese und Metastasierung von NSCLC. HDAC-Inhibitoren zeigen pleiotrope zelluläre Effekte mit pro-apoptotischer Wirkung und stellen damit eine weitere Therapieoption bei der Behandlung von Tumoren ohne onkogene Treibermutation dar. Derzeit gibt es eine Reihe klinischer Studien zur Testung der Wirksamkeit dieser Wirkstoffgruppe in Kombination mit Immuntherapeutika zur Therapie des NSCLC (Mamdani and Jalal, 2020).

Für BM des Mammakarzinoms mit negativem HER2-Rezeptorstatus haben klassische Chemotherapiekombinationen wie Capecitabin/Temozolomid, sowie Cisplatin/Temozolomid mediane Gesamtüberlebensdauern von 5,5 Monaten gezeigt (Rivera et al., 2006, Christodoulou et al., 2005). Für Patienten mit ER-positivem/HER2-negativem BM und intensiver Vortherapie zeigte sich unter Abemaciclib, einem selektiven *cyclin-dependent kinase* (CDK) 4 und CDK6 Inhibitor, ein progressionsfreies Intervall von 4,4 Monaten (Tolaney et al., 2020). Für Patienten mit dreifach negativen BM oder vom luminalen Typ gibt es hingegen wenig Evidenz zur Empfehlung einer systemischen Behandlung. Bei progressiven, dreifach negativen BM kann eine Kombinationstherapie aus Carboplatin und Bevacizumab eingesetzt werden (Lin et al., 2013a, Bailleux et al., 2021). Ein positiver HER2-Rezeptorstatus ist im Gegensatz dazu vorteilhaft für eine zielgerichtete Therapie: Als Zweitlinie nach Trastuzumab konnte eine Kombinationstherapie aus Lapatinib (einem HER2-TKI) und Capecitabin eine kraniale Ansprechrate von 66% zeigen (Bachelot et al., 2013). Andere HER2-Signalweginhibitoren wie Neratinib, Tucatinib und Tesevatinib zeigen gute initiale klinische Ansprechraten und sind Gegenstand aktueller Untersuchungen (Suh et al., 2020). Der Einsatz von Trastuzumab wurde intensiv unter dem Aspekt der höheren Inzidenz für eine isolierte ZNS-Progression diskutiert. Im Ergebnis einer Metanalyse von drei klinischen Studien konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass die Behandlung mit Trastuzumab günstig bezüglich krankheitsfreiem und Gesamtüberleben ist, aber zu einem signifikanten Anstieg der Inzidenz an BM führt (Bria et al., 2008). Die Behandlung asymptomatischer BM mit einem Konjugat aus Trastuzumab und Emtansin in Kombination mit einem Taxan zeigte jedoch einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zu der Behandlung mit einer Kombinationstherapie aus Lapatinib und Capecitabin (26,8 vs. 12,9 Monate) (Krop et al., 2015). Daher ist diese Systemtherapie leitliniengerecht bei asymptomatischen BM eines Mammakarzinoms anzuwenden, um die Behandlung durch eine WBRT hinauszuzögern (Le Rhun et al., 2021).

Zur Behandlung von BM eines malignen Melanoms konnte bisher keine Pharmakotherapie suffiziente Wirkungen erzielen (Gutzmer et al., 2020). Die zielgerichtete Behandlung einer Mutation im Protoonkogen *BRAF*, die in etwa 40-50% dieser BM zu finden ist (Becco et al., 2020), mit Verurafenib oder Dabrafenib führte nur zu einem kurzzeitigen Ansprechen (Davies et al., 2017). In Einzelfällen bietet die seltene Aberration im Gen der Tyrosinkinase KIT (etwa 2%) einen Angriffspunkt für KIT-Inhibitoren (z.B: Imatinib und Sunitinib) (Terheyden et al., 2019).

TTFields

Eine moderne vielversprechende Lokalthherapie besteht in der Behandlung mit Tumor Treating Fields (TTFields). Diese führt bei der Behandlung eines neudiagnostizierten Glioblastoms (GBM) in Kombination mit Temozolomid gegenüber einer Temozolomid-Monotherapie zu einer Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens von 4,9 Monaten. Das 2-Jahres-Gesamtüberleben lag im TTFields-Temozolomid Arm bei 43%; im Temozolomid Arm lediglich bei 31% (Stupp et al., 2017). Die METIS-Studie untersucht den Effekt von TTFields in Kombination mit SRT hinsichtlich der Zeit bis zur intrakraniellen Progression von NSCLC BM (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02831959). TTFields werden darüber hinaus in einer Vielzahl an klinischen Studien zur Behandlung des rezivierenden GBM, malignen Pleuramesothelioms, NSCLC, Pankreas-, Ovarial-, Magen- und hepatozellulären Karzinoms untersucht und sind bereits für drei Indikationen erstattungsfähig zugelassen.

Der zugrundeliegende Wirkmechanismus niederfrequenter, alterierender elektrischer Wechselfelder besteht in der Störung des Aufbaus des Spindelapparates in der Metaphase des Zellzyklus. Hoch polare Bestandteile des Spindelapparates, wie das Molekül Tubulin, werden nur insuffizient organisiert. In der Konsequenz kommt es zu einer abnormalen Verteilung der Chromosomen in der Anaphase. In der anschließenden Telophase kommt es zudem zur Migration polarer Zellorganelle in Richtung der Teilungsfurche, wodurch die Zytokinese gestört wird. Hierdurch wird ein mitotischer Zelltod induziert (Kirson et al., 2007). Die im Tiermodell beobachteten abkopalten Effekte unter TTFields-Behandlung (Kirson et al., 2009) wurden auf eine zusätzliche immunogene Aktivierung zurückgeführt. Dabei werden Makrophagen zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine angeregt sowie dendritische und T-Zellen rekrutiert (Rominiyi et al., 2021). Auf dieser Grundlage wurden derzeit rekrutierende Studien zur Kombination von TTFields mit Immuntherapie konzipiert (z.B. EF-41/Keynote D58).

1.1.5. Prognose

Die Prognose für das Gesamtüberleben für Patienten mit BM lag gemittelt für alle Primärtumoren zwischen 2010 und 2013 bei 5 Monaten (Cagney et al., 2017) (Abbildung 3). In einer großen retrospektiven Studie mit 750 BM-Patienten konnte jedoch gezeigt werden, dass in nur 26,7% der Fälle als Todesursache die zerebrale Progression auszumachen war, wohingegen Patienten in 66,7% der Fälle aufgrund eines systemischen Krankheitsprogress verstorben waren. Daher ist eine Diagnose von BM im Verlauf einer onkologischen Erkrankung kein Grund mehr, weitergehende Therapien abzusetzen – im Gegenteil. Das mediane Gesamtüberleben nach multimodaler Behandlung lag in dieser Kohorte für den Zeitraum zwischen 2010 und 2019 schon bei 10,9 Monaten. Dabei war das Ausmaß der neurochirurgischen Resektion lediglich bei singulären oder solitären BM prognostisch für das Gesamtüberleben. Außerdem konnte kein signifikanter Einfluss der Primärtumorart festgestellt werden. Eigenständige prognostisch günstige Faktoren sind ein postoperativer KPS ≥ 70 , ein kontrollierter Primärtumor, postoperative Systemtherapie sowie eine Anzahl von BM < 4 (Schodel et al., 2020).

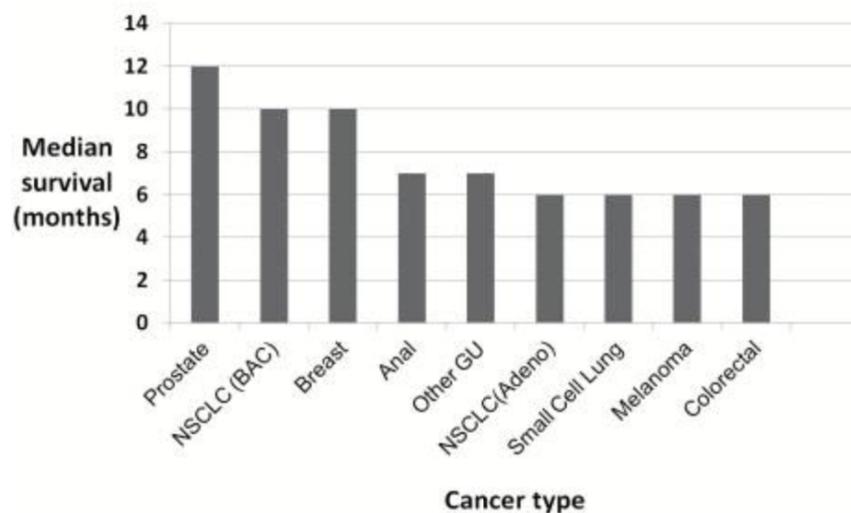


Abb. 3: Medianes Gesamtüberleben für BM-Patienten aufgeschlüsselt nach den zugehörigen Primärtumoren.

Auf Grundlage des SEER wurde das mediane Gesamtüberleben für BM-Patienten zwischen 2010 und 2013 ermittelt und ist hier für die jeweiligen Tumorentitäten aufgeschlüsselt dargestellt (aus Cagney et al., 2017). BAC (*bronchioloalveolar carcinoma*), engl. für Bronchioalveoläres Karzinom.

Inzwischen ist zudem weniger die Entität des Primärtumors, sondern vielmehr der jeweilige Subtyp ausschlaggebend für die Prognose. Auch das zeigte sich bereits in

diesem Datensatz bei der Analyse des prädiktiven Rezeptorstatus von Mammakarzinom BM (Lamba et al., 2021b) (Tabelle 2).

Rezeptorstatus der Mammakarzinom BM	Medianes Gesamtüberleben (in Monaten)
dreifach negativ	6
HR-/HER2+	10
HR+/HER2-	14
HR+/HER2+	21

Tabelle 2: Medianes Gesamtüberleben mit Mammakarzinom BM aufgeschlüsselt nach dem Rezeptorstatus.

Auf Grundlage des SEER wurde das mediane Gesamtüberleben für BM-Patienten zwischen 2010 und 2013 ermittelt und ist hier für Mammakarzinom BM nach Rezeptorstatus aufgeschlüsselt dargestellt (aus Lamba et al., 2021). HR: Hormonrezeptorstatus (beinhaltet ER und PR).

Diese Daten können als historisch angesehen werden und werden durch die oben dargestellten zielgerichteten Therapieoptionen im Rahmen klinischer Studien stark nach oben korrigiert. So zeigte bspw. die EMILIA-Studie unter Behandlung mit einem Konjugat aus Trastuzumab und Emtansin in Kombination mit einem Taxan bei positivem HER2-Rezeptorstatus schon ein medianes Gesamtüberleben von 26,8 Monaten (Krop et al., 2015). Die Zulassung einer Reihe molekular zielgerichteter Systemtherapien wird sich in der nächsten Dekade hinsichtlich des Gesamtüberlebens ähnlich in Populationsstudien niederschlagen.

1.2. Personalisierte Neuroonkologie

Vor dem Hintergrund der zur Verfügung stehenden personalisierten Therapieoptionen wird deutlich, dass die Testung auf molekulare Alterationen durch eine umfangreiche neuropathologische Aufarbeitung essenziell ist, um zielgerichtet und erfolgreich behandeln zu können. Inzwischen steht eine Vielzahl an Therapeutika bereit, die auch im Setting zerebraler Metastasierung untersucht worden sind. Im Rahmen einer klinischen Plattform (Clinical Research Platform Into Molecular Testing, Treatment and Outcome of (Non-)Small Cell Lung Carcinoma Patients (CRISP, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02622581) wurden Biomarker, Behandlung und Überlebensdaten von Patienten mit NSCLC erfasst. Zwischen 2015 und 2019 wurden molekulare Testungen auf therapierrelevante Biomarker bei insgesamt 3717 Patienten durchgeführt; dies entsprach 92,2% der Patienten vor Erstlinientherapie. Im Detail betrachtet ergaben sich bei den

Testraten auf bereits zum Behandlungsstandard gehörige Therapien inakzeptable Zustände. So wurde nur in 72,5% auf eine *EGFR*-Mutation, in 74,5% auf eine *ALK*-Alteration und in 66,1% auf eine *ROS1*-Alteration getestet; die PD-L1 Expression wurde lediglich in 64,5% der Fälle bestimmt. Am häufigsten wurden diese Ergebnisse mithilfe immunhistochemischer Untersuchungen generiert, während NGS lediglich in 38,7% der Fälle durchgeführt wurde (Griesinger et al., 2021). Bisher liegen noch keine Quoten über die molekulare Aufarbeitung von zugehörigen BM vor.

Neurochirurgisch resezierte oder biopsierte BM sollten daher auf prädiktive Biomarker (Tabelle 3) untersucht werden. Dies geschieht teilweise mithilfe der Immunhistochemie, oftmals aber auch molekularpathologisch, heutzutage meist mittels NGS-basierter Methoden. Die ergänzende Untersuchung der DNA-Methylierung oder auf RNA- und mikro-RNA-Expression ist bislang nicht Bestandteil klinischer Routinediagnostik (Le Rhun et al., 2021), hält aber vor dem Hintergrund der Entwicklungen in der Klassifizierung hirneigenen Tumoren (Capper et al., 2018) sowie hinsichtlich der Identifikation des Primärtumors bei immunhistochemisch nicht klassifizierbaren Geweben großes Potential.

Primärtumor der BM	Prädiktive molekulare Marker / Ziele
Mammakarzinom	HER2, ER/PR, BRCA1/2, PIK3CA, PD-L1
NSCLC	EGFR, ROS1, NTRK1, 2 und 3, ALK, RET, MET, KRAS, BRAF, PD-1/PD-L1
Melanom	BRAF, KIT, NF1, NRAS, PD-L1
Kolorektales Karzinom	KRAS, BRAF, NRAS, PD-L1, MSI
Magen-/Ösophaguskarzinom	HER2, MET
Urothelkarzinom	PD-L1

Tabelle 3: Prädiktive molekulare Biomarker für Patienten mit BM gemäß des zugehörigen Primärtumors.

Die genannten Biomarker können im Rahmen der pathologischen Aufarbeitung des neurochirurgisch entnommenen Gewebes bestimmt werden, da sie maßgeblich für die Therapieentscheidung sein können (aus Le Rhun et al., 2021). *PIK3CA*: *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*; *NTRK*: *neurotrophic tyrosine kinase receptor*; *NF1*: Neurofibromin 1; *MSI*: Mikrosatelliteninstabilität.

In einer kleinen institutionellen Studie mit 41 Glioblastompatienten zeigte sich ein medianes Gesamtüberleben von 13 Monaten für Patienten, die mit einer personalisierten Therapie behandelt wurden, gegenüber 4,3 Monaten für Patienten, die die

Standardtherapie erhielten. Die personalisierte Therapie wurde dabei auf Grundlage klinischer oder sogar präklinischer Daten beliebiger onkologischer Erkrankungen für die entsprechende genetische Alteration ausgewählt. Die zielgerichtete Behandlung zeigte dabei ein sicheres Nebenwirkungsprofil, welches vergleichbar mit dem der Standardtherapie war (Lazaridis et al., 2022). Diese Ergebnisse regen zur molekularen Stratifizierung vor der Behandlung eines bösartigen Hirntumors an und können potenziell auch auf die Behandlung von BM-Patienten übertragen werden. Gegebenenfalls ist gerade hierbei das zur Verfügung stehende pharmakologische Armamentarium sogar umfangreicher, da molekulare Therapieziele häufig bereits für die Behandlung der entsprechenden Primärtumoren evaluiert wurden. Am besten geschieht dies jedoch im Rahmen klinischer Studien.

1.2.1. Gensequenzierung

Für die Gensequenzierung stellt sich insbesondere für Metastasen die Frage, inwiefern die Ergebnisse sich von denen im zugehörigen Primärtumor unterscheiden oder inwiefern Aberrationen womöglich sogar für eine Metastasierung in das ZNS prädestinieren. Darüber hinaus bieten manche der nachgewiesenen Treibermutationen einen Angriffspunkt für Therapeutika. Bei einer Analyse von 86 BM und ihren jeweils korrespondierenden Primärtumoren mittels Exom-Sequenzierung fiel auf, dass 53% der BM mindestens eine Mutation aufwiesen, die nicht im Primärtumor zu finden war und für welche zielgerichtete Therapien zur Verfügung stehen. Etwa die Hälfte dieser Zielmutationen waren folglich mit einer Sensitivität für CDK4/6-Inhibitoren, 43% für PI3K–AKT–mTOR-Inhibitoren und ein Drittel für HER2- oder EGFR-Inhibitoren assoziiert (Brastianos et al., 2015). Insbesondere bei Mammakarzinom BM nahm der Anteil an HER2-positiven Tumoren von 41,6% im Primärtumor auf 65,2% unter den BM zu, was sich erheblich auf die Therapieentscheidung auswirkt (Timmer et al., 2017). In einer aktuell rekrutierenden Phase-II Studie werden auf Grundlage dieser Erkenntnisse Patienten mit BM in molekulare Subgruppen stratifiziert und personalisiert behandelt. Dabei stehen Abemaciclib, ein CDK4/6-Inhibitor, Paxalisib, ein PI3K-Inhibitor oder Entrectinib als ROS1-Inhibitor je nach Mutationsstatus zur Verfügung (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03994796).

In der zuvor genannten Analyse konnte zusätzlich gezeigt werden, dass räumlich und zeitlich voneinander entfernte BM im selben Patienten genetisch homogen sind (Brastianos et al., 2015). Dieses Ergebnis ist hoch relevant, da im Falle einer bioptischen Gewebegewinnung bei einer von multiplen BM das Ergebnis der molekularpathologischen Diagnostik repräsentativ für alle BM des Patienten ist. Hinsichtlich der zeitlichen

Homogenität muss jedoch bedacht werden, dass die Entwicklung von Resistenzen gegenüber TKI auch durch über den zeitlichen Verlauf entstehende Mutationen verursacht werden kann (Rosenzweig, 2018). Bei einem zunehmenden Einsatz von TKI in der Behandlung von BM ergibt sich dadurch möglicherweise eine Indikation für eine sequenzielle Biopsie bei zerebralem Progress.

Das "Nationale Netzwerk Genomische Medizin (nNGM)" (Internetseite: <https://ngm-cancer.com/>) wurde 2010 in Köln initiiert und stellt inzwischen die europaweit größte Plattform für molekulare Diagnostik dar. In diesem Rahmen findet eine zentrale molekularpathologische Aufarbeitung des eingesandten Materials für Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen oder daraus entstehenden Metastasen statt, die von den Krankenkassen finanziert wird. So kann Patienten zeitnah eine personalisierte Therapieoption vorgeschlagen werden, die in einem qualitätsgesicherten Rahmen erstellt worden ist. Als Verbundstandort werden auch Gewebe von am Universitätsklinikum Düsseldorf behandelten Patienten molekularen Zusatzuntersuchungen zugeführt und datenbankbasierte Therapievorschlage erstellt.

1.2.2. Zellmodelle zerebraler Metastasen

Zellmodelle zerebraler Metastasen sind in der klinischen Forschung insbesondere im Hinblick auf eine prätherapeutische Wirkstofftestung interessant. Hierbei könnten sowohl Schlüsse von Patientengruppen gleicher diagnostischer Charakteristika als auch von individuellen Patienten auf den Erfolg einer Therapie mit getesteten Wirkstoffen gezogen werden. In Anbetracht der Reichweite solcher Ergebnisse sind jedoch eine gründliche methodische Reliabilität sowie Validität vorausgesetzt. Diese angelegten Gütekriterien werfen die Frage auf, inwieweit das Modell repräsentativ für die Situation im Patienten ist und darüber hinaus Vorhersagen für das klinische Ansprechen ermöglicht.

Krebsstammzellen

Aus der oben aufgezeigten genetischen Dynamik zwischen Primärtumor und BM sowie den Anforderungen an Zellen unter dem Prozess der Metastasierung leitet sich die Hypothese ab, dass BM aus einer Subpopulation genetisch distinkter Zellen (sog. *tumour initiating cells (TIC)* oder *cancer stem cells (CSC)*; deutsch: tumorinitierende Zellen oder Krebsstammzellen) entstehen (Singh et al., 2014). Diese können sich selbst erneuern und bilden den Ursprung einer dann möglicherweise ebenso heterogenen Metastase (O'Brien et al., 2007, Eramo et al., 2008, Nolte et al., 2013). Für hirneigene Tumoren wurden die Stammzell-Biomarker CD133, CD15, CD44^{hi}/CD24^{lo} (Mao et al., 2009) sowie die

Aldehyddehydrogenase (ALDH)-Aktivität (Rasper et al., 2010) identifiziert. Die Expression dieser Marker ist auch in Brustkrebs Zellmodellen mit einer erhöhten Neigung zur Migration und Invasion assoziiert und prädestiniert für Metastasierung (Crocker et al., 2009).

Die Bildung von Tumorsphäroiden *in vitro* ist ein Kennzeichen von Stammzellsubpopulationen in einer Zellkultur (Clarke et al., 2006). Dabei repräsentiert eine Sphäroide die Nachkommen einer einzelnen Stammzelle (Tropepe et al., 1999). Nolte et al. (2013) konnten zeigen, dass Patientenproben hirneigener Tumoren sowie solche von NSCLC BM vergleichbare Fähigkeiten zur Ausbildung von Tumorsphäroiden aufweisen. Diese zeigten sogar nach orthotopischer Injektion in immundefiziente Mäuse und anschließender Exstirpation und immunhistochemischer Aufarbeitung dieselbe Expression des Färbeprofils, welches ursprünglich zur Diagnosestellung der BM verwendet worden war. Daraus schlossen sie, dass die etablierten Modelle die Eigenschaften der TIC sowie deren Fähigkeit, in das heterogene Tumorgewebe zu differenzieren, nachbilden konnten. Daneben stellten sie fest, dass die Fähigkeit Tumorsphäroide auszubilden in etablierten BM Zelllinien deutlich erhöht war, was darauf schließen lässt, dass die Stammzellfrequenz mit der Anzahl an Passagen zunimmt. Die Arbeit an etablierten Zelllinien führt daher zu einer Überrepräsentation der Stammzellsubpopulation und kann darüber hinaus die inter- und intratumorale Heterogenität nicht so gut abbilden, sodass die Etablierung individueller Patientenzelllinien erforderlich ist (Nolte et al., 2013).

Wirkstofftestungen an Zellmodellen

Aufgrund der umfangreichen molekularen und metabolischen Heterogenität von bspw. NSCLC BM ist die Therapieplanung allein anhand genomischer Alterationen nicht immer ideal. Lee et al. (2015) konnten eine mit dem BM Patientengewebe vergleichbare Expression der immunhistochemischen Marker in ihren Zellmodellen reproduzieren und weitergehend auch die genomische Übereinstimmung mit dem Patientengewebe anhand von Panelsequenzierungen validieren. Darauf aufbauend führten sie an fünf Zellmodellen eine Wirkstofftestung von 20 in der NSCLC-Therapie etablierten oder sich derzeit in klinischer Prüfung befindlichen Medikamente durch. Dabei zeigten sich trotz z.T. übereinstimmender genomischer Alterationen um das >100-Fache Unterschiede in der Effizienz des Wirkstoffansprechens (gemessen anhand der IC_{50} (*inhibitory concentration*; deutsch: inhibitorische Konzentration). Dies unterstreicht einen personalisierten Ansatz bei der Etablierung einer klinischen Pipeline zur individuellen Wirkstofftestung in Patienten mit metastasiertem NSCLC (Lee et al., 2015).

Morikawa et al. (2023) etablierten sechs Zellmodelle zerebraler Metastasen von Mammakarzinomen und führten diese einer Wirkstofftestung mit über 350 Medikamenten zu. Die Paarung genomischer Alterationen mit auf diese zielgerichteten Wirkstoffen war auch hierbei nicht immer konkordant. Die Autoren der Studie diskutierten daher den Stellenwert der Hochdurchsatztherapietestung gegenüber der Panelsequenzierung. Letztere ergibt derzeit eine Liste zielgerichteter Wirkstoffe ohne Rangfolge. Die Entscheidungsfindung zur weiteren Therapieplanung obliegt dabei ohne Möglichkeit, das jeweilige Therapieansprechen vorherzusagen, den Patienten und behandelnden Ärzten. Eine individuelle Hochdurchsatztherapietestung ermöglichte dabei eine weitergehende Priorisierung der Ergebnisse. Darüber hinaus konnten in diesen Testungen Wirkstoffe identifiziert werden, die normalerweise nicht in der Therapieplanung dieser Entität eingesetzt worden wären und Bestandteil insbesondere von klinischen Untersuchungen Chemotherapie-resistenter Tumoren sein könnten (Morikawa et al., 2023).

Tumorsphäroide

Zusammenfassend stellt sich heraus, dass etablierte Zellmodelle mit zunehmender Anzahl an Passagen nur begrenzte Schlüsse auf die Situation im Ursprungsgewebe zulassen, da die Stammzellfrequenz sowie neue genetische Alterationen unter dem Selektionsdruck *ex vivo* zunehmen. Hinzu kommt, dass Modelle individueller Patienten mit übereinstimmenden genomischen Alterationen nicht immer gleiches Ansprechen auf Wirkstofftestungen zeigen (Mitra et al., 2013). Um valide prätherapeutische Wirkstofftestungen zu ermöglichen, müssen daher kurzfristig generierte Patientenmodelle individuellen Testungen unterzogen werden.

Zweidimensionale (2D) Zellkulturen werden bereits seit 1885 eingesetzt und haben erheblichen Beitrag für das Verständnis fundamentaler Zellbiologie geleistet (Kurz et al., 1997). Heute ist bekannt, dass diese die gewebspezifische Differenzierung, Genexpression und Zell-Zell-Interaktionen nicht angemessen abbilden können. Die Entwicklung dreidimensionaler (3D) Zellkulturen markiert daher eine neue Ära in der *in vitro* Forschung. Hierbei werden die Einzelzellen, die zuvor enzymatisch oder mechanisch aus dem Gewebe dissoziiert wurden, klassischerweise in einer extrazellulären Matrix aus Kollagenen, Proteoglykanen sowie Glykoproteinen ausgesät (Mitra et al., 2013). Diese Matrices sind in der Lage, die natürliche Mikroumgebung nachzubilden (Fridman et al., 2012). Da serumhaltige Kulturmedien, die klassischerweise in 2D Zellkulturen verwendet werden, eine unwiederbringliche Differenzierung von Stammzellen induzieren, wurden serumfreie Medien entwickelt, um die Fähigkeiten des Modells zu verbessern, die Situation *in vivo* nachzubilden. Bereits morphologisch zeigen sich dabei große Unterschiede zwischen beiden Ansätzen: während bspw. Glioblastomzelllinien in

serumhaltigen Medien eine Einzelzellschicht bilden, wachsen sie in serumfreien, mit Stammzell-Wachstumsfaktoren versetzten Medien als nichtadhärente multizelluläre Tumorsphäroide. Letztere weisen gegenüber der 2D-Kultur die Fähigkeit auf, mehrstufig auszudifferenzieren; eine Eigenschaft neuraler Stammzellen. Im Vergleich mit ihrem Ursprungsgewebe zeigen serumfrei kultivierte Zelllinien in Transkriptomanalysen eine stärkere Übereinstimmung als solche die in serumhaltigen Medien kultiviert wurden (Lee et al., 2006). Insofern können mit Stammzell-Wachstumsfaktoren supplementierte Zellkulturmedien verwendet werden, um ohne die Hilfe extrazellulärer Matrices Tumorsphäroide zu erzeugen, die CSC enthalten. Diese Methodik konnte inzwischen auch für BM Zelllinien reproduziert und validiert werden (Nolte et al., 2013).

Xenotransplantate

Den Zellmodellen stehen Tiermodelle gegenüber, die Therapieregime im Organismus und damit auch ein klinisches Ansprechen modellieren können. Sie weisen jedoch einige Limitationen auf: Erstens wachsen nicht alle Transplantate an. Zwar können BM Xenotransplantate deutlich erfolgreicher etabliert werden als solche des Primärtumors (bspw. für NSCLC vs. NSCLC BM: 20% vs. 74% (Lee et al., 2015)), dennoch gelingt dies nach heutigem Stand insgesamt nur in bis zu 80% der Patientenfälle. Zweitens liegt die Zeitspanne bis zur erfolgreichen Etablierung des Modells zwischen vier und acht Monaten. Die klinische Entscheidungsfindung über adjuvante Therapien findet jedoch in den meisten Fällen innerhalb weniger Wochen postoperativ statt. Dahingegen können von Patienten abgeleitete *in vitro* Tumorsphäroide im Vergleich mit einer höheren Erfolgsrate etabliert werden, haben einen geringeren Kosten- und Arbeitsaufwand und können besser expandiert werden (Wang et al., 2022).

Zusammenfassend erfüllen nach heutigem Stand folglich nur Tumorsphäroide die Anforderungen hinsichtlich Quantität, Validität sowie Reliabilität an ein Basismodell für eine Hochdurchsatz-Wirkstofftestung-Pipeline im Rahmen einer individualisierten Therapieplanung für Patienten mit BM.

1.3. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, Zellkulturen zerebraler Metastasen zu etablieren und diese als Modell zu validieren. Dazu sollten Tumorzellen aus nativem Patientengewebe als Tumorsphäroide primär kultiviert werden. Die mikroskopisch gesicherten Tumorsphäroide sollten anschließend mittels NGS untersucht und mit der Gensignatur des Ursprungsgewebes verglichen werden.

In einem weiteren Schritt dieser Arbeit sollten die etablierten Tumorsphäroide *in vitro* Therapietestungen unterzogen werden. Hierfür sollten die Zellmodelle mit Gammastrahlung behandelt, TTFIELDS ausgesetzt oder einer individualisierten Wirkstofftestung auf Basis des onkogenen Profils unterzogen werden.

Abschließend sollte eine Pipeline etabliert werden, molekular validierte Zellmodelle aus BM in einer Hochdurchsatz-Wirkstoff-Testung auf therapeutische Ansatzpunkte zu untersuchen und diese im Rahmen der individuellen Patientensituation exemplarisch zu diskutieren.

Folgende Fragestellungen sollten in dieser Arbeit im Einzelnen bearbeitet werden:

1. Erfolgsrate der Etablierung von 3D-Zellmodellen (Tumorsphäroiden) aus intrazerebralen Metastasen,
2. Validität der Zellmodelle anhand der Übereinstimmung ihrer Mutationsprofile mit denen der zugehörigen intrazerebralen Metastase,
3. Etablierung einer *in vitro* Therapietestung mit multiplen Behandlungsmodalitäten,
4. Etablierung einer Hochdurchsatz-Wirkstoff-Testung für BM und deren Evaluation hinsichtlich individueller adjuvanter Therapieplanungen.

2. Material und Methoden

Für die Durchführung dieser Arbeit wurde ein positives Votum (Studien-Nr. 2020-1124: „Charakterisierung von Primärmodellen zerebraler Metastasen“) der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingeholt. Die an dieser Untersuchung teilnehmenden Patienten wurden zuvor ausführlich über ihren Einschluss in dieses Forschungsvorhaben aufgeklärt und stimmten diesem schriftlich zu.

2.1. Zellmodelle

Bei Patienten, die über die Studie aufgeklärt worden waren und ihr zugestimmt hatten, wurde ein Teil des unter der neurochirurgischen Resektion entnommenen Tumorgewebes zur Etablierung der Zellmodelle verwendet. Hierfür wurden 0,5-1 cm³ Tumorgewebe nativ asserviert und innerhalb von maximal sechs Stunden nach Gewinnung zunächst unter sterilen Kautelen mechanisch mit einem Skalpell und einer Pinzette in 1 mm³ große Stücke zerkleinert und anschließend bei Raumtemperatur für fünf Minuten enzymatisch mittels 1X TrypLE (Gibco, Thermo Fischer, Waltham, USA) angedaut. Durch diesen Arbeitsschritt können Einzelzellen aus dem Gewebe isoliert werden. Durch Inkubation für zehn Minuten

bei Raumtemperatur mit einem Lysepuffer (Red Blood Cells Lysis Buffer, Invitrogen, Carlsbad, USA) wurden in der Suspension befindliche Erythrozyten eliminiert. Die Reaktion der enzymatischen Verdauung sowie des Lysepuffers wurden jeweils mit PBS (Gibco, Thermo Fischer, Waltham, USA) abgestoppt. Das nach Zentrifugation mit 200 g für fünf Minuten entstehende Zellpellet wurde mit Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco, Thermo Fischer) resuspendiert und die verbliebenen Gewebestücke unter Zuhilfenahme eines Zellsiebes (70 µm Porengröße, EASYstrainer, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) entfernt. Die Einzelzellsuspension wurde schließlich auf Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) beschichteten Zellkulturplatten (Greiner Bio-One International GmbH) ausgesät (Folkman and Moscona, 1978) und mit 2% B27 (Gibco, Thermo Fischer), 20 ng/ml bovinem *fibroblast growth factor* (FGF, Peprotech, ThermoFisher), 20 ng/ml humanem *epidermal growth factor* (EGF, Peprotech, ThermoFisher), 5 µg/ml Heparin (Sigma-Aldrich) sowie 1% Pen/Strep (Gibco, ThermoFisher) supplementiert.

Die nach diesem Protokoll generierten Zellmodelle wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in einer befeuchteten Atmosphäre kultiviert, alle 48 h mikroskopisch auf Kontamination mit Mikroorganismen kontrolliert und mit frischem Medium versorgt. Nach finaler Sicherung der Diagnose einer BM durch Erhalt der endgültigen neuropathologischen Befundung des Patientengewebes wurden die Zellmodelle den folgenden Experimenten zugeführt.

2.2. Gensequenzierung

Die DNA-Sequenzierung des Patientengewebes und der korrespondierenden Zellmodelle hatte einerseits zum Ziel, onkogene Treibermutationen zu identifizieren. Andererseits sollte die Validität der Zellmodelle im Hinblick auf ihre genetische Kongruenz mit ihrem Ursprungsgewebe, d.h. der zugehörigen intrazerebralen Metastase, untersucht werden.

Hierzu wurde ein Teil des nativen Patientengewebes am Tag der Operation bei -80 °C asserviert. Der verbliebene Anteil wurde, wie oben beschrieben, zu Zellmodellen prozessiert und kultiviert. Am Tag der Hochdurchsatzwirkstofftestung wurden jeweils mind. 1×10^6 Zellen analog bei -80 °C asserviert. Die Sequenzierungen wurden anschließend am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Zusammengefasst wurde die DNA aus den Proben mit dem Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (ThermoFisher Scientific) aufbereitet und amplifiziert (Behjati and Tarpey, 2013). Die Sequenzierung erfolgte mit dem Ion 540 Kit-OT2 auf einem Ion 540 Chip und im Ion S5 *Sequencer* (jeweils ThermoFisher Scientific). Die bioinformatische Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit der Torrent Suite 5.16.1 Software (ThermoFisher

Scientific). Zur Interpretation der Varianten im Hinblick auf ihre Pathogenität wurde die online Datenbank ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) (Landrum et al., 2020) sowie zur Identifikation personalisierter Ansätze die online Datenbank OncoKB (<https://www.oncokb.org>) (Chakravarty et al., 2017) herangezogen.

Patienten mit NSCLC BM wurden für den Einschluss in das nNGM aufgeklärt, sodass ihr Gewebe mit einem Panel, welches für das nNGM entwickelt wurde und sich auf NSCLC typische *Hotspots* fokussiert, im NGS-Verfahren untersucht werden konnte. Um die korrespondierenden Zellmodelle vergleichend zu analysieren, wurden diese mit dem gleichen Panel sequenziert. Dieses untersuchte Gen-Panel nNGM v1 umfasst Mutationshotspots von 19 Genen (siehe Anhang: Gen-Panel nNGM v1).

Gewebe von Patienten mit BM anderer Entitäten und deren korrespondierende Zellmodelle wurden mit dem Cancer Hot Spot-Panel (Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2; ThermoFisher Scientific) untersucht. Das untersuchte Gen-Panel umfasst Mutationshotspots von 50 Genen (siehe Anhang: Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2).

2.3. Personalisierte Wirkstofftestung

Zur Etablierung einer gezielten personalisierten Wirkstofftestung wurden die Zellmodelle 24 h vor der Behandlung in einer 384-Well Zellkulturplatte (Corning, Wiesbaden, Deutschland) in biologischen Triplikaten zu je 2.000 Zellen pro Well ausgesät sowie vor und nach Behandlung bei 37 °C und 5% CO₂ in einer befeuchteten Atmosphäre kultiviert. Als Kontrollen dienten hierbei nach gleicher Systematik ausgesäte, nicht behandelte Zellen.

Auf Grundlage der nNGM-Panelsequenzierung wurden für die NSCLC BM Treibermutationen und dazu passende Wirkstoffe identifiziert. Dabei wurde je nach Signatur ein personalisierter Inhibitor wie Osimertinib, Selpercatinib oder Naporafenib mit drei konventionellen Zytostatika (Cisplatin, Pemetrexed und Paclitaxel) verglichen (Tabelle 4). Die aufgelisteten Wirkstoffe wurden von MedChemExpress (Monmouth Junction, USA) bezogen.

Wirkstoff	Wirkstoffgruppe
Osimertinib	EGFR-Inhibitor
Selpercatinib	RET-Inhibitor
Naporafenib	RAF-Inhibitor
Cisplatin	Platin-Komplex-Bildner

Pemetrexed	Antimetabolit
Paclitaxel	Taxan

Tabelle 4: Wirkstoffe und deren Gruppe, die für die personalisierte Wirkstofftestung verwendet wurden.

In der personalisierten Wirkstofftestung wurden auf Grundlage der Panel-Sequenzierung ausgewählte zielgerichtete Wirkstoffe gegen klassische, weitgehend unspezifische Zytostatika im Hinblick auf ihre Wirkung auf die Viabilität der NSCLC BM Zellmodelle verglichen.

Die auf dieser Grundlage zusammengestellte Wirkstoffauswahl wurde anschließend in Konzentrationen von 0,1; 1, 10 und 100 nM zur Behandlung der Zellmodelle eingesetzt. Nach 72 h Inkubation wurde der CellTiter-Glo Lumineszenz Assay (Promega, Fitchburg, USA) zur Erfassung der Zellviabilität durchgeführt. Diese Wirkstofftestung wurde für jedes Zellmodell einige Tage später reproduziert, sodass jedes Zellmodell mindestens zwei unabhängige Screens durchlief. Die statistische Auswertung der Zellviabilität erfolgte mithilfe von GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Boston, USA) durch Berechnung der mittleren effektiven Wirkkonzentration (EC_{50}).

2.4. Radiotherapie

Die Zellmodelle wurden mit einer unfraktionierten Bestrahlungsdosis von 30 Gy behandelt. Diese entspricht der Gesamtdosis, welche im Rahmen einer klinischen WBRT eingesetzt wird (Weller, 2015). Die Bestrahlung erfolgte mit dem Gulmay RS225 Röntgenstrahlengenerator (Gulmay Ltd., Byfleet, Vereinigtes Königreich) im Labor für Molekulare Radioonkologie der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Hierfür wurden die Zellmodelle 24 h vor Bestrahlung in einer 96-Well Zellkulturplatte (Greiner Bio-One International GmbH) in biologischen Triplikaten zu je 10.000 Zellen pro Well ausgesät sowie vor und nach Bestrahlung bei 37 °C und 5% CO₂ in einer befeuchteten Atmosphäre kultiviert. Als Kontrollen dienten hierbei nach gleicher Systematik ausgesäte, nicht bestrahlte Zellen.

24 und 48 h nach Bestrahlung wurde die Zellviabilität mit Hilfe des MTT-Assay bestimmt. Dieser wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zusammengefasst wurden 10 µl MTT-Reagenz zu 100 µl Zellsuspension gegeben und drei Stunden lang inkubiert. Anschließend wurden 110 µl MTT-Lysepuffer (90% Isopropanol, 10% Triton X-100) in jedes Well gegeben und die Platten 15 Minuten lang bei Raumtemperatur geschüttelt, bis keine MTT-Kristalle mehr sichtbar waren. Die Messung der Absorption erfolgte bei 550 und 750 nm (Hintergrundsubtraktion) mit einem Mikroplatten-Lesegerät (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA).

2.5. TFields Behandlung

Zur Behandlung der Zellmodelle mit einer klinisch relevanten Frequenz von 200 kHz (Vargas-Toscano et al., 2020) wurde diese im inovitro™ Laborsystem (Novocure GmbH, Root, Schweiz) in 35 mm Keramikplatten zu je 50.000 Zellen in 2 ml Suspension als biologische Duplikate ausgesät. Dabei wurden durch eine Keramik mit hoher Dielektrizitätskonstante isolierte Wandlerpaare zur Applikation von 1,7 V/cm im quadratischen Mittel verwendet. Als Kontrollen dienten nach gleicher Systematik in 35 mm Zellkulturplatten (Greiner Bio-One International GmbH) ausgesäte, nicht behandelte Zellen. Da der Effekt von TTF auf die Glioblastom-Zelllinie HSR-GBM1 (CVCL_D157; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Angelo Vescovi, Ph.D., Universität von Bicocca, Mailand, Italien) weitreichend untersucht ist (Vargas-Toscano et al., 2020), wurde diese als Positivkontrolle in alle Experimente eingeschlossen. Die Keramikplatten wurden bei 30 °C und die Kontrollplatten bei 37 °C bei je 5% CO₂ in einer befeuchteten Atmosphäre kultiviert. Nach 72 h Behandlung oder Inkubation wurde der MTT-Assay wie oben beschrieben durchgeführt, indem die Zellen in 96-Well Zellkulturplatten als 20 technische Replikate ausplattiert wurden.

2.6. Hochdurchsatzwirkstofftestung

Die Hochdurchsatzwirkstofftestung (engl.: *High-Troughput Screening*; HTS) wurde in der HTS-Core-Facility der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Zusammengefasst wurden 267 Wirkstoffe (siehe Anhang: Wirkstoffe der Hochdurchsatztherapietestung) mit dem D300(e) Digital Dispenser (Tecan, Crailsheim, Deutschland) in 6-8 Verdünnungsschritten (0-10 µM) randomisiert in weiße 1536-Well-Platten (Corning, Wiesbaden, Deutschland) verteilt. Die DMSO-Konzentration wurde dabei in jedem Well auf 0,25% normalisiert. Diese Platten wurden bei -80 °C gelagert und eine Stunde vor dem Screen des jeweiligen Zellmodells aufgetaut. Mit Hilfe des Multidrop Combi Reagent Dispenser (Thermo Scientific) wurden insgesamt 2-3 Millionen Zellen in 30 µl Kulturmedium pro Well ausgesät. Nach 72 h Inkubationszeit wurde ein CellTiter-Glo Assay zur Viabilitätsmessung durchgeführt, indem 30 µl/Well des Reagenzes mit dem Multidrop Combi Reagent Dispenser hinzugegeben und die Lumineszenzsignale mit einem Spark 10M Mikroplattenlesegerät (Tecan) gemessen wurden.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels nicht-linearer Regression (log(Inhibitor) versus normalisierte Reaktion) mit mittleren Lumineszenzsignalen aus DMSO-Wells (≥3) als 100%ige Zellviabilität erstellt. Die Inhibitorreaktion wurde relativ zur Kontrolle berechnet

(GraphPad Prism 5). Alle Daten sind, sofern nicht anders angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung (engl.: *standard deviation*; SD) angegeben. Vergleiche zwischen verschiedenen Gruppen wurden mit Hilfe des *Student's t-Tests* oder der Varianzanalyse durchgeführt. Die statistische Signifikanz zwischen verschiedenen Dosis-Wirkungskurven wurde im Hinblick auf die angepassten Mittelwerte ($\log IC_{50}$) mit Hilfe des F-Tests der Quadratsumme bewertet. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen. Die *Heatmaps* wurden mit dem Morpheus-Online-Tool erstellt (Marquardt et al., 2023).

3. Ergebnisse

3.1. Validierte Zellmodelle

Zwischen Januar 2021 und Dezember 2022 wurden Gewebeproben von insgesamt 55 Patienten in die Studie eingeschlossen. Auf Grundlage der histopathologisch bestätigten Diagnose einer BM ging das Gewebe von 36 Patienten in die weiteren Untersuchungen ein. Von diesen konnten in 26 Fällen vitale 3D-Zellkulturmodelle etabliert werden (Abbildung 4). Damit betrug die finale Erfolgsrate der Etablierung eines Zellmodells 72,2%. Gründe für einen Misserfolg waren unter anderen eine Kontamination mit Mikroorganismen oder eine ausbleibende Formierung von Tumorsphäroiden.

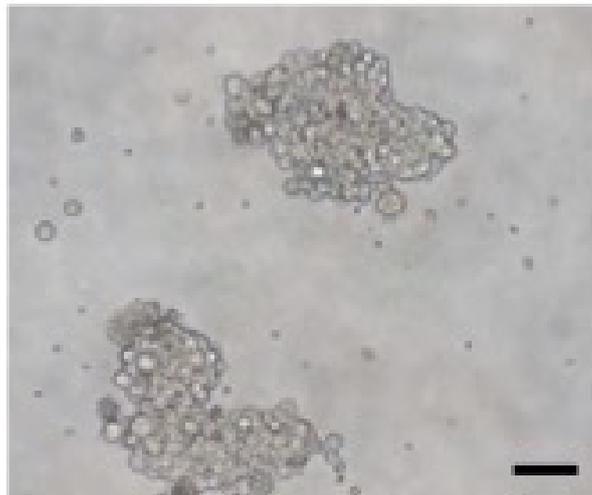


Abb. 4: Repräsentatives Foto einer etablierten Sphäroidkultur.

Das etablierte Modell ist frei von Mikroorganismen, Fibroblasten und Erythrozyten. Die Tumorzellen formen in Suspension Sphäroide zwischen 100-800 μm Diameter (Maßstabsbalken 100 μm).

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 63,3 Jahre und das biologische Geschlechterverhältnis war zu 48,5% weiblich. Von den in Tabelle 5 aufgelisteten Patienten waren zum Zeitpunkt der Auswertung (Januar 2025) vier von sieben Patienten *lost to follow up*, ein Patient 65 Tage postoperativ verstorben (Primärtumor: Melanom), ein Patient nach 25 Monaten verstorben (Primärtumor: NSCLC) und ein Patient befindet sich in weiteren regelmäßigen klinischen Verlaufskontrollen 25 Monate postoperativ (Primärtumor: Magen-Karzinom).

In dieser Studie war NSCLC die häufigste Diagnose unter den Primärtumoren (53%) danach folgten Melanom (11%), Ösophaguskarzinom (11%), SCLC (8%), das Mammakarzinom (8%) sowie Blasen- (6%) und Magenkarzinom (3%) (Abbildung 5).

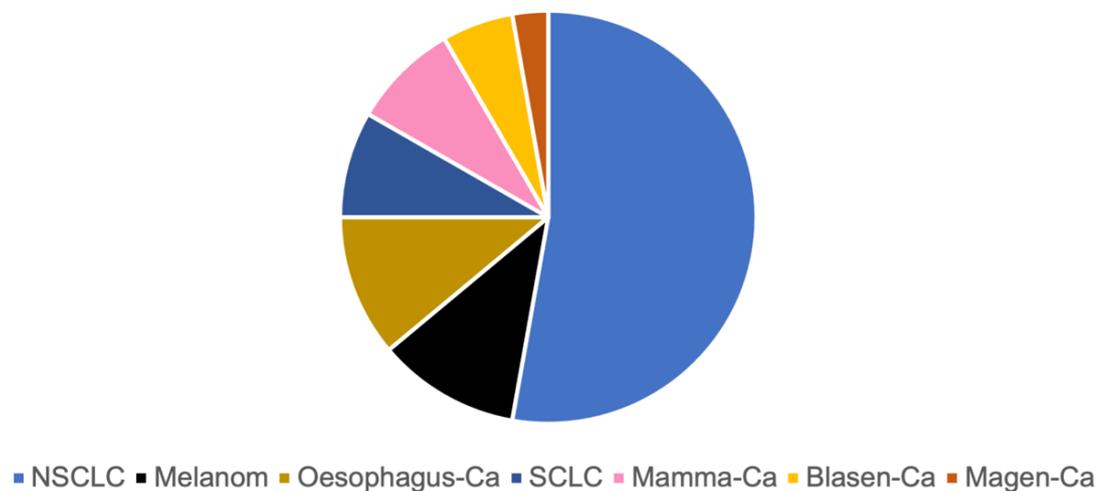


Abb. 5: Verteilung der Primärtumoren der BM in dieser Studie.

In diesem Kreisdiagramm sind die relativen Anteile der Primärtumorentitäten in dieser Studie dargestellt. Von den insgesamt 36 Patienten waren 19 an einem NSCLC, 4 an einem Melanom, 4 an einem Ösophaguskarzinom, 3 an einem SCLC, 3 an einem Mammakarzinom, 2 an einem Blasenkarzinom und einer an einem Magenkarzinom erkrankt.

Alle der 19 NSCLC Metastasen wurden im Rahmen des nNGM-Programms auf Treibermutationen untersucht. Die Therapieempfehlungen des nNGM sind in Tabelle 5 aufgelistet. Um die zugehörigen Zellmodelle genetisch zu validieren, wurde in sieben Fällen mit unterschiedlichen Primärtumoren, davon vier NSCLC, eine NGS durchgeführt. Hierbei zeigten sich jeweils übereinstimmende Treibermutationen in den Geweben der BM und den zugehörigen Zellmodellen (siehe Tabelle 5).

Die Sequenzierung der Zellmodelle erfolgte mit DNA, welche am Tag der weiteren Therapieeffekttestung (TTFields, Bestrahlung, personalisierte Wirkstofftestung oder Hochdurchsatzwirkstofftestung) extrahiert wurde; somit je nach unterschiedlich langer

Kulturdauer. Dies ist zum einen in der Proliferationsaktivität des jeweiligen Zellmodells begründet, da ausreichend viele Zellen für die Versuche verwendet werden müssen, und zum anderen in der Logistik, die hinter der Verfügbarkeit der anschließenden Therapieeffekttestungen steht. Insgesamt zeigte sich ein die Tumorentität sowie die entsprechende Treibermutation übergreifender Trend zur Zunahme der Allelfrequenz der Treibermutation(-en) in den Zellmodellen gegenüber den Geweben der BM über den Zeitverlauf (Abbildung 6).

Patienten-ID	Mutation	Gewebe	Tag 4	Tag 7	Tag 8	Tag 12	Tag 86
BM24	KRAS	29,45					99,69
	TP53	44,44					99,70
BM32	KRAS	36,82		39,93			
	STK11	58,76		72,37			
BM52	STK11	55,32				90,53	
	TP53	69,75				92,54	
BM55	KIT	29,50			31,71		
	JAK3	50,13			51,03		
BM56	ATM	40,76		44,26			
BM59	KRAS	50,90	62,80				
	FGFR3	49,05	52,63				
BM60	JAK3	31,63		47,54			

Abb. 6: Darstellung der mutierten Allelfrequenzen nach Zellmodell und Mutation im Zeitverlauf.

Die mutierte Allelfrequenz, also der Anteil der Sequenzierreads, die in der jeweiligen Probe die Mutation aufwiesen, ist hier pro Zellmodell und identifizierter Mutation im Zeitverlauf aufgetragen. Das ursprüngliche Gewebe wurde am OP-Tag asserviert, die Zellmodelle zunächst kultiviert und dann nach unterschiedlicher Kulturdauer (Tag 4-86) mittels NGS sequenziert. Der Zahlenwert der Allelfrequenz ist jeweils in Prozent angegeben.

Patienten-ID	Primärtumor	PD-L1 / HER2 Status	Mutationen im Gewebe	Mutationen im Zellmodell	Kulturdauer (d)	Pathogenität	Zielgerichtete Wirkstoffe
BM24	NSCLC	PD-L1 positiv (TPS 100%)	KRAS:NM_033360.4:exon3:c.183A>T;p.Gln61His (AF=29.45%)	KRAS:NM_033360.4:exon3:c.183A>T;p.Gln61His (AF=99.69%)	86	Onkogene <i>gain-of-function</i> Mutation	<ul style="list-style-type: none"> Naporafenib Trametinib Cobimetinib Binimetinib
			TP53:NM_000546.5:exon7:c.731G>A;p.Gly244Asp (AF=44.44%)	TP53:NM_000546.5:exon7:c.731G>A;p.Gly244Asp (AF=99.70%)		Wahrscheinlich onkogene <i>loss-of-function</i> Mutation	-
BM32	NSCLC	PD-L1 negativ (TPS 0%)	KRAS:NM_033360.4:exon2:c.35G>A;p.Gly12Asp (AF=36.82%)	KRAS:NM_033360.4:exon2:c.35G>A;p.Gly12Asp (AF=39.93%)	7	Onkogene <i>gain-of-function</i> Mutation	<ul style="list-style-type: none"> Naporafenib MRTX-1133 ASP3082 RMC-6236 Trametinib Cobimetinib Binimetinib
			STK11:NM_000455.5:exon7:c.891G>C;p.Arg297Ser (AF=58.76%)	STK11:NM_000455.5:exon7:c.891G>C;p.Arg297Ser (AF=72.37%)		Onkogene Mutation	<ul style="list-style-type: none"> Pembrolizumab + Bemcentinib
BM52	NSCLC	PD-L1 positiv (TPS 50%)	STK11:NM_000455.5:exon1:c.289_290+2delAAGT;p (AF=55.32%)	STK11:NM_000455.5:exon1:c.289_290+2delAAGT;p (AF=90.53%)	12	Wahrscheinlich onkogene Mutation	<ul style="list-style-type: none"> Pembrolizumab + Bemcentinib

			TP53:NM_000546.5:exon7:c.734G>T:p.Gly245Val (AF=69.75%)	TP53:NM_000546.5:exon7:c.734G>T:p.Gly245Val (AF=92.54%)		Wahrscheinlich onkogene <i>loss-of-function</i> Mutation	-
BM55	Amelanotisches malignes Melanom	PD-L1 positiv (TPS 10%)	KIT:NM_000222.3:exon17:c.2447A>T:p.Asp816Val (AF=29.50%)	KIT:NM_000222.3:exon17:c.2447A>T:p.Asp816Val (AF=31.71%)	8	Onkogene <i>gain-of-function</i> Mutation	<ul style="list-style-type: none"> • Sunitinib • Imatinib • Regorafenib • Ripretinib • Sorafenib • Nilotinib
			JAK3:NM_000215.4:exon16:c.2164G>A:p.Val722Ile (AF=50.13%)	JAK3:NM_000215.4:exon16:c.2164G>A:p.Val722Ile (AF=51.03%)		Unbekannt	-
BM56	tubulo-papilläres Adeno-Karzinom des Magens	PD-L1 negativ (TPS 0%)	ATM:NM_000051.3:exon17:c.2572T>C:p.Phe858Leu (AF=40.76%)	ATM:NM_000051.3:exon17:c.2572T>C:p.Phe858Leu (AF=44.26%)	7	Wahrscheinlich neutral	-
BM59	NSCLC	PD-L1 positiv (TPS 100%)	KRAS:NM_033360.4:exon2:c.34G>T:p.Gly12Cys (AF=50.90%)	KRAS:NM_033360.4:exon2:c.34G>T:p.Gly12Cys (AF=62.83%)	4	Onkogene <i>gain-of-function</i> Mutation	<ul style="list-style-type: none"> • Sotorasib • Adagrasib • Trametinib • Cobimetinib • Binimetinib
			FGFR3:NM_000142.4:exon10:c.1345C>T:p.Pro449Ser (AF=49.05%)	FGFR3:NM_000142.4:exon10:c.1345C>T:p.Pro449Ser (AF=52.63%)		Wahrscheinlich benigne	• Erdafitinib
BM60	Ösophagus-Karzinom	HER2-positiv (Score 2+; SISH positiv)	JAK3:NM_000215.4:exon16:c.2152G>C:p.Val718Leu (AF= 31.63%)	JAK3:NM_000215.4:exon16:c.2152G>C:p.Val718Leu (AF=47.53%)	7	Unbekannt	<ul style="list-style-type: none"> • Trastuzumab • Deruxtecan • Neratinib • Lapatinib

Tabelle 5: Übersicht über die mittels NGS analysierten BM Zellmodelle. Die BM Zellmodelle wurden mittels NGS auf Treibermutationen analysiert. Im Vergleich des Metastasengewebes mit dem korrespondierenden Zellmodell konnte die Übereinstimmung der Treibermutationen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die mutierte Allelfrequenz (AF) ermittelt. Die Treibermutationen wurden zudem im Hinblick auf ihre Pathogenität beurteilt und neben dem prädiktiven Rezeptorstatus herangezogen, um auf sie zielgerichtete Wirkstoffe zu identifizieren.

TPS: *Tumor Proportion Score* (engl. für den Anteil der PD-L1 immunhistochemisch positiv gefärbter Tumorzellen bezogen auf die Gesamtzahl der Tumorzellen), SISH: Silber *in situ* Hybridisierung.

3.2. Personalisierte Wirkstofftestung

Für die initiale gezielte personalisierte Wirkstofftestung standen die in Tabelle 4 aufgelisteten Wirkstoffe zur Verfügung. Diese wurden auf Grundlage der nNGM Befunde zusammengestellt und sind hier noch einmal den in diesem Versuch verwendeten Zellmodellen und ihren Treibermutationen zugeordnet (Tabelle 6).

Patienten-ID	Primärtumor	Treibermutation	Wirkstoff
BM24	NSCLC	KRAS	Naporafenib
BM27	NSCLC	EGFR	Osimertinib
BM31	NSCLC	RET	Selpercatinib
BM33	Mammakarzinom	-	-

Tabelle 6: Für die gezielte personalisierte Wirkstofftestung verwendete Zellmodelle.

Für die gezielten Wirkstofftestungen wurden diese sechs Zellmodelle verwendet. Dabei handelte es sich aufgrund der logistischen Verfügbarkeit von NGS-Befunden des Gewebes durch das nNGM überwiegend um NSCLC-BM. Den Treibermutationen sind im Rahmen der nNGM-Befundung zugehörige personalisierte Wirkstoffe zugeordnet worden.

Für den Fall BM24 ergab sich aufgrund einer *KRAS*-Mutation eine personalisierte Therapieoption mittels Naporafenib (LXH-254); einem oral verfügbaren Raf-Inhibitor. Die onkogene *gain-of-function* Mutation des *KRAS*-Gens lag im Zellmodell mit einer Allelfrequenz von 99,69% vor (Tabelle 5). In der Wirkstofftestung zeigte sich für Naporafenib eine Reduktion des Zellüberlebens mit einer mittleren effektiven Wirkstoffkonzentration (engl. *median effective concentration*; EC₅₀) von 15,33 µM. Für Cisplatin konnte aufgrund eines ausbleibenden Effektes auf das Zellüberlebens keine

EC_{50} errechnet werden, während sie für Paclitaxel bei 408,9 μM und für Pemetrexed bei 898 μM lag (Abbildung 7).

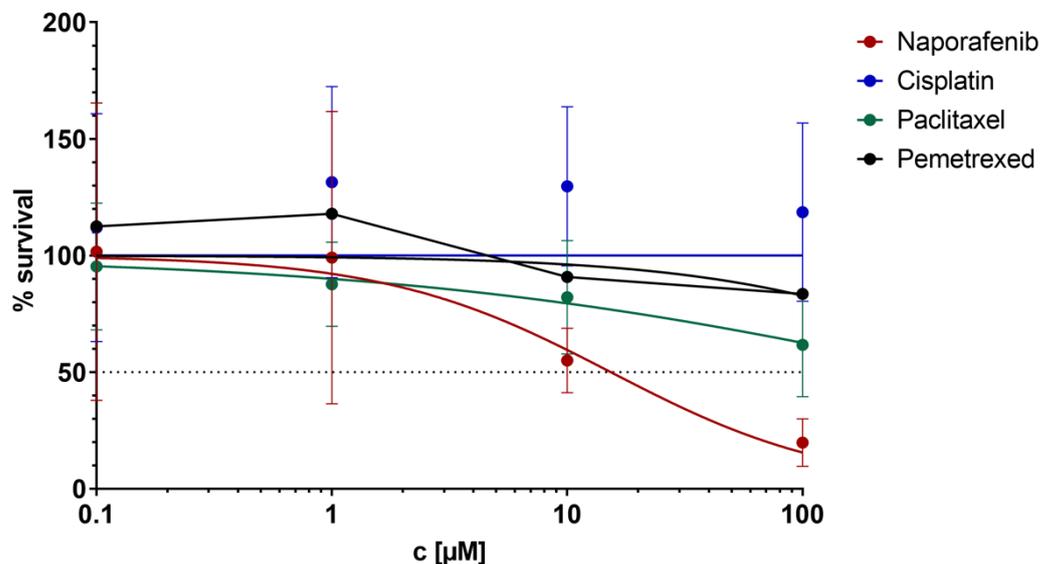


Abb. 7: Dosis-Wirkungskurven der personalisierten Wirkstofftestung von BM24.

In der personalisierten Wirkstofftestung der NSCLC-Metastase BM24 zeigte sich im untersuchten Dosisbereich ein stärkerer Effekt auf die Reduktion des Zellüberlebens durch den zielgerichteten Wirkstoff Naporafenib im Vergleich zu den konventionellen Zytostatika Paclitaxel und Pemetrexed.

Für die NSCLC BM27 ergab sich aufgrund einer *EGFR*-Mutation eine Therapieoption mittels Osimertinib; einem oral verfügbaren *EGFR*-Inhibitor der dritten Generation, der für die Erstlinientherapie von *EGFR*-mutierten NSCLC zugelassen ist. Im entnommenen Tumorgewebe zeigte sich eine *EGFR* T790M Mutation (AF: 67,27%), eine L858R Mutation (AF: 65,05%) sowie eine p.V157_R158 Deletion (AF: 47,45%). Für das konventionelle Zytostatikum Cisplatin ergab sich näherungsweise eine EC_{50} von 192,5 μM , während diese für Osimertinib bei 98,76 μM lag (Abbildung 8).

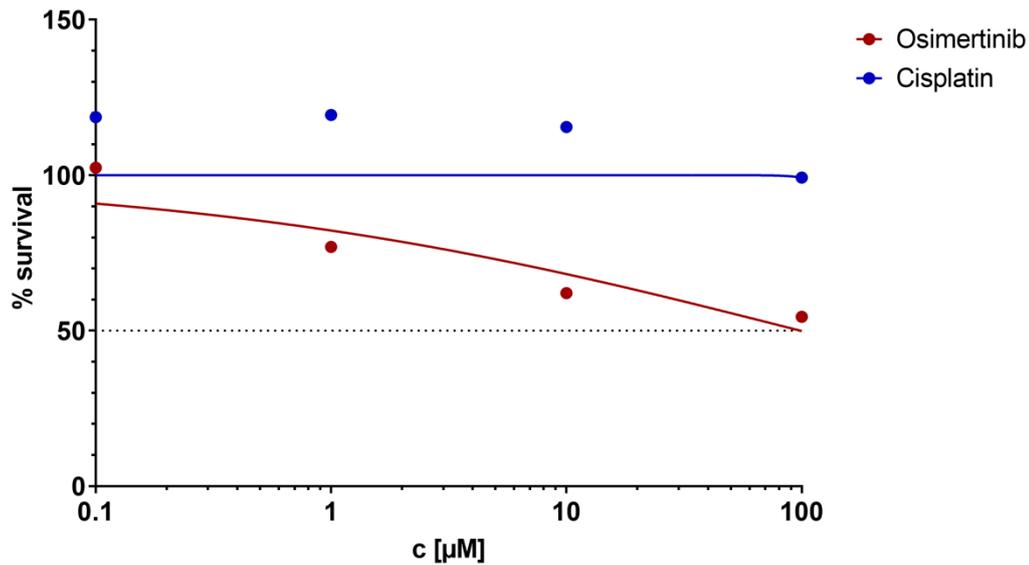


Abb. 8: Dosis-Wirkungskurven der personalisierten Wirkstofftestung von BM27.

In der personalisierten Wirkstofftestung der NSCLC-Metastase BM27 zeigte sich im untersuchten Dosisbereich ein stärkerer Effekt auf die Reduktion des Zellüberlebens durch den zielgerichteten Wirkstoff Osimertinib im Vergleich zu dem konventionellen Zytostatikum Cisplatin.

Für die NSCLC-Metastase BM31 ergab sich aufgrund einer *CCDC6-RET*-Fusion eine Therapieoption mittels Selpercatinib; einem neuen, spezifischen RET-Thyrosinkinase-Inhibitor der ersten Generation. In der personalisierten Wirkstofftestung zeigte sich auch hier eine geringere EC_{50} des zielgerichteten Wirkstoffes im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie, die jedoch außerhalb des untersuchten Dosisbereiches liegt (EC_{50} Selpercatinib: 333,4 µM; EC_{50} Paclitaxel: 768,9 µM; EC_{50} nicht errechenbar für Cisplatin und Pemetrexed) (Abbildung 9).

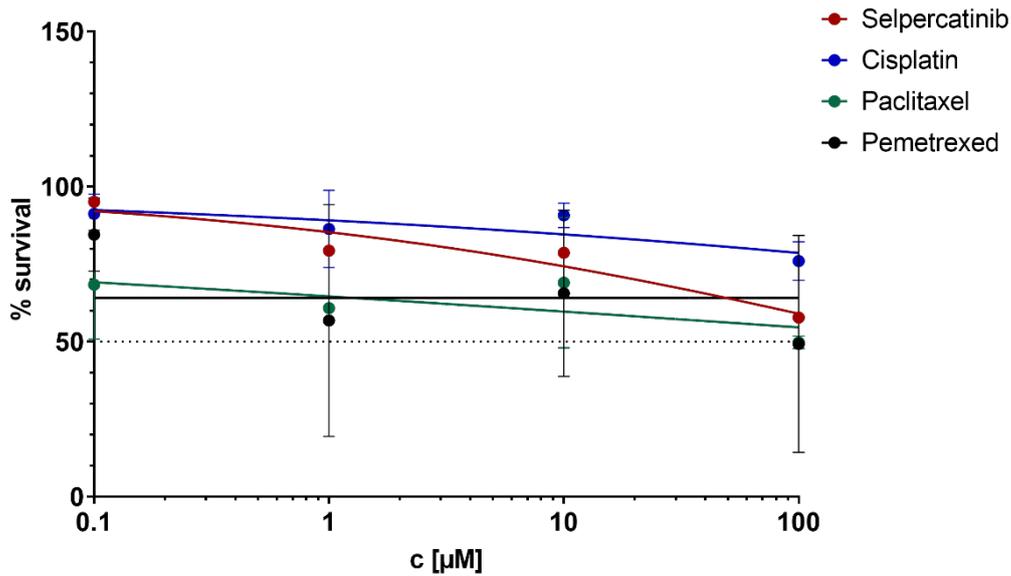


Abb. 9: Dosis-Wirkungskurven der personalisierten Wirkstofftestung von BM31.

In der personalisierten Wirkstofftestung der NSCLC BM31 zeigte sich im untersuchten Dosisbereich kein stärkerer Effekt auf die Reduktion des Zellüberlebens durch den zielgerichteten Wirkstoff Selpercatinib im Vergleich zu den konventionellen Zytostatika. Die errechnete EC_{50} für Selpercatinib ist jedoch geringer als die der konventionellen Chemotherapie.

Für die TNBC BM33 wurde keine Gensequenzierung durchgeführt, weshalb lediglich der Effekt der konventionellen Zytostatika auf das Zellmodell untersucht wurde (EC_{50} Paclitaxel 45,9 μM ; EC_{50} Cisplatin 119,8 μM ; EC_{50} Pemetrexed: 2160 μM). Hierbei zeigte sich unter Paclitaxel eine stärker ausgeprägte Reduktion des Zellüberlebens im Vergleich zu Cisplatin oder Pemetrexed (Abbildung 10).

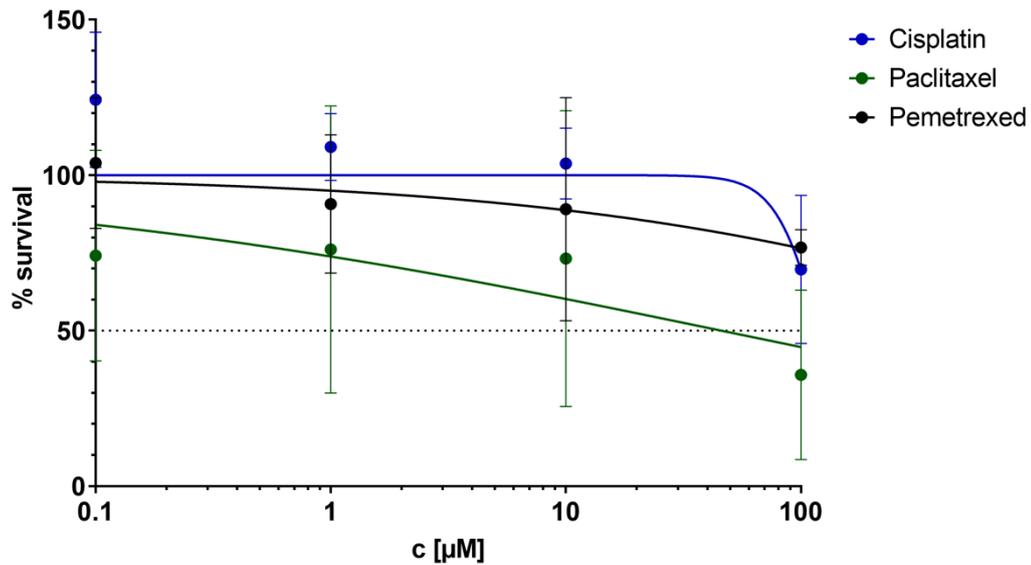


Abb. 10: Dosis-Wirkungskurven der Wirkstofftestung von BM33.

In der Wirkstofftestung der TNBC Metastase BM33 zeigte sich im untersuchten Dosisbereich ein stärkeres Ansprechen von Paclitaxel im Vergleich zu Cisplatin und Pemetrexed.

3.3. Radiotherapie

Die Glioblastom-Zelllinie GBM1 wurde als Positivkontrolle in die *in vitro* Bestrahlungen eingeschlossen, um das Zellüberleben 24 und 48 h nach Exposition gegenüber einer Einzeldosis von 30 Gy Gammastrahlung referenzieren zu können. Hierbei zeigte sich zunächst eine Reduktion des Zellüberlebens am ersten Messpunkt, während dieses nach 48 h das Ausgangsniveau wieder überstieg (Zellüberleben 24 h vs. 48 h nach 30 Gy; $p=0,0006$) (Abbildung 11). Dieser *Rebound* des Zellüberlebens zeigte sich auch in statistisch signifikantem Ausmaß für die RET-alterierte NSCLC BM31 (Zellüberleben 24 h vs. 48 h nach 30 Gy; $p=0,0024$) (Abbildung 11). Dahingegen konnte die Radiatio das Zellüberleben der KRAS-mutierten NSCLC BM24 sowie der TNBC BM33 über den Zeitverlauf reduzieren; jedoch ohne statistische Signifikanz (Abbildung 11).

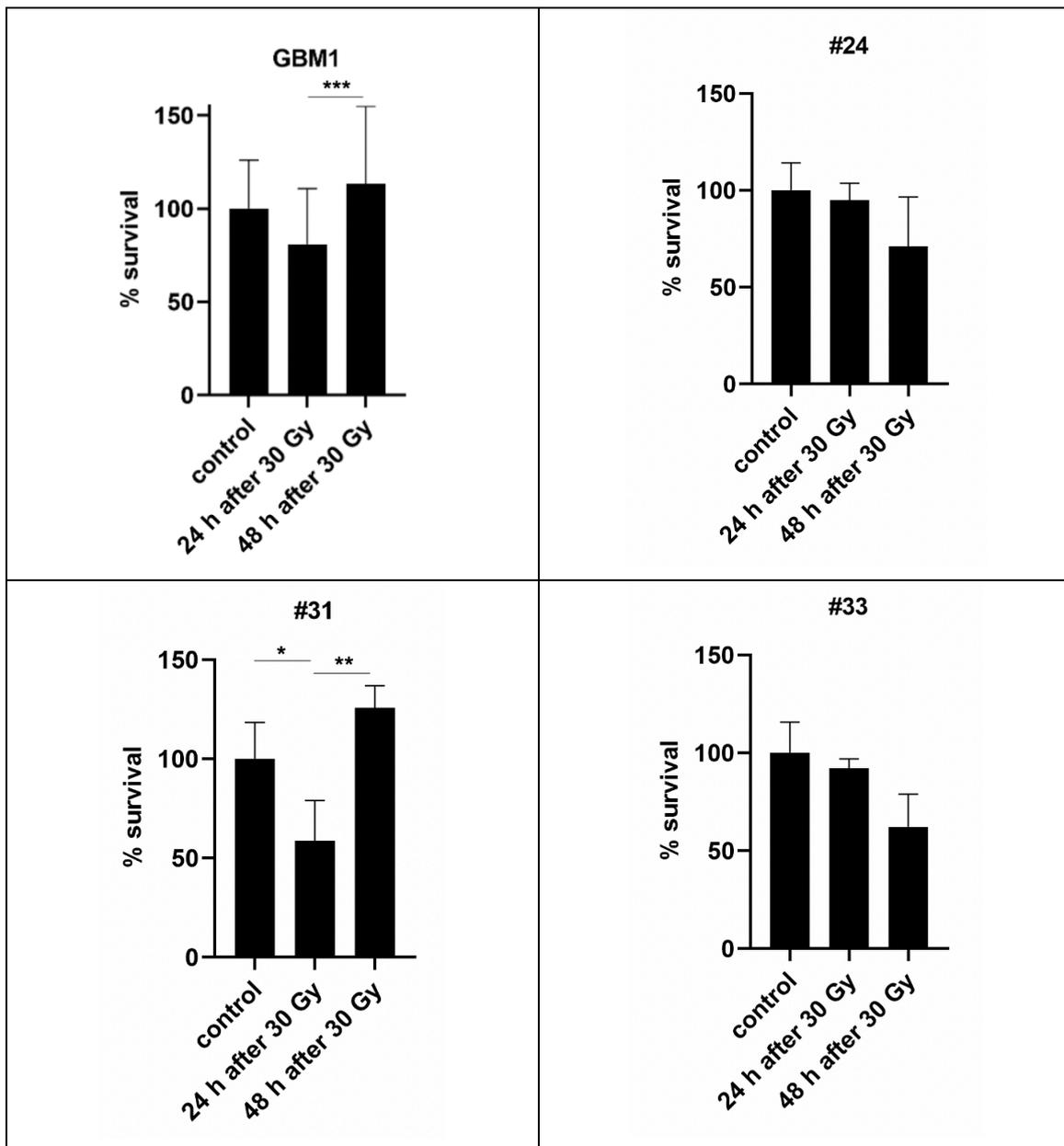
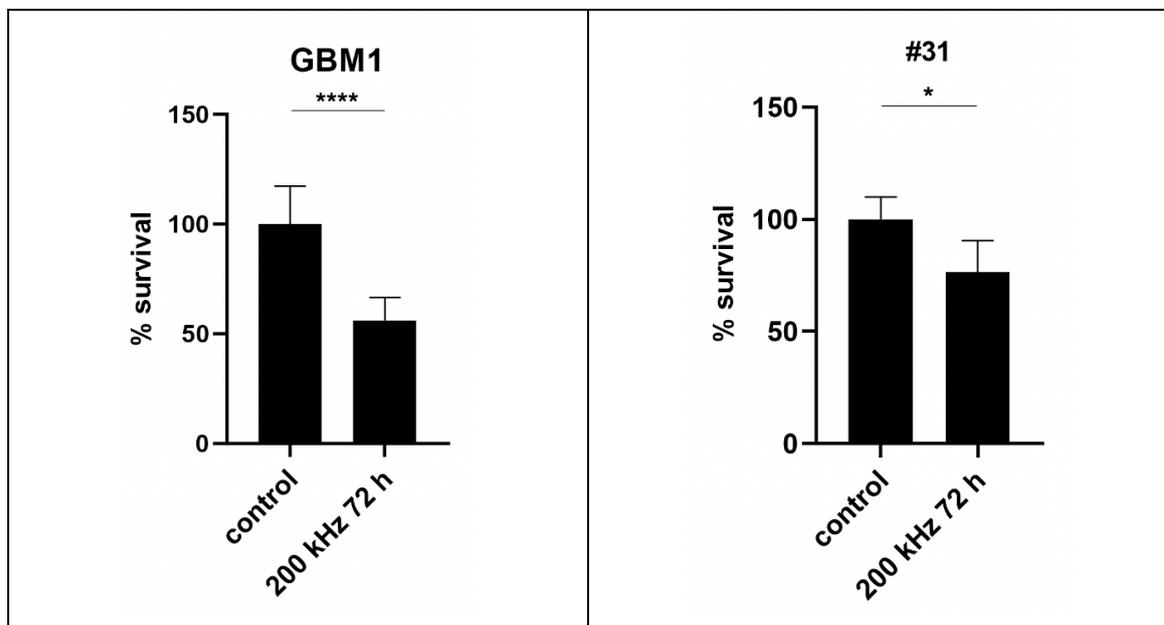


Abb. 11: Zellüberleben der Zellmodelle nach Einzeitbestrahlung.

Die Zellmodelle GBM1, BM24, BM31 und BM33 wurden einer Einzeitbestrahlung mit 30 Gy Gammastrahlung unterzogen. Anschließend wurde das Zellüberleben 24 h und 48 h nach Abschluss der Behandlung quantifiziert. Für GBM1 und BM31 zeigte sich eine initiale Reduktion des Zellüberlebens gegenüber der unbehandelten Kontrolle, während die Zellviabilität am zweiten Messpunkt den Ausgangswert bereits wieder überstieg. Für BM24 und BM33 zeigte sich hingegen eine (nicht signifikante) Reduktion der Viabilität über den Zeitverlauf.

3.4. TFields Behandlung

Die Viabilität der Glioblastom-Zelllinie GBM1, der NSCLC Kulturen BM31 und BM32 sowie der TNBC Kultur BM33 wurde nach 72 h unter TFields Behandlung (200 kHz) quantifiziert. Hierbei konnte eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens der Glioblastomzelllinie unter TFields-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle reproduziert werden (GBM1: $p < 0,0001$). Auch für die BM Kulturen zeigte sich unabhängig von der Entität des Primärtumors eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens nach 72 h TFields Behandlung verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (BM31: $p = 0,0132$; BM32: $p = 0,0524$; BM33: $p < 0,0001$). Insbesondere die TNBC Kultur BM33 zeigte eine hochsignifikante Reduktion des Zellüberlebens auf unter die Hälfte des Kontrollreferenzwertes (Abbildung 12).



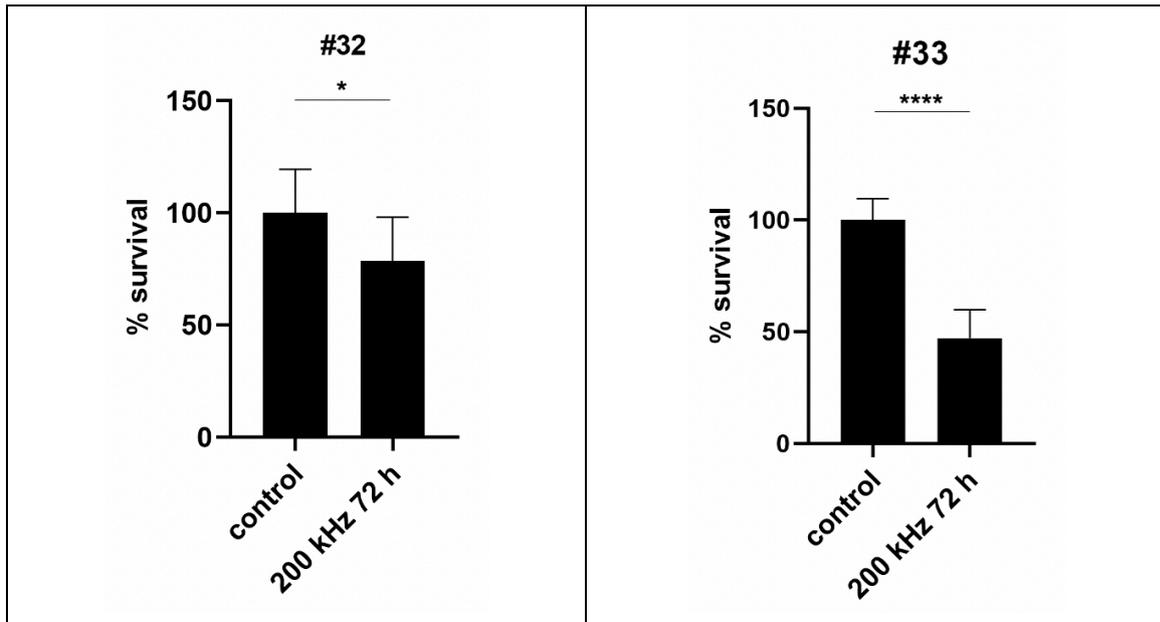


Abb. 12: Zellüberleben der untersuchten Zellmodelle nach TTFIELDS-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

Die Zellmodelle GBM1, BM31, BM32 und BM33 wurden über 72 h mit 200 kHz TTFIELDS behandelt. In allen Zellmodellen zeigt sich darunter eine signifikante Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Kontrollzellen.

3.5. Hochdurchsatzwirkstofftestung

Zwischen September und Dezember 2022 wurden sechs molekularpathologisch mittels NGS validierte Zellmodelle im HTS hinsichtlich des Ansprechens auf 267 verschiedene Wirkstoffe untersucht. Die durchschnittliche Kulturdauer betrug 11,6 Tage (Spannbreite 4-27 Tage) vom OP-Tag bis zum HTS. Zur internen Qualitätskontrolle wurden zehn bis 16 DMSO-Kontrollen jeder Platte verwendet, um den Variationskoeffizienten (engl.: *coefficient of variation*; CV) zu berechnen. Mit diesem können Schwankungen bei der Lumineszenzmessung und Fehler in der Ausplattierung der Zellen bewertet werden (Abbildung 13A). Als Positivkontrolle wurden auf jeder Platte Panobinostat und Staurosporin eingesetzt, die ein breites zytotoxisches Wirkungsprofil auf verschiedene Arten von Krebszellen haben. Anhand des Determinationskoeffizienten (R^2) wurde die Anpassungsgüte der Dosis-Wirkungsbeziehung für diese beiden Wirkstoffe beurteilt (Abbildung 13B). Auf Grundlage der Grenzwerte für die Qualitätskontrollen ($CV < 15\%$, $R^2 > 0,8$) zeigte sich, dass fünf von sechs Screens unterschiedlicher BM-Zellmodelle die Qualitätsstandards erfüllten.

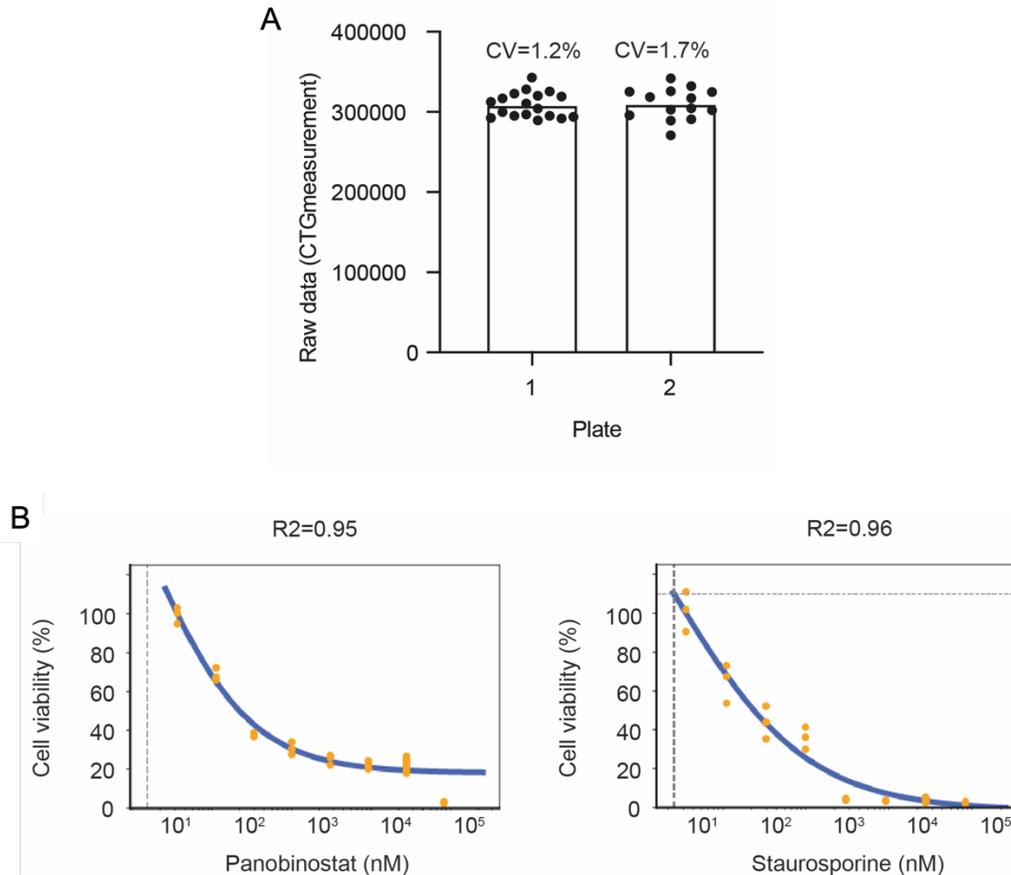


Abb. 13: Qualitätskontrollen in der Hochdurchsatzwirkstofftestung.

A) Zur Qualitätskontrolle enthält jede Platte mehrere DMSO-Kontrollen. Dieses Diagramm wurde unter Verwendung der mit dem CellTiterGlo-Assay (CTG, Promega) gemessenen Rohdaten (engl.: *raw data*) zur Zellviabilität (engl.: *cell viability*) erstellt. Der mittlere Zellviabilitätswert der DMSO-behandelten Zellkontrollen auf jeder Platte muss ähnlich sein und der Variationskoeffizient (CV) muss unter 15% liegen. B) Als Positivkontrollen wurden Panobinostat und Staurosporin mit einer typisch sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve verwendet. R² muss größer als 0,8 sein, um die Qualitätskontrolle der Anpassungsgüte zu passieren. Abgebildet sind beispielhaft die Qualitätskontrollen im HTS für die Primärkultur BM60.

Die Ergebnisse des HTS können vor dem Hintergrund weitergehender diagnostischer Befunde im Rahmen eines pharmakogenomischen Ansatzes aufgearbeitet werden. Exemplarisch werden hier die diagnostischen Befunde des Patienten mit dem zugehörigen HTS BM60 integriert:

Im HTS wurde das Ansprechen der Primärkultur BM60 auf 267 Wirkstoffe untersucht, von denen nahezu 80% bereits von der FDA zugelassen sind und sich ein weiterer Anteil in der Spätphase klinischer Testungen befindet (Abbildung 14A). Insgesamt passierten 130

Wirkstoffe die Qualitätskontrolle der Anpassungsgüte mit einem $R^2 > 0,8$. Für die Effektivität eines Wirkstoffes wurde die Fläche unter der Kurve (engl.: *area under the curve*; AUC) mit einem Grenzwert von maximal 0,75 definiert (Fallahi-Sichani et al., 2013). Auf Grundlage dieser Kriterien erzielten 60 der 130 Wirkstoffe die erwünschte Effektivität. Darunter befanden sich auch für die konventionelle Therapie des Ösophaguskarzinoms zugelassene Zytostatika (Abbildung 14B).

Zur Modellierung möglicher zytotoxischer Nebenwirkungen wurden humane Fibroblasten (engl.: *human fibroblasts*; HFB) sowie periphere Blutzellen (engl.: *peripheral blood cells*; PBC) bezüglich ihres Ansprechens auf die Wirkstoffe im HTS untersucht und daraus der Z'-Faktor errechnet (Zhang et al., 1999). $Z' < -2$ zeigt an, dass ein zytotoxischer Effekt für BM60 nachweisbar war und nicht für die Kontrollen (hier in einer *Heatmap* visualisiert: Abbildung 14C). Unter Berücksichtigung der definierten Kriterien ($R^2 > 0,8$; $AUC < 0,75$; $Z' < -2$) zeigten 29 Wirkstoffe Hinweise für selektive Effektivität auf die Viabilität von BM60 Zellen.

Bereits in einer früheren BM des Patienten konnte immunohistochemisch ein positiver Rezeptorstatus für HER2 nachgewiesen werden, der auch in der zu BM60 zugehörigen Rezidiv-BM erhalten geblieben war (Abbildung 14D). Die NGS-basierte Analyse zeigte eine *JAK3*-Mutation mit einer Allelfrequenz von 47,53% im Zellmodell und unbekannter Pathogenität (Tabelle 5). Etwa ein Viertel der im HTS identifizierten Medikamente wirken auf von HER2-vermittelte Signalwege, wie bspw. Inhibitoren des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalwegs und des PIK3-Signalwegs. Unter den sechs identifizierten TKIs befand sich auch der neue orale pan-HER2-Inhibitor Neratinib. Darüber hinaus sind insgesamt fünf der 29 Medikamente (13,8%) JAK-Inhibitoren (Abbildung 14E).

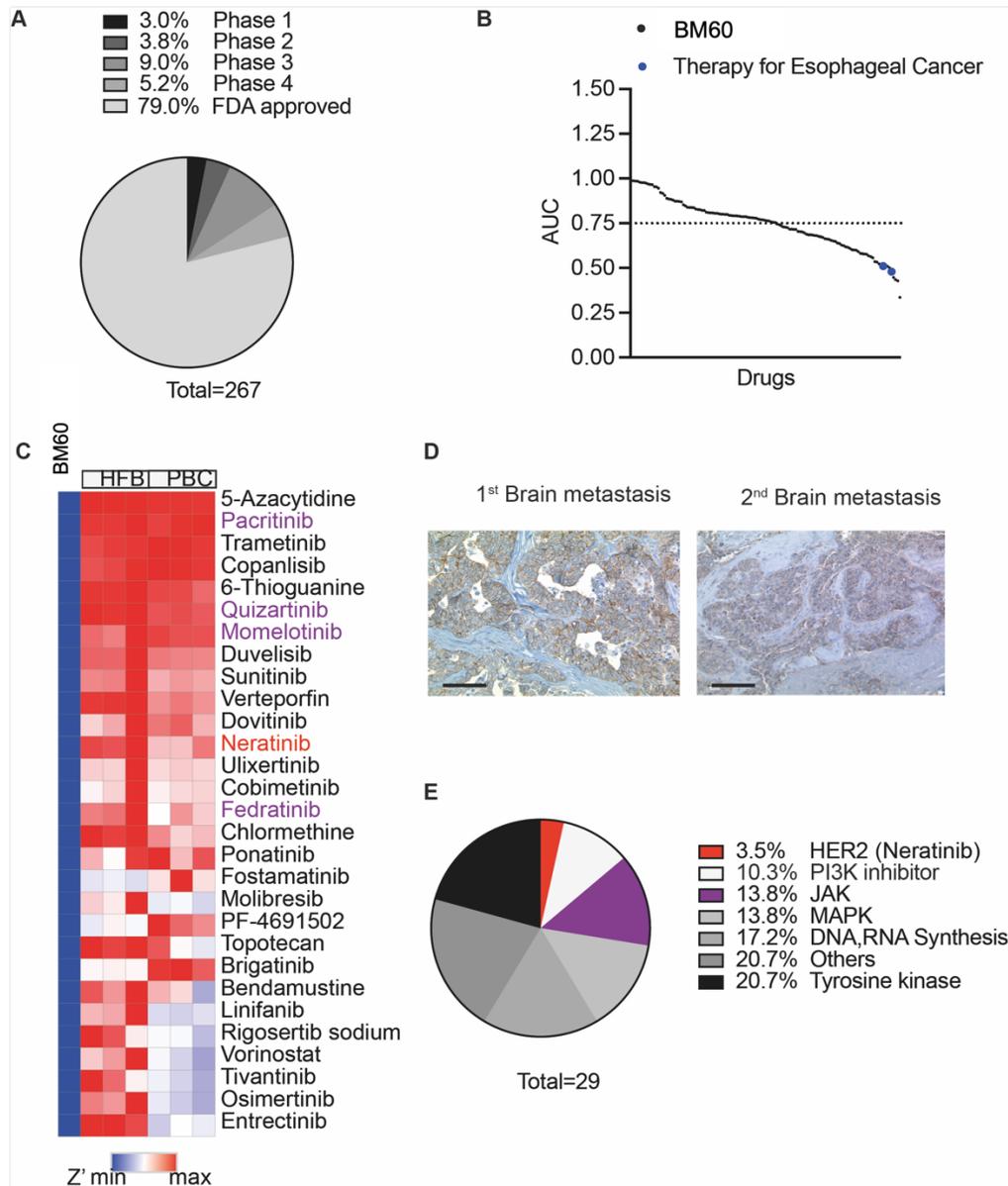


Abb. 14: Integration des molekularen Profils und der HTS-Ergebnisse zur Identifikation potenzieller therapeutischer Optionen in der BM-Primärkultur BM60.

A) Status der klinischen Testung oder Zulassung, in der sich die 267 untersuchten Wirkstoffe befinden. B) AUC für 130 Wirkstoffe mit $R^2 > 0,8$. Die Wirkstoffe wurden nach ihrem AUC-Wert sortiert. Die blauen Punkte repräsentieren Standard-Chemotherapeutika, die zur Behandlung von Ösophagus-Karzinomen eingesetzt werden. C) Heatmap des Z'-Faktors. Es werden Medikamente mit $Z' < -2$ dargestellt zur Modellierung eines selektiv anti-neoplastischen Effektes. D) Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung der HER2-Expression in den beiden metachronen BM des Patienten (*2nd brain metastasis* entsprach dem Ursprungsgewebe für BM60). HER2-positive Zellen zeigten eine membranständige, braune Färbung. Links: Immunhistochemische Färbung der ersten Hirnmetastase mit intensiver, vollständiger Färbung (HER-Score 3+, Maßstabsbalken: 100 μ m); rechts: Immunhistochemische Färbung der

rezidierten Hirnmetastase mit mäßiger Färbung (Score 2+, Maßstabsbalken: 100 μm). E) Verteilung potenzieller Arzneimittel auf verschiedene Ziel-Signalwege (aus Jeising et al., 2024). Das Anthracyclin Doxorubicin, ebenso wie das Stereoisomer Epirubicin, können in der konventionellen Chemotherapie des Ösophaguskarzinoms eingesetzt werden (Al-Batran et al., 2019) und zeigten bei BM60 eine erwartungsgemäß hohe Effektivität (AUC Epirubicin: 0,51; AUC Doxorubicin: 0,48). Die durch den Z'-Faktor modellierte Toxizität errechnet sich aus der Wirkung auf HFB und PBC und zeigte für diese Medikamente eine starke Wirkung auf die nicht-neoplastische Kontrollen (Abbildung 15).

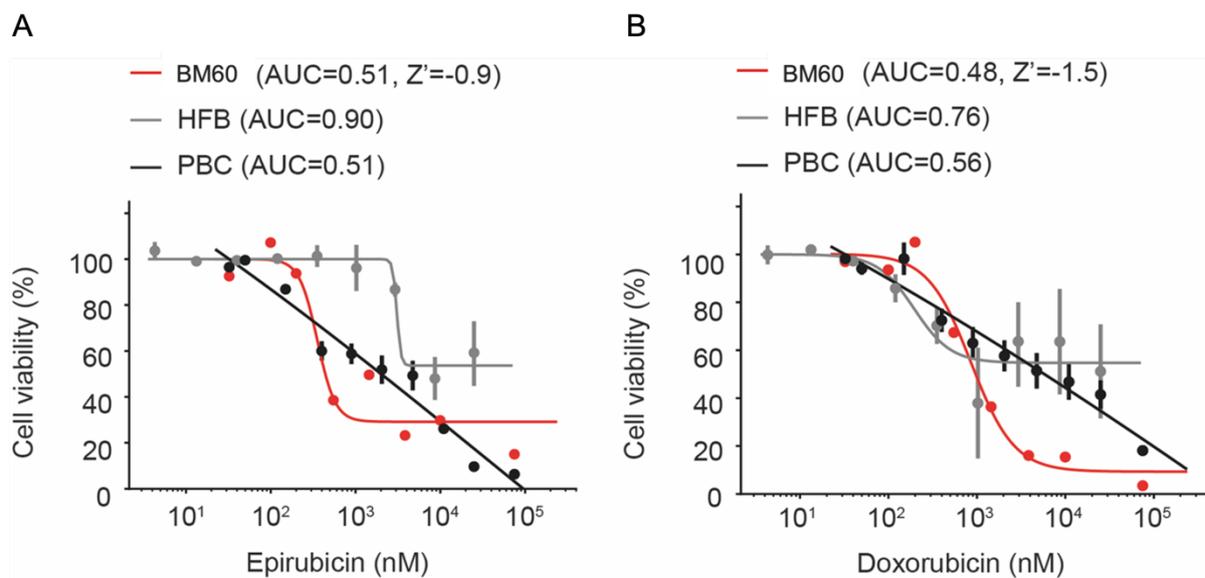


Abb. 15: Dosis-Wirkungs-Kurven von Epirubicin und Doxorubicin im HTS der BM60-Primärkultur

Z' ist größer als -2. Dies zeigt, dass Epirubicin (A) und Doxorubicin (B) auch auf die gesunden Kontrollen (HFB und PBC) hochgradig zytotoxisch wirken.

Hingegen zeigte sich eine hohe selektive Effektivität des pan-HER2-TKI Neratinib in BM60 Zellen (AUC Neratinib: 0,58; Z': -3,4). Dabei waren die zytotoxischen Effekte auf die gesunden Kontrollzellen gering (AUC Neratinib HFB: 0,98; AUC Neratinib PBC: 0,83) (Abbildung 16A). Weiterhin zeigten oral bioverfügbare JAK-Inhibitoren wie Pacritinib, Momelotinib sowie Fedratinib eine selektive Zytotoxizität für BM60 Zellen (Abbildung 16B, C, D) (Jeising et al., 2024).

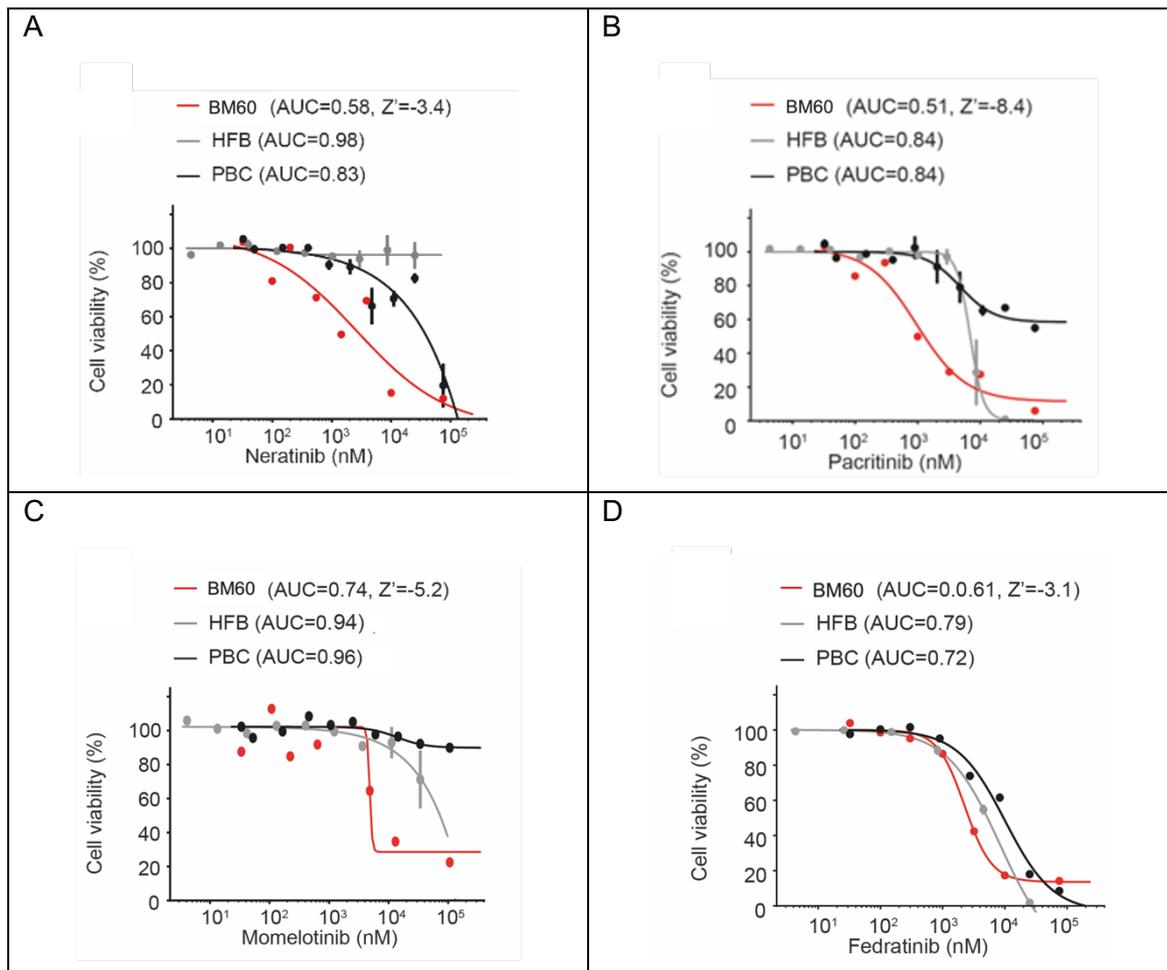


Abb. 16: Dosis-Wirkungs-Kurven von Neratinib und JAK-Inhibitoren im HTS der BM-Primärkultur BM60.

Neratinib (A), Pacritinib (B), Mometinib (C) und Fedratinib (D) reduzieren effektiv die Viabilität von BM60-Zellen im Vergleich zu HFB und PBC (aus Jeising et al., 2024).

Mithilfe dieses pharmakogenomischen Ansatzes konnten auch für die weiteren vier untersuchten BM-Zellmodelle kongruente Befunde erstellt werden (Tabelle 7). Zusammenfassend zeigte sich für BM52, eine *STK11* und *TP53* alterierte NSCLC BM, ein gutes Ansprechen auf den ERK-Inhibitor Ulixertinib (AUC: 0,70; Z': -2,11; R²: 0,93; IC₅₀: 7036 nM) (Abbildung 17A). Außerdem zeigte sich eine effektive Zellviabilitätsreduktion unter HDAC-Inhibitoren (Entinostat AUC: 0,53; Z': -2,50; R²: 0,98; IC₅₀: 376 nM (Abbildung 17B); Vorinostat AUC: 0,55; Z': -1,32; R²: 0,97; IC₅₀: 1283 nM; Tucidonistat AUC: 0,57; Z': -2,77; R²: 0,96; IC₅₀: 36789 nM;). Darüber hinaus zeigte sich auch ein Ansprechen auf den HSP90 (*heat shock protein 90*; deutsch: Hitzeschockprotein 90)-Inhibitor Tanespimycin (AUC: 0,52; Z': -0,78; R²: 0,81; IC₅₀: 1,55 fM) (Abbildung 17C). Weiterhin konnte der HIF-Stabilisator Roxadustat die Zellproliferation von BM52 Zellen im HTS signifikant reduzieren (AUC: 0,70; Z': -3,89; R²: 0,84; IC₅₀: 3266 nM) (Abbildung 17D).

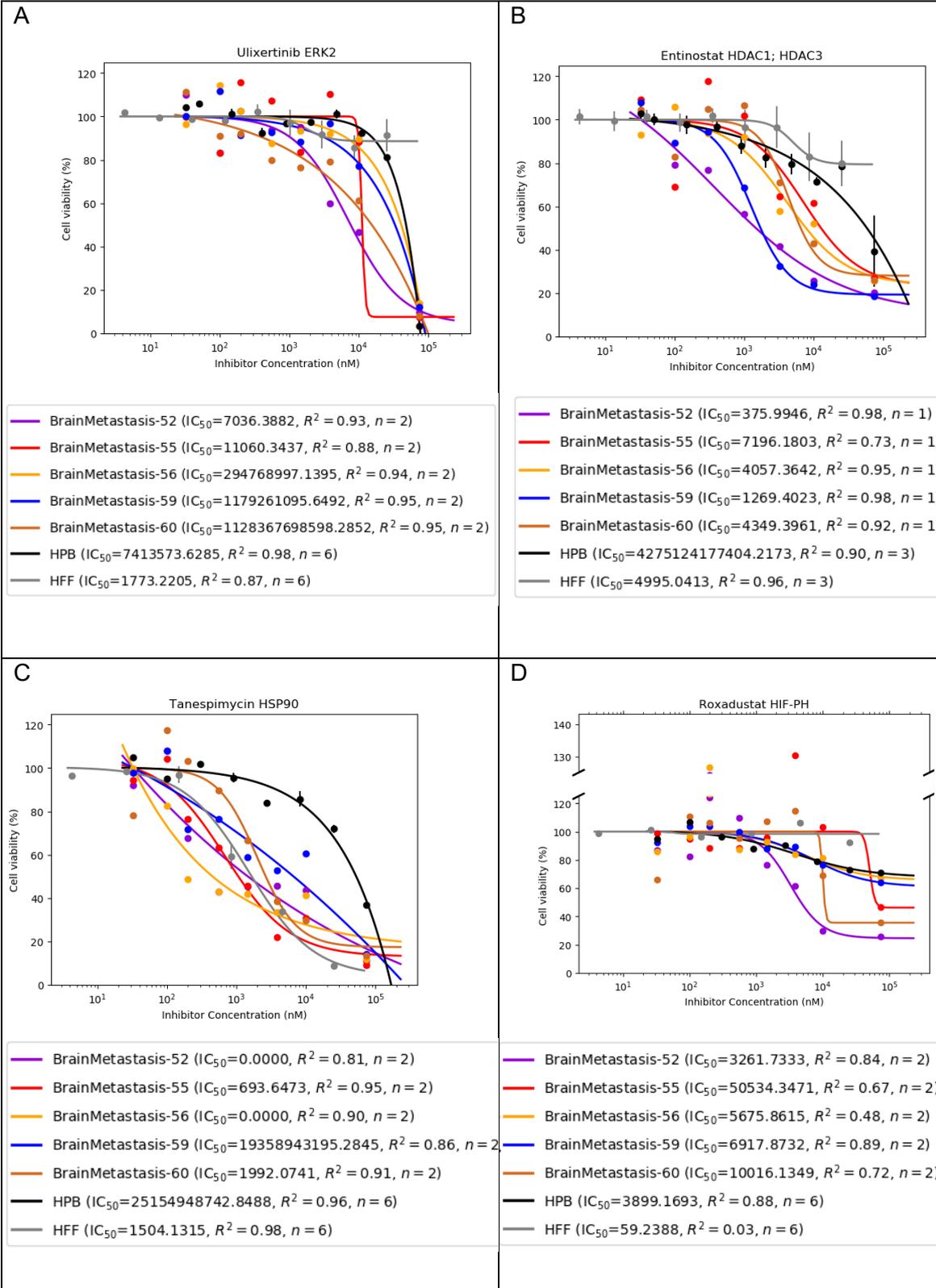
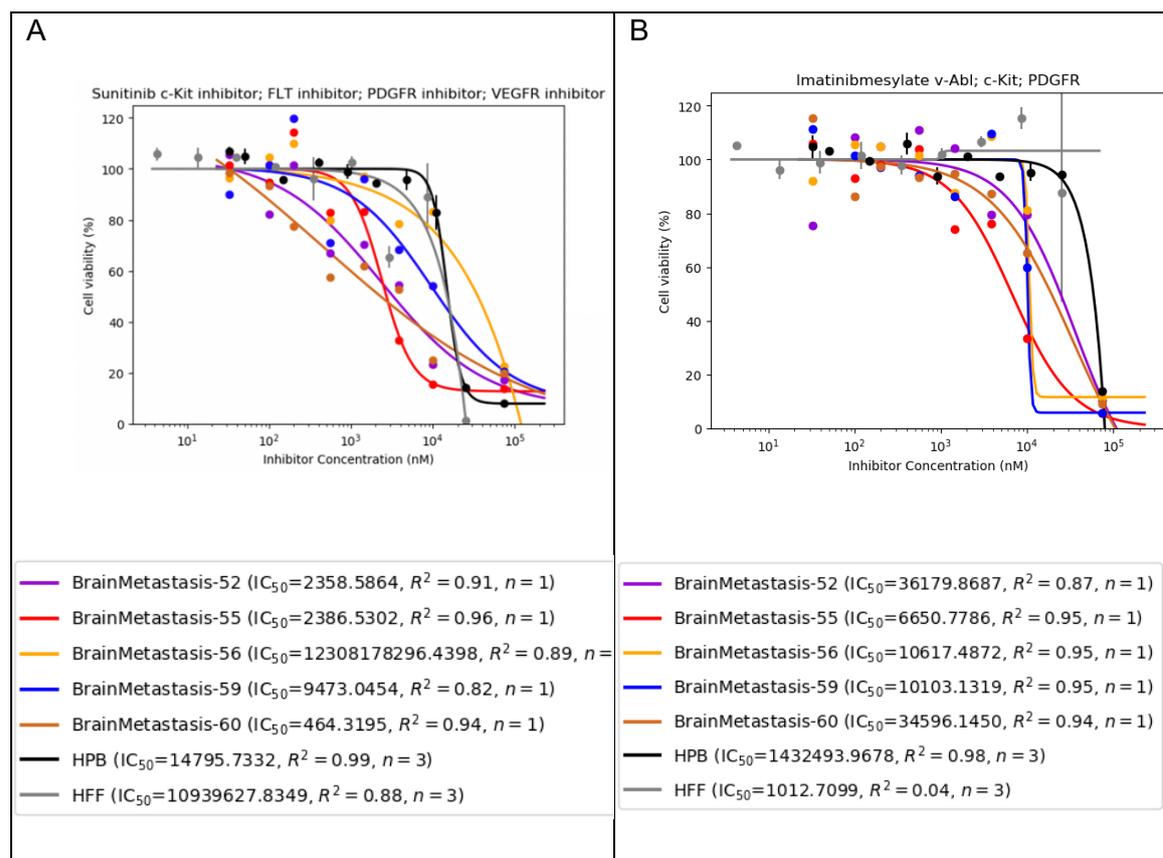


Abb. 17: Dosis-Wirkungskurven ausgewählter Wirkstoffe im HTS der BM-Primärkultur BM52.

Im HTS zeigt sich für BM52 ein besonders effektives Ansprechen auf ERK-Inhibitoren (Ulixertinib, A), HDAC-Inhibitoren (Entinostat, B), HSP90-Inhibitoren (Tanespimycin, C) sowie HIF-Inhibitoren (Roxadustat, D).

Für die Primärkultur der *KIT*-mutierten intrazerebralen Melanometastase BM55 konnte ein gutes Ansprechen auf die *KIT*-Inhibitoren Sunitinib (AUC: 0,62; Z': -1,56; R²: 0,96; IC₅₀: 2387 nM) sowie Imatinib (AUC: 0,68; Z': -2,36; R²: 0,96; IC₅₀: 6651 nM) nachgewiesen werden (Abbildung 18A und B). Das Antipsychotikum Thioridazin ist ein potenter Dopamin-Rezeptorantagonist (Grant et al., 2022) und führte im HTS von BM55 zu einer effektiven Viabilitätsreduktion (AUC: 0,52; Z': -2,16; R²: 0,96; IC₅₀: 563 nM) (Abbildung 18C). Ein gutes Ansprechen zeigte sich zudem für den Multikinase-Inhibitor Entrectinib (AUC: 0,49; Z': -2,15; R²: 0,97; IC₅₀: 883 nM) (Abbildung 18D) sowie Verteporfin (AUC: 0,53; Z': -2; R²: 0,93; IC₅₀: 1703 nM) (Abbildung 18E).



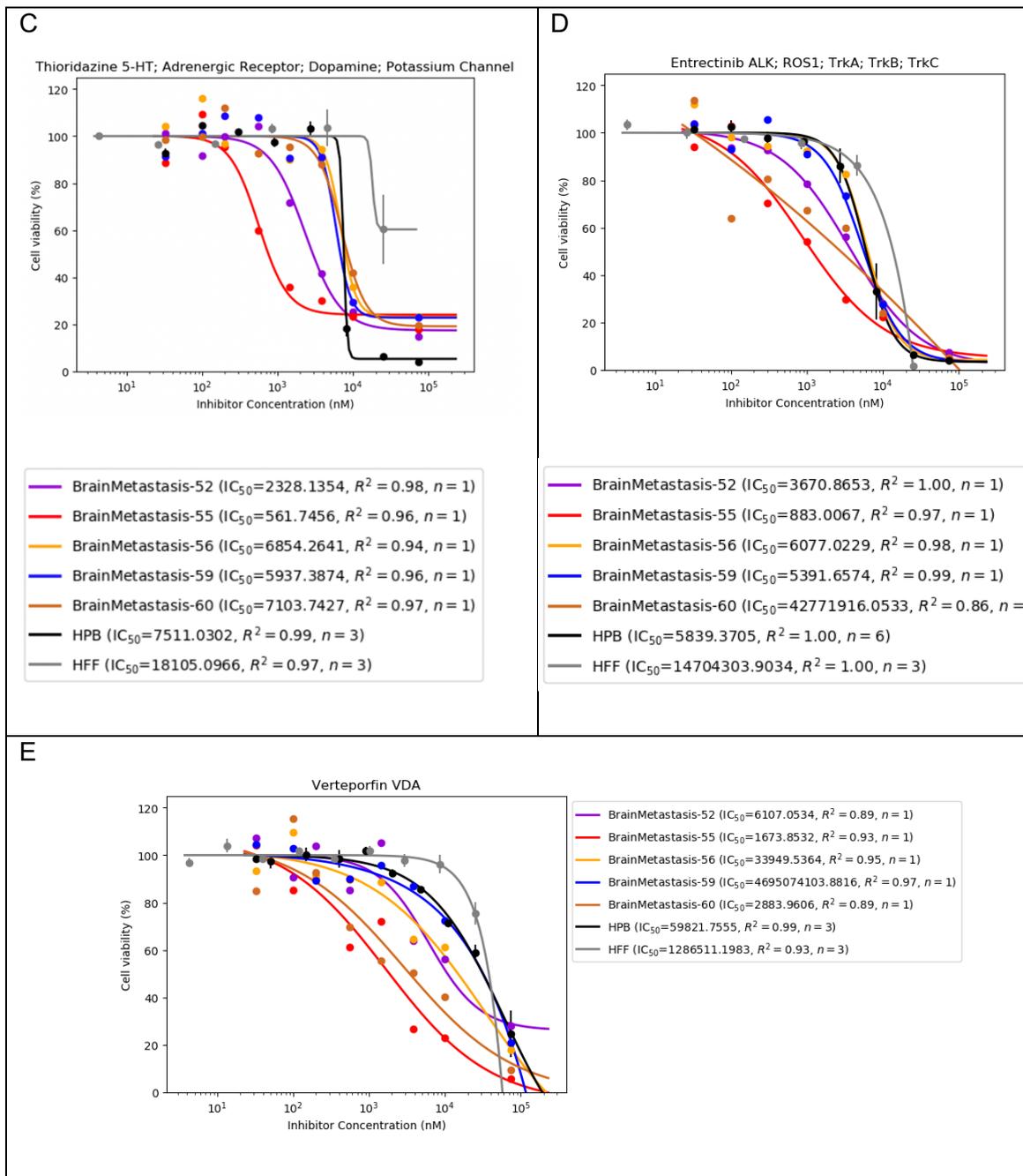


Abb. 18: Dosis-Wirkungskurven ausgewählter Wirkstoffe im HTS der BM-Primärkultur BM55.

Im HTS zeigt sich für BM55 ein besonders effektives Ansprechen auf die KIT-Inhibitoren Sunitinib (A) und Imatinib (B) sowie den Dopamin-Rezeptorantagonisten Thioridazin (C), den Multikinase-Inhibitor Entrectinib (D) und den YAP-Inhibitor Verteporfin (E).

BM56 ist die BM eines tubulo-papillären Adenokarzinoms des Magens ohne wegweisende Mutationsanalyse oder Rezeptorstatus. Im HTS konnte ein gutes Ansprechen auf HDAC-Inhibitoren (Entinostat: AUC: 0,71; Z': -0,73; R^2 : 0,95; IC_{50} : 4057 nM; Vorinostat: AUC: 0,64; Z': -0,69; R^2 : 0,99; IC_{50} : 2358 nM) (Abbildung 17B und Abbildung 19) sowie

Tanespimycin (AUC: 0,45; Z': -1,27; R²: 0,90; IC₅₀: 16 fM) (Abbildung 17C) nachgewiesen werden.

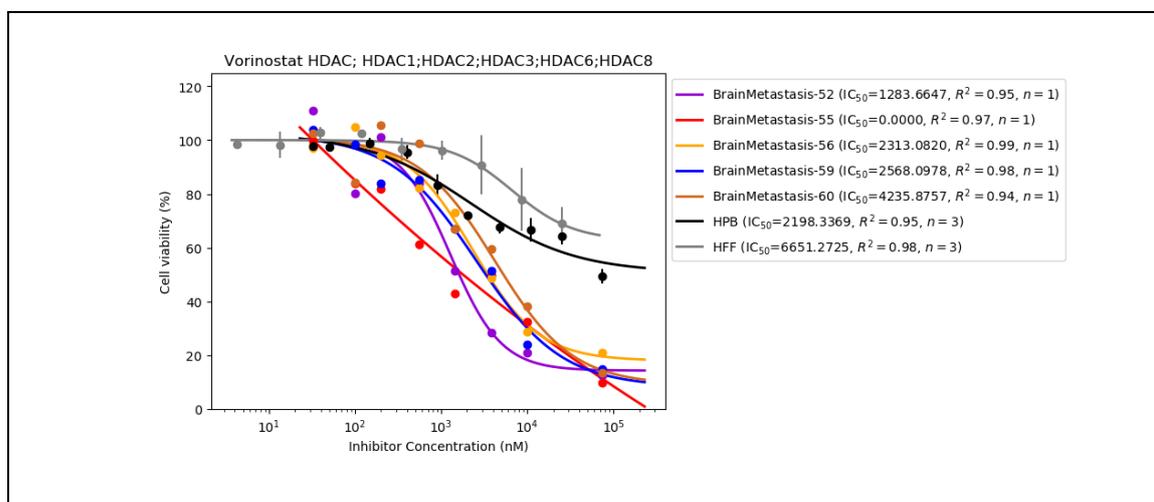


Abb. 19: Dosis-Wirkungskurve von Vorinostat im HTS der Primärkultur BM56. Im HTS zeigte sich für BM56 unter anderem eine effektive Zellviabilitätsreduktion unter HDAC-Inhibitoren wie Vorinostat.

Im HTS zeigte sich ein gutes Ansprechen von BM59 Zellen auf die FGFR-Inhibitoren Cediranib (AUC: 0,71; Z': -0,95; R²: 0,96; IC₅₀: 5016 nM) und Nintedanib (AUC: 0,68; Z': -2,02; R²: 0,97; IC₅₀: 5910 nM) (Abbildung 20A und B). Die im NGS detektierte *FGFR3*-Mutation dieser NSCLC BM wurde als wahrscheinlich benigne eingestuft (Tabelle 5). Dennoch zeigte sich eine entsprechende Viabilitätsreduktion unter diesen zielspezifischen Wirkstoffen. Darüber hinaus konnte auch in diesem HTS die Wirksamkeit des HDAC-Inhibitors Entinostat nachgewiesen werden (AUC: 0,58; Z': 0,14; R²: 0,98; IC₅₀:1269 nM) (Abbildung 17B). Abgesehen von einem ausgeprägt modellierten Toxizitätsprofil (Z': 8,22) induziert der BRAF-Inhibitor Encorafenib eine erhebliche Viabilitätsreduktion in dieser zusätzlich *KRAS* mutierten BM Zelllinie (AUC: 0,77; R²: 0,98; IC₅₀: 10037 nM) (Abbildung 20C).

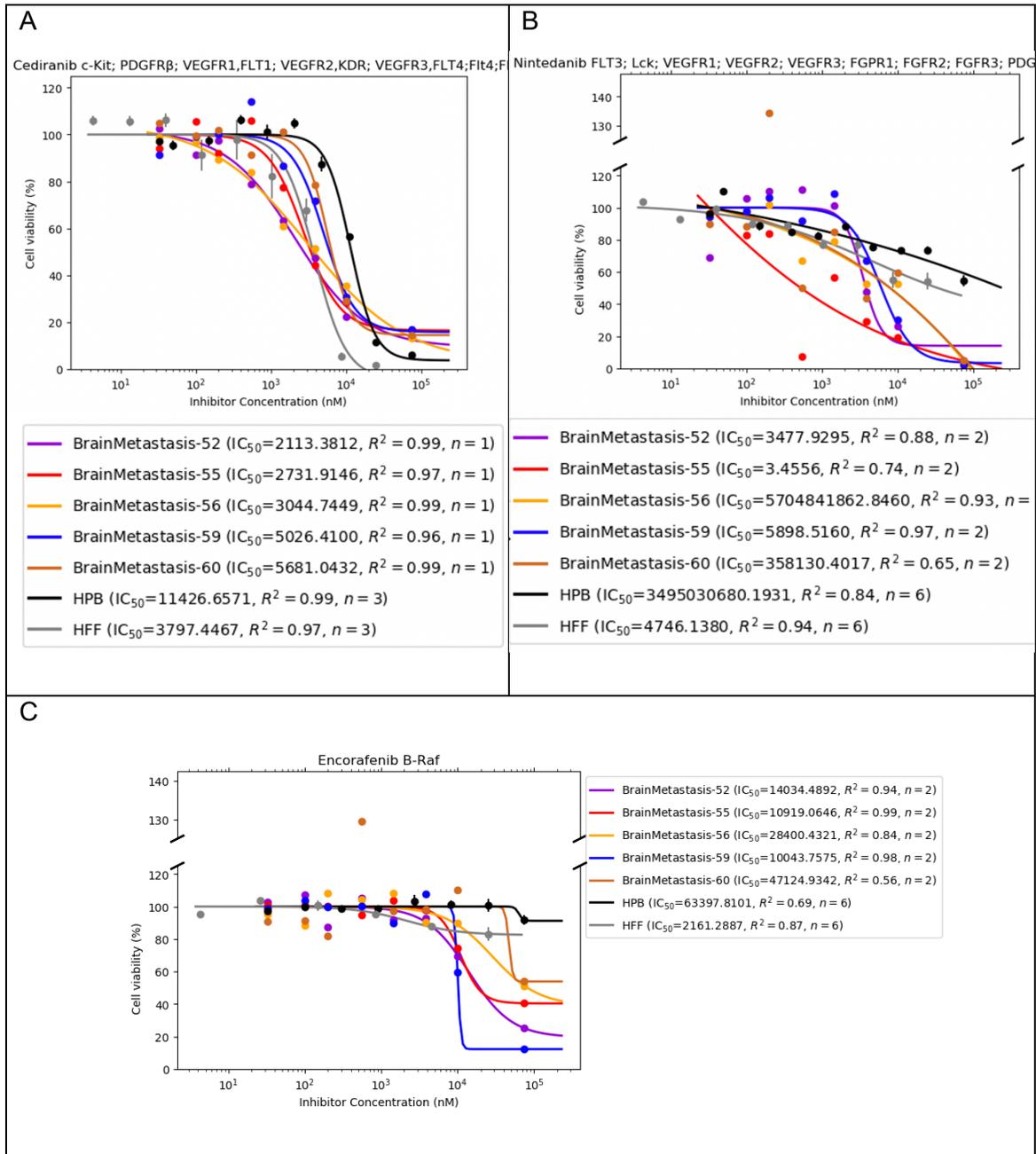


Abb. 20: Dosis-Wirkungskurven ausgewählter Wirkstoffe im HTS der Primärkultur BM59. Im HTS zeigen insbesondere die FGFR-Inhibitoren Cediranib (A) und Nintedanib (B) sowie der B-raf Inhibitor Encorafenib (C) eine besonders effektive Reduktion der Zellviabilität von BM59 Zellen.

Zur Auswertung dieser HT-Screens wurde, wie oben beschrieben, eine analoge Modulation des Toxizitätsprofils jedes einzelnen Wirkstoffes mit ausreichender Effektivität auf Grundlage des Z'-Faktors erstellt (Abbildung 21).

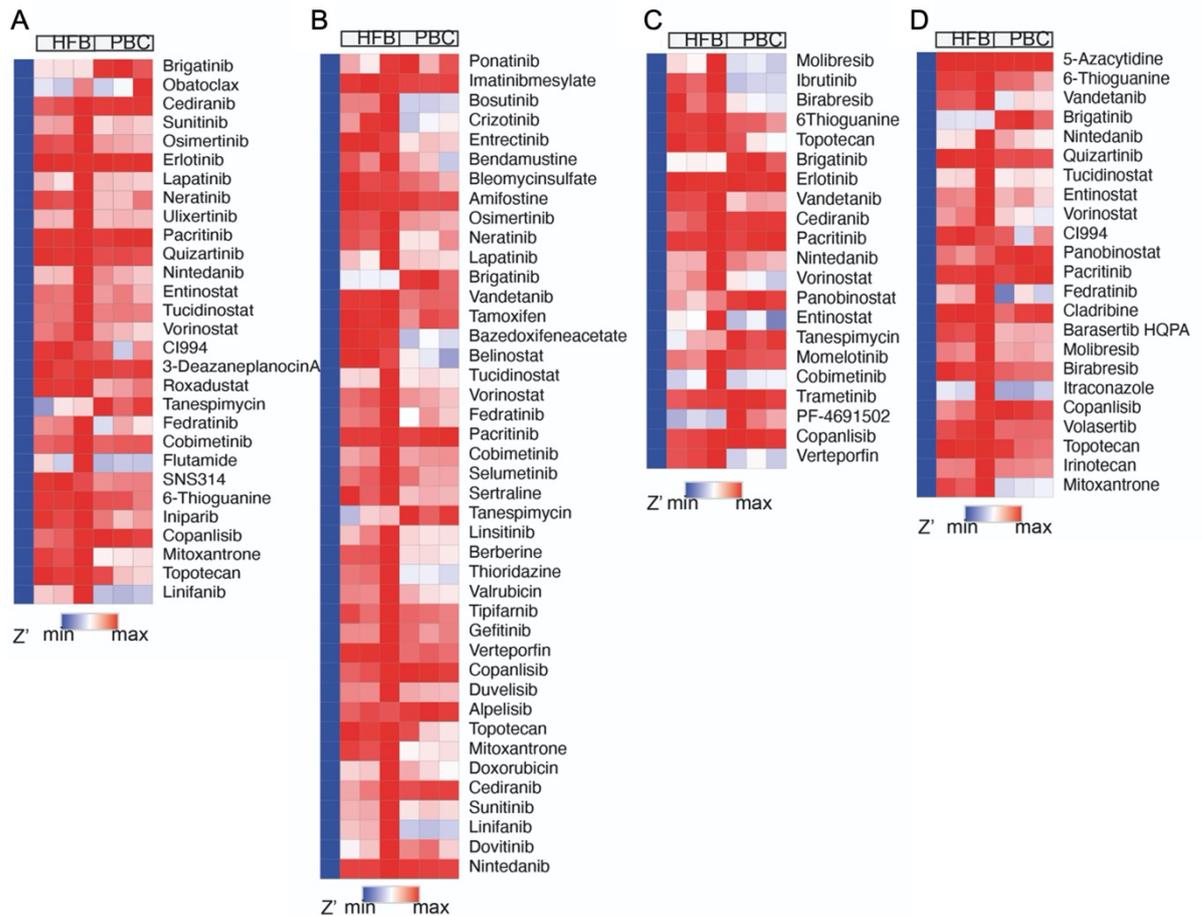


Abb. 21: Heatmaps der Z'-Faktoren.

Dargestellt sind Medikamente mit $Z' < -2$ zur Modellierung eines selektiv anti-neoplastischen Effektes. Der Z' -Faktor in den HTS der Zellmodelle BM52 (A), BM55 (B), BM56 (C) sowie BM59 (D) dient zur Selektion der Wirkstoffe mit ausreichender Effektivität auf die Zellmodelle der Metastasen ohne toxische Wirkung auf HFB und PBC.

Zusammengefasst konnte im HTS der Zellmodelle in jedem Fall ein pharmakogenetisch kongruentes Wirkprofil identifiziert werden. Die auf Grundlage der Qualitätskriterien sowie onkogenen Aberrationen identifizierten Wirkstoffe sind in Tabelle 7 zusammengetragen.

Zellmodell	Alterierte Gene	Wirkstoffe und -mechanismus
BM52	STK11/TP53	<ul style="list-style-type: none"> • Ulitixertinib/ERK-Inhibitor (Caiola et al., 2020) • Entinostat, Vorinostat/HDAC-Inhibitoren (Juan et al., 2000, Badie et al., 2022) • Tanespimycin/HSP90-Inhibitor (Waza et al., 2006, Zhu et al., 2022) • Roxadustat/HIF-Inhibitor (Laderian et al., 2020)
BM55	KIT/JAK3	<ul style="list-style-type: none"> • Imatinib, Sunitinib/KIT-Inhibitoren (Terheyden et al., 2019) • Fedratinib, Pacritinib/JAK-Inhibitoren (Mullally et al., 2020, Regenbogen et al., 2017)
BM56	ATM	<ul style="list-style-type: none"> • Entinostat, Vorinostat/HDAC-Inhibitoren (Juan et al., 2000, Badie et al., 2022) • Tanespimycin/HSP90-Inhibitor (Waza et al., 2006, Zhu et al., 2022)
BM59	FGFR3 /KRAS	<ul style="list-style-type: none"> • Cediranib, Nintedanib/FGFR-Inhibitoren (Flaherty et al., 2019) • Encorafenib/B-Raf-Inhibitor (Riely et al., 2023)
BM60	JAK3/HER2+	<ul style="list-style-type: none"> • Fedratinib, Pacritinib, Momelotinib/JAK-Inhibitoren (Mullally et al., 2020, Regenbogen et al., 2017) • Neratinib/HER2-Inhibitor (Chan et al., 2021)

Tabelle 7: Im HTS identifizierte Wirkstoffe mit zugehörigen Zielgenen der jeweiligen BM-Zellmodelle.

Die zunächst durch NGS identifizierten onkogenen Treibermutationen der BM-Zellmodelle wurden im Rahmen der Auswertung des HTS in Bezug zu den effektivsten Wirkstoffen gesetzt.

4. Diskussion

4.1. Etablierung validierter Zellmodelle

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Zellmodelle von intrazerebralen Metastasen wurden auf pHEMA beschichteten Zellkulturplatten als 3D-Tumorsphäroide in serumfreiem Medium kultiviert und kurzfristig für weitere Untersuchungen herangezogen. Zum einen ist die *in vitro* Formation von Tumorsphäroiden ein Kennzeichen von Stammzellsubpopulationen in einer Zellkultur (Clarke et al., 2006). Zum anderen konnten

nach diesem Protokoll generierte Zellmodelle die Eigenschaften von TIC sowie deren Fähigkeit in das heterogene Ursprungstumorgewebe auszudifferenzieren nachzubilden (Nolte et al., 2013). Für Glioblastome konnte bereits gezeigt werden, dass die Kultur als Tumorsphäroide longitudinale molekulare Stabilität und reproduzierbares Ansprechen auf Wirkstofftestungen ermöglicht (Nickel et al., 2021). Insgesamt betrug die Erfolgsrate der Etablierung solcher 3D-Zellmodelle in der eigenen Studie 72,2% und ist damit kongruent mit den Ergebnissen vergleichbarer Arbeiten (Nolte et al., 2013). Um die BM-Modelle zu validieren, wurden sieben korrespondierende Paare aus Ursprungsgewebe und Zellmodell mittels NGS sequenziert. Dabei zeigten sich jeweils übereinstimmende Treibermutationen zwischen Gewebe und Zellmodell (siehe Tabelle 5). Ebenso wurde ein Trend zur Zunahme der jeweiligen mutierten Allelfrequenz im Zellmodell gegenüber dem Ursprungsgewebe über den Zeitverlauf sichtbar (Abbildung 6). Dies entspricht partiell den Beobachtungen einer Zunahme der Stammzellfrequenz sowie genetischer Alterationen unter einem Selektionsdruck *ex vivo* (Mitra et al., 2013). In diesem Fall führte der Selektionsdruck zu einer Nische für diejenigen Zellen, die die Treibermutationen trugen. Hervorzuheben ist hierbei das Modell BM24, das erst nach 86 Tagen Kultivierung einer gezielten Wirkstofftestung zugeführt und sequenziert wurde. Dabei lag die EC_{50} von Naporafenib, einem Raf-Inhibitor, bei nur 15,33 μ M und die mutierte Allelfrequenz der therapeutisch adressierten *KRAS*-Mutation in diesem Zellmodell bei 99,69%. Im Vergleich zu den übrigen Zellmodellen fällt diese besonders niedrige effektive Wirkstoffkonzentration bei hoher mutierter Allelfrequenz auf.

Zusammenfassend ist das hier beschriebene Protokoll geeignet, um mit guter Erfolgsrate genetisch stabile 3D-Zellmodelle aus BM zu etablieren. Die Beziehung zwischen Allelfrequenz und zielgerichtetem Wirkstoffansprechen sowie externer Validität (im Hinblick auf eine Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse *in vivo*) bleibt bis hierhin hypothetisch. Außerdem ist die Fallzahl gering und die Versuchsdurchführung bislang abhängig von biologischer Proliferationsaktivität und logistischen Gesichtspunkten. Zusammenfassend sprechen die vorliegenden Daten dennoch dafür, Anschlussexperimente innerhalb der ersten Wochen anzustreben, da hier eine möglichst heterogene Zellpopulation vorliegt und die molekulare Situation im Patientengewebe modelliert.

Das Durchschnittsalter der Patienten in dieser Studie zum Zeitpunkt der Operation einer BM betrug 63,3 Jahre und ist damit repräsentativ für eine durchschnittliche Patientenkohorte mit BM (Durchschnittsalter bei synchronen BM: 63,5 Jahre; bei metachronen BM: 64,1 Jahre). Ebenso ist die Verteilung der Primärtumorentitäten annähernd konkordant zu repräsentativen klinischen Kohorten (Jiang et al., 2023). NSCLC

und SCLC hatten in der eigenen Studie einen Anteil von 61% (vs. 50,1%), Mammakarzinome 8% (vs. 17,3%), Melanom 11% (vs. 6,2%), Ösophaguskarzinom 11% (vs. 1,7%), Blasenkarzinom 6% (vs. 2,2%), Magenkarzinom 3% (vs. 1,1%). Eine durchschnittliche Überlebensdauer der Patienten nach Diagnose der BM ließ sich aufgrund fehlender Daten und zu geringer Fallzahl für diese Studienpopulation nicht ermitteln. Es war kein Ziel dieser Studie, epidemiologische Daten über BM zu generieren, dennoch ist die vorliegende Konkordanz der Patientenmerkmale der Studienteilnehmer mit klinischen Kohorten wichtig für die Repräsentativität der Studienergebnisse.

4.2. *In vitro* Therapietestung

4.2.1. Personalisierte Wirkstofftestung

Die Güte der gezielten Wirkstofftestungen muss kritisch diskutiert werden. Diese wurden initial zur Untersuchung des funktionellen Ansprechens der erstmals etablierten Zellmodelle angestellt. Daher wurden zunächst keine Variations- und Determinationskoeffizienten ermittelt, weil DMSO- und Positivkontrollen fehlten. Diese Gütekriterien können zur Detektion von Ausplattierungsfehlern oder einer unzureichenden biologischen Zellmodellgüte (bspw. Proliferation und Viabilität) herangezogen werden. Darüber hinaus wurde keine Modellierung des Toxizitätsprofils durchgeführt. In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse ergaben sich jedoch Hinweise für Dosis-abhängige Effekte auf die Viabilität der Zellmodelle. Für die Modelle BM24 (personalisierter Wirkstoff: Naporafenib), BM27 (personalisierter Wirkstoff: Osimertinib) und BM31 (personalisierter Wirkstoff: Selpercatinib) zeigten sich zudem jeweils geringere effektive Wirkstoffkonzentrationen für den personalisierten Wirkstoff im Vergleich zu Standardchemotherapeutika. Naporafenib ist ein oral verfügbarer Raf-Inhibitor der Novartis AG und wird derzeit in einer Phase-I Studie im Einsatz gegen fortgeschrittene oder metastasierte *KRAS*- oder *BRAF*-mutierte NSCLC und Melanome untersucht (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02974725). Erste Ergebnisse zeigen eine allgemein gute Verträglichkeit des Pharmakons unter der ermittelten Therapiedosis (Wolf et al., 2020). Als Studienzentren sind Essen und Köln in unmittelbarer Umgebung zu Düsseldorf geführt. Für eine Osimertinib-Monotherapie in *EGFR*-mutierten NSCLC BM zeigen aktuelle Daten eine exzellente komplette intrakranielle Ansprechrate von 77,2% und ein Zweijahresüberleben von 80% (Imber et al., 2023). Unter Vorbehalt einer interdisziplinären und partizipativen Entscheidungsfindung liegt damit eine starke Empfehlung für die zielgerichtete adjuvante Behandlung dieser Patientengruppe vor. Eine *RET*-Fusion ist zwar selten im NSCLC; die zielgerichtete Therapie mit Selpercatinib zeigte jedoch in BM-

Patienten eine objektive intrakranielle Ansprechrate von 91% (Drilon et al., 2020a). Auch die zugehörige klinische Studie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03157128) rekrutiert derzeit in Köln. Zusammenfassend stehen die Ergebnisse der eigenen gezielten Wirkstofftestungen im Einklang mit der im Rahmen der nNGM-Befundung durchgeführten Sequenzierung und unterstreichen die ausgesprochene Therapieempfehlung. Unter Vorbehalt der methodischen Limitationen und Berücksichtigung der klinischen Studienergebnisse validieren sich die personalisierte Wirkstofftestung am Zellmodell und die NGS-basierte Therapieempfehlungen *vice versa*.

4.2.2. Radiotherapie

Angeichts der beschriebenen Innovationen auf dem Gebiet der kranialen Strahlentherapie und positiven Studienergebnisse ist diese Modalität integraler Bestandteil eines multimodalen Therapiekonzeptes für Patienten mit BM. Belastbare Daten zur präklinischen Modellierung des Ansprechens sowie zu prospektiven Kombinationstherapien fehlen jedoch. Ziel war es daher, Zellmodelle hinsichtlich des Ansprechens auf *in vitro* Radiotherapie zu untersuchen. Hierfür wurde die Glioblastomzelllinie GBM1 als Referenz eingeschlossen und eine klinisch relevante Strahlendosis von 30 Gy appliziert.

Es zeigte sich zunächst eine Reduktion des Zellüberlebens von GBM1 24 h nach Behandlung, während dieses das Ausgangsniveau nach 48 h wieder überstieg. Ein solcher *Rebound* zeigte sich auch in dem *RET*-alterierten NSCLC BM-Zellmodell BM31. Über den lokalen Therapieerfolg einer kranialen Strahlentherapie in Abhängigkeit vom Primärtumor existieren widersprüchliche Studienergebnisse. Zwar gelten Nierenzellkarzinome und maligne Melanome als strahlenresistent, jedoch konnte in einer retrospektiven Analyse kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die lokale Kontrolle zwischen BM strahlensensibler und strahlenresistenter Primärtumoren aufgedeckt werden (Yaeh et al., 2015). Eschrich et al. (2009) entwickelten daher ein Multigen-Expressionsmodell der Strahlensensitivität eines Tumors auf Grundlage der Expression von Strahlenresistenz-assoziierten Genen. Dieses wurde in verschiedenen Patientenkohorten unterschiedlicher Krebserkrankungen validiert und zeigte eine robuste prädiktive Modellierung (Eschrich et al., 2009). Wendet man es auf BM an, so zeigt sich einerseits, dass die modellierte Strahlensensibilität unabhängig vom Primärtumor ist, andererseits dass die Mehrheit der BM als strahlenresistent eingeschätzt werden muss. Resümiert bedeutet dies, dass Strahlenresistenz von BM über alle Primärtumoren hinweg existiert und hier lediglich ablative radiochirurgische Dosen therapeutisches Gewicht haben (Ahmed et al., 2017). Die beobachteten *Rebound*-Phänomene könnten sich zum

einen aus einer Applikation der Bestrahlung während einer strahlenrobusten Phase des Zellzyklus (frühe S-Phase) oder etwa aus einer selektiven Wirkung auf schnell proliferierende Subpopulationen erklären (Bruning-Richardson et al., 2021). Die Radiatio der *KRAS*-mutierten NSCLC-BM-Kultur BM24 sowie der TNBC-Kultur BM33 reduzierte das Zellüberleben über den Zeitverlauf; jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Möglicherweise werden diese Effekte auch hier aufgrund einer bei den gewählten Beobachtungszeitpunkten nicht erfassten geringen Zellproliferation nicht ausreichend messbar. Weitergehend wäre auch eine fraktionierte Bestrahlungsalpplikation zu untersuchen.

Zukünftig könnte die etablierte Plattform mit dem beschriebenen Genexpressions-Modell validiert sowie die Effekte der Radiatio mit der Proliferationsrate und dem Ansprechen *in vivo* korreliert werden. Darüber hinaus ist der Effekt einer Kombination von Wirkstoffen und Radiotherapie von großem klinischem Interesse und kann auf Basis des etablierten Modells untersucht werden. Im Zeitalter der Präzisionsmedizin ist die Identifikation von für die Strahlentherapie zugänglichen Patienten und individuellen Kombinationstherapien in Zusammenschau der vorliegenden Daten ein auf personalisierten *in vitro* Testungen aufbauender Prozess.

4.2.3. TTFields-Behandlung

Die Kosten für eine TTFields-Behandlung liegen bei 21.000 \$ monatlich und werden kontrovers diskutiert (Rominyi et al., 2021). Das Nebenwirkungsprofil dieser Therapie ist hingegen besonders im Vergleich zu den bereits erläuterten Ansätzen günstig. Die häufigste, bei bis zu 43% der Patienten auftretende Nebenwirkung ist eine milde bis moderate Kontakt- oder allergische Dermatitis. Diese kann in der Regel gut mit topischen Kortikosteroiden, gegebenenfalls Antibiotika und einer vorübergehenden Schonung der betroffenen Areale vor den Klebeflächen der Transduktoren behandelt werden (Lacouture et al., 2014). Auch bei jahrelanger Anwendung wurden bisher keine hochgradigen Nebenwirkungen berichtet (Mun et al., 2018). Für die kraniale Applikation konnte durch ein Fragebogen-basiertes Assessment bei Patienten mit einem rezidierten Glioblastom eine Verbesserung der Lebensqualität insbesondere im Bereich kognitiver Funktionen (Stupp et al., 2012) und bei Patienten mit einem neu diagnostizierten Glioblastom kein Unterschied hinsichtlich der Lebensqualität für die Kombination für TTFields mit Temozolomid gegenüber der medikamentösen Monotherapie über einen Zeitraum von einem Jahr festgestellt werden (Zhu et al., 2017).

Die TTFields-Behandlung durch das *in vitro*TM Laborsystem führte in der eigenen präklinischen Studie zu einer signifikanten Reduktion des Zellüberlebens in allen

verwendeten Zelllinien bzw. Primärkulturen (Abbildung 12). Vorarbeiten konnten einen Frequenz- und Intensitäts-abhängigen Effekt von TTFIELDS auf die Zellviabilität verschiedener humaner Krebszelllinien zeigen. So zeigte sich ein signifikanter Effekt bei Frequenzen zwischen 100-200 kHz bei einer Intensität zwischen 1,1-1,75 V/cm. Dabei waren die optimalen Parameter abhängig von der untersuchten Tumorentität. Zur Berechnung der optimalen TTFIELDS-Frequenz als Funktion aus Zelldurchmesser, Dicke der Zellmembran und Leitfähigkeit des Zytoplasmas konnte ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen Zellgröße und Frequenz identifiziert werden. Im Ergebnis betrug die optimale Frequenz zur Reduktion der Zellzahl 200 kHz für Gliomzellen, 150 kHz für Brustkrebszellen und 100 kHz für Melanomzellen (Kirson et al., 2007). Um GBM1 Zellen als Positivkontrolle referenzieren zu können, wurden in dieser Studie Intensitäten von 1,7 V/cm mit einer Frequenz von 200 kHz über 72 h appliziert.

Im März 2024 erreichte die Phase-III Studie zur TTFIELDS Therapie von NSCLC BM ihren primären Endpunkt. Das Konzept der METIS-Studie basiert auf der Erkenntnis, dass die Reparatur durch Radiotherapie induzierter Doppelstrangbrüche unter TTFIELDS inhibiert wird. Unter TTFIELDS ist die Expression von Genen, deren Produkte an der Reparatur dieser Defekte beteiligt sind, vermindert (Karanam et al., 2017, Giladi et al., 2017). Darüber hinaus geht man inzwischen sogar davon aus, dass TTFIELDS neben mitotischen und immunogenen Effekten nicht nur die Reparatur der Doppelstrangbrüche inhibieren, sondern sogar durch die Induktion von Replikationsstress Doppelstrangbrüche induzieren kann (Karanam et al., 2020). Patienten mit 1-10 NSCLC BM, die zuvor mittels SRT therapiert worden waren, erhielten im Therapiearm TTFIELDS und supportive Maßnahmen, während im Kontrollarm lediglich supportiv therapiert wurde. In beiden Armen konnte eine Systemtherapie der Grunderkrankung erfolgen. Bei 298 eingeschlossenen Patienten zeigte sich eine mediane Zeit bis zur intrakraniellen Progression von 11,3 Monaten im Kontrollarm vs. 21,9 Monaten im Therapiearm. Dabei betrug die mediane Therapiedauer mit TTFIELDS 16 Wochen bei einer medianen Nutzung von 67% (Goldberg, 2024).

Vor dem Hintergrund der klinischen Resultate und den hier identifizierten Zielmutationen wäre eine Testung möglicher Kombinationstherapien hoch interessant. Insbesondere weil Patienten mit zielgerichtet therapierbaren Tumoralterationen aus der METIS-Studie ausgeschlossen worden sind. Zum einen zeigte die *RET*-alterierte NSCLC-Kultur BM31 in der Wirkstofftestung ein Ansprechen auf Selpercatinib sowie die *KRAS*-mutierte Kultur BM32 ein Ansprechen auf Naporafenib. Diese *in vitro* Wirkstoffbehandlungen könnten nach Identifikation der effektiven Wirkstoffkonzentration im *in vitro*TM Laborsystem auf kombinierte Effekte unter dem Zusatz von TTFIELDS untersucht werden. Zum anderen sind die beschriebenen abkopalen Effekte (Kirson et al., 2009) Grundlage für das Studiendesign einer Kombination von TTFIELDS mit Immuntherapien (siehe EF-41/Keynote

D58-Studie). Da BM32 der nNGM-Empfehlung zufolge auch mit einer Kombination aus Pembrolizumab und Bemcentinib therapiert werden könnte, wäre die Testung einer synergistischen Kombination mit TTFields möglicherweise im Tiermodell interessant. Darüber hinaus ließen sich auf Grundlage des etablierten Modells auch Effekte einer Kombination von Radiotherapie und TTFields im Zellmodell charakterisieren.

Für BM33 konnte eine hoch signifikante Reduktion des Zellüberlebens unter TTFields nachgewiesen werden, während keine signifikante Wirkung einer Einzeiltradiotherapie mit 30 Gy erzielt werden konnte. Für Patienten mit BM von dreifach negativem Brustkrebs gibt es derzeit wenig Evidenz zur Empfehlung einer systemischen Behandlung. Bei progressiven, dreifach negativen BM kann eine Kombinationstherapie aus Carboplatin und Bevacizumab eingesetzt werden (Lin et al., 2013a, Bailleux et al., 2021). Hier stehen sich einerseits die limitierte Prognose mit wenigen therapeutischen Optionen und andererseits das exzellente Nebenwirkungsprofil von TTFields verglichen mit einer systemischen Pharmakotherapie oder strahlentherapeutischen Interventionen sowie der hier ermittelte Effekt auf das Zellmodell gegenüber. Weitere präklinische und klinische Untersuchungen der TTFields-Applikation für TNBC BM wären somit möglicherweise vielversprechend.

4.3. Hochdurchsatzwirkstofftestung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Wirkstofftestung pharmakogenetisch koncordante Ergebnisse in ausgewählten, aus BM etablierten Zellmodellen erbringen kann. Dies ließ sich anschließend auch für weitere BM Zellmodelle im Hochdurchsatzverfahren reproduzieren. Auf Grundlage der Grenzwerte für die Qualitätskontrollen konnten fünf von sechs BM-Zellmodelle zur weiteren Auswertung herangezogen werden.

Hier zeigte sich für die HER2-positive Ösophaguskarzinommetastase BM60 mit *JAK3*-Mutation unbekannter Pathogenität ein gutes Ansprechen auf den oralen pan-HER2-TKI Neratinib sowie auf verschiedene JAK-Inhibitoren. Neratinib ist in Deutschland auf Grundlage der ExteNET-Studie zur erweiterten adjuvanten Therapie des HER2-positiven Mammakarzinoms zugelassen (Martin et al., 2017). Fedratinib und Pacritinib sowie Momelotinib sind oral bioverfügbare JAK-Inhibitoren und wurden erstmalig 2019 und 2022 bzw. 2024 zur Behandlung der Myelofibrose zugelassen (Lamb, 2022, Blair, 2019, Verstovsek et al., 2023). Diese Wirkstoffgruppe zeigte auch eine effektive Reduktion der Zellviabilität von *JAK3*-mutierten Zellen der Hirnmetastase BM55 eines malignen Melanoms. Neben der *JAK3*-Mutation lag hier auch eine Mutation im Protoonkogen *KIT* vor. In Einzelfällen bietet diese seltene Aberration (etwa 2% aller Melanome) einen

Angriffspunkt für KIT-Inhibitoren (Terheyden et al., 2019). Im HTS zeigte sich dazu passend ein gutes Ansprechen auf Imatinib und Sunitinib.

In der *STK11*-mutierten Hirnmetastase BM52 eines NSCLC konnte eine geringe effektive Wirkstoffkonzentration für den ERK-Inhibitor Ulixertinib nachgewiesen werden. ERK ist eine *downstream* Kinase des MAPK-Signalweges (Abbildung 22). Dieser ist eng mit dem durch *STK11* regulierten AMPK (*AMP-activated protein kinase*)-Signalweg (Abbildung 23) assoziiert. Während MAPK die zelluläre Proliferation, Differenzierung und das Zellüberleben reguliert, steuert AMPK mit mehr als 100 *downstream* Effektoren den Zellmetabolismus, indem es die AMP:ADP:ATP Ratio detektiert und die Synthese von Kohlenhydraten, Aminosäuren, Cholesterol und Lipiden entsprechend reguliert. Inzwischen konnten zahlreiche bidirektionale Wechselwirkungen zwischen MAPK und AMPK und ihren Effektoren identifiziert werden. Man geht also davon aus, dass sich diese in bis zu 85% aller Krebszellen hyperaktivierten Signalwege gegenseitig regulieren und AMPK ein Effektor von MAPK ist (Yuan et al., 2020). So liegt in den zu etwa 30% *KRAS*-mutierten NSCLC bei circa der Hälfte eine *STK11*-Mutation vor. In Zell- und Tiermodellen von *STK11*-alterierten NSCLC konnte die Wirksamkeit von Ulixertinib bereits demonstriert werden (Caiola et al., 2020). Für Patienten mit MAPK-alterierten Krebserkrankungen und ausgeschöpften Therapieoptionen konnte Ulixertinib einen signifikanten klinischen Vorteil erbringen (Stuhlmiller et al., 2022). Hinzu kommt, dass *STK11*-Mutationen mit einem verminderten Ansprechen auf immuntherapeutische Interventionen assoziiert sind und sogar eine primäre Resistenz vermitteln könnten (Mograbi et al., 2021). So ist die ERK-Inhibition möglicherweise ein therapeutischer Ansatzpunkt, trotz des bei diesem Patienten vorliegenden positiven PD-L1 Rezeptorstatus.

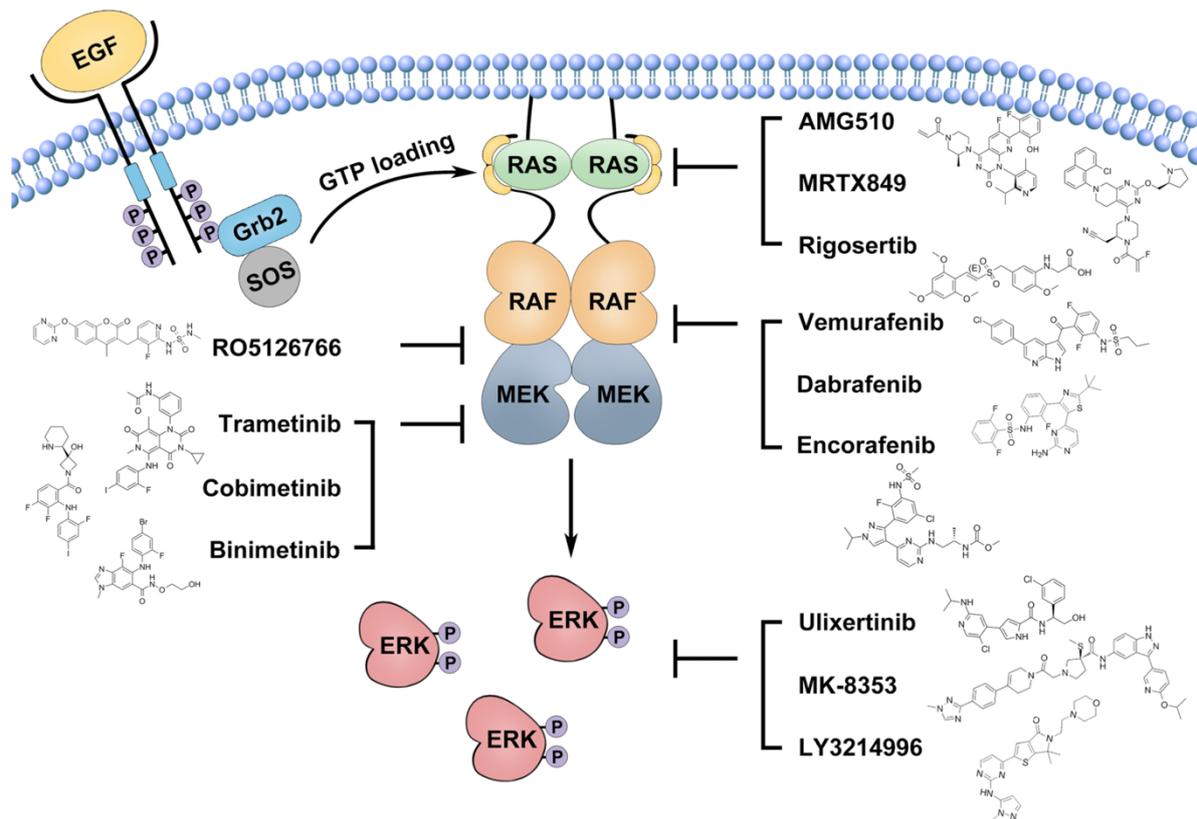


Abb. 22: Der Ras/RAF/MEK/ERK (MAPK)-Signalweg und therapeutische Ansatzpunkte.

Nach Aktivierung durch Liganden der Rezeptortyrosinkinasen aktivieren diese eine durch Guaninaustauschfaktoren und SOS-Proteine vermittelte GTP-Beladung von RAS. RAS rekrutiert nun RAF/MEK Heterodimere, die durch Anlagerung von RAF transiente Tetramere ausbilden. Hierdurch werden MEK aktiviert und phosphorylieren ERK. Durch diese Phosphorylierungskaskade werden letztendlich verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Zellproliferation fördern. Diese häufig in Krebszellen hyperaktivierte Signalkaskade kann durch Inhibitoren auf unterschiedlichen Wirkebenen gehemmt werden (aus Yuan et al., 2020).

Auf der Ebene des Tumorzellstoffwechsels können *STK11*-Mutationen über den AMPK Signalweg zu einer Entthemmung der durch mTOR regulierten HIF1 α -Expression führen. Dies hat eine Verschiebung des zellulären Glukosestoffwechsels von oxidativer Phosphorylierung hin zur Glykolyse durch Substratkettenphosphorylierung zur Folge (Abbildung 23). Hierdurch können die Tumorzellen insbesondere unter Stressbedingungen proliferieren. Eine vermehrte HIF1 α -Expression hat zudem proangiogenetische, proliferative und invasive Effekte (Laderian et al., 2020, Pons-Tostivint et al., 2021). Im HTS BM52 führte der zur Behandlung der renalen Anämie zugelassene HIF-Stabilisator Roxadustat zu einer Reduktion der Zellviabilität. Dies erscheint zunächst widersprüchlich, da eine durch Roxadustat vermittelte Hemmung der

Prolinhydroxylase zu einem verminderten Abbau von HIF führt und die oben genannten Effekte verstärken müsste. Präklinische Daten weisen jedoch darauf hin, dass es über diesen Mechanismus zur Induktion des Zelltodes durch Ferroptose spezifisch in Tumorzellen kommt. So führt die *in vitro* Behandlung von Glioblastomzellen mit Roxadustat zu einer Akkumulation intrazellulären Eisens und vermehrter Lipidperoxidation, was in der Folge einen ferroptotischen Zelltod induziert. Da nicht-neoplastische Zellen weniger prädispositioniert sind für Ferroptose, erklärt sich ein in diesem Falle protektiver Effekt auf gesunde Zellen (Nutzen des pro-proliferativen Effektes bei der Behandlung von Gewebedefekten und Anämien), während Tumorzellen untergehen (Su et al., 2022).

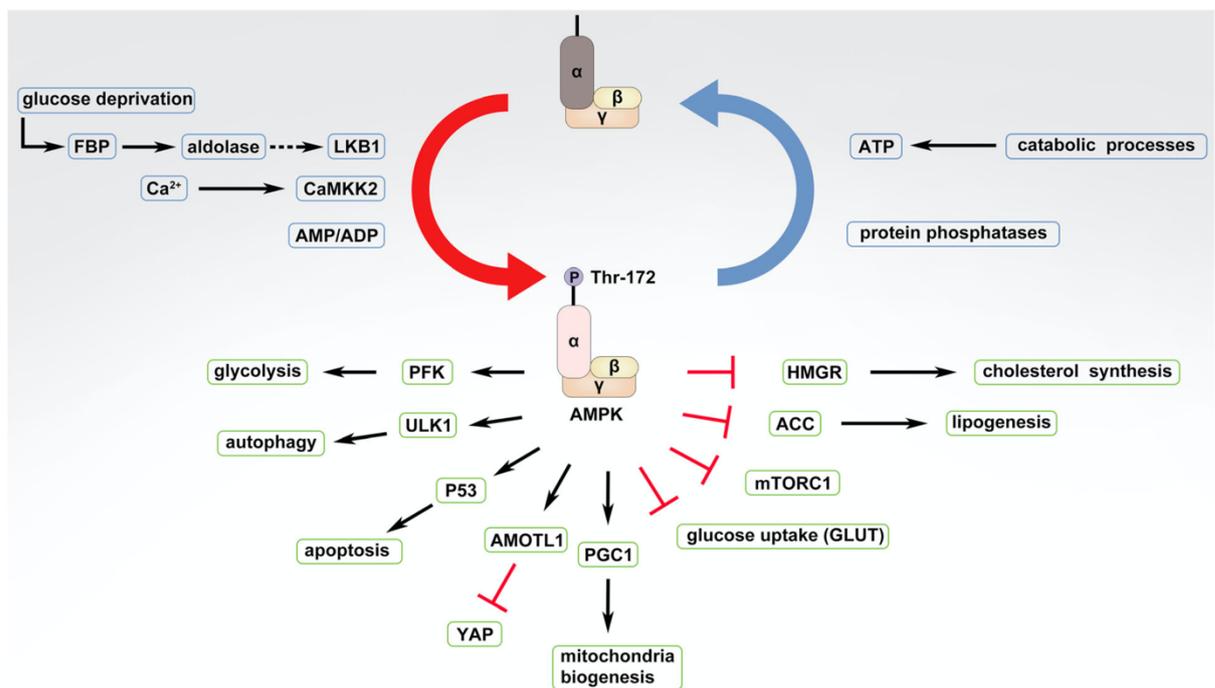


Abb. 23: AMPK-Aktivierung und AMPK-Signalkaskade.

AMPK wird durch STK11 (Synonym: LKB1) oder CAMKK2 mittels Phosphorylierung aktiviert. Dies führt über zahlreiche Effektoren zu einer katabolischen Verschiebung des Metabolismus. Liegt ausreichend ATP vor, werden Proteinphosphatasen aktiviert, die eine Dephosphorylierung und damit Inaktivierung von AMPK vermitteln (aus Yuan et al., 2020). LKB1 (*Liver kinase B1*); CAMKK2 (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2*); FBP (*fructose 1,6-bisphosphate*); PFK (*6-phosphofructo-2-kinase*); ULK1 (*unc-51-like autophagy activating kinase 1*); AMOTL1 (*angiomin like 1*); YAP (*Yes-associated protein*); PGC (*Proliferator- activated receptor gamma coactivator 1- alpha*); ACC (*Acetyl-CoA carboxylase*); HMGR (*HMG-CoA reductase*).

Im HTS der *KRAS*- und *FGFR3*-mutierten NSCLC-Hirnmetastase BM59 zeigte sich einerseits eine geringe effektive Wirkstoffkonzentration für die FGFR-Inhibitoren Cediranib und Nintedanib. Andererseits ergab auch die Behandlung mit Encorafenib, einem BRAF-Inhibitor, eine effektive Zellviabilitätsreduktion. Im Mausmodell zeigte Nintedanib eine präventive Wirkung auf die Ausbildung von NSCLC BM und konnte zudem das Volumen entstehender BM reduzieren (Kovalchuk et al., 2020). Nintedanib wirkt als TKI auf multiple Ziele proangiogenetischer Wachstumsrezeptoren. So auch Cediranib, welches sich primär gegen den *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR) richtet, aber ebenso die FGFR-abhängige Proliferation inhibiert. Neben den antiangiogenetischen Effekten dieser Wirkstoffe *in vivo* zeigen Untersuchungen auf Grundlage von Zellmodellen antiproliferative Effekte, die wahrscheinlich auf einer Hemmung der durch den FGFR aktivierbaren MAPK- und PI3K-Signalwege beruhen (Salgia, 2014, Lee et al., 2015). Darüber hinaus liegen bereits positive Phase-III Studienergebnisse zur FGFR-Inhibition durch diese Wirkstoffe in NSCLC-Patienten vor (Reck et al., 2014, Pacini et al., 2021). Encorafenib hingegen ist ein BRAF-Inhibitor (Abbildung 22), der in Deutschland in verschiedenen Kombinationen zur Behandlung von Patienten mit nicht-resezierbarem oder metastasiertem Melanom oder metastasiertem Kolorektalkarzinom mit einer BRAF-V600E-Mutation, die eine systemische Vortherapie erhalten haben, zur Anwendung kommt. BRAF ist eine *downstream* Kinase, die direkt durch KRAS aktiviert wird und daher möglicherweise im Rahmen der vorliegenden onkogenen *gain-of-function* Mutation überexprimiert vorliegt. Die Zulassung von Encorafenib für Patienten mit metastasiertem, *BRAF*-mutiertem NSCLC ist derzeit in Prüfung, nachdem eine Phase-II Studie ein bedeutsames klinisches Ansprechen nachgewiesen hatte (Riely et al., 2023). Leider kommt es in diesen Patienten nach einigen Monaten meist zu einer Resistenzentwicklung durch alternatives Spleißen innerhalb der *BRAF*-Mutation oder einer aktivierenden RAS-Mutation. Darüber hinaus ist inzwischen aus klinischen Daten bekannt, dass es in *KRAS*-mutierten Tumoren (wie in diesem Falle) zu einer paradoxen Aktivierung des MAPK-Signalweges kommen kann (Van Allen et al., 2014).

Zusammenfassend zeigte das HTS für die Hirnmetastasen BM52 und BM59 pharmakogenetisch konkordante Effekte auf die Zellviabilität für Inhibitoren der MAPK- und AMPK-Signaltransduktion. Die genauen molekularen Wechselwirkungen zwischen diesen Signalwegen und entsprechenden Effektoren sind bislang nicht erforscht und die Implikationen für die Therapie onkologischer Erkrankungen bisher unklar. Aus klinischen Studien ergeben sich zum Teil paradoxe Mechanismen der Inhibition verschiedener Ebenen dieser Signalwege (Yuan et al., 2020). Insofern ist eine genauere Charakterisierung der beschriebenen Effekte wichtig für das weitere Verständnis dieser onkogenen Aberrationen.

Die durchgeführten Panelsequenzierungen decken jedoch keine epigenetischen oder metabolischen Aberrationen im Tumorzellmodell auf. *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass sich das Ansprechen auf zielgerichtete Wirkstoffe zwischen Zellmodellen trotz identischer genetischer Treibermutationen signifikant unterscheiden kann (Lee et al., 2015, Morikawa et al., 2023), möglicherweise aufgrund eines engen Zusammenhangs metabolischer und epigenetischer Veränderungen sowie darunterliegenden Regulationsmechanismen in den Tumorzellen (Thakur and Chen, 2019). Vor diesem Hintergrund ergibt sich der Bedarf an Hochdurchsatz-Wirkstoff-Testungen, die das Ansprechen auf Pharmaka unterschiedlicher Wirkebenen im Zellmodell modellieren können. Hierdurch könnten sich weiterführend auch indirekte Hinweise auf epi- und postgenetische Schlüsselmechanismen der Karzinogenese finden lassen.

Für die Hirnmetastase BM56 eines tubulo-papillären Adenokarzinoms des Magens zeigte sich eine wahrscheinlich neutrale *ATM*-Aberration bei negativem PD-L1 Status. Hieraus ergibt sich keine personalisierte Therapieempfehlung. Im HTS des zugehörigen Zellmodells zeigte sich jedoch eine effektive Reduktion des Zellüberlebens unter HDAC-Inhibitoren. Die posttranslationale Modifikation an Histonen durch Histondeacetylasen ist neben der DNA-Methylierung der wichtigste epigenetische Vorgang bei der Entstehung von Magenkrebs. Dabei haben sich die präklinischen Hinweise insbesondere für die Hemmung der HDAC im Falle des Magenkarzinoms kürzlich verdichtet (Badie et al., 2022). Neben den bereits diskutierten Effekten fanden sich auch im HTS der NSCLC-Hirnmetastase BM52 signifikante Effekte auf das Zellüberleben unter Entinostat und Vorinostat. HDAC-abhängige epigenetische Histonmodifikationen sind auch ein Schlüsselmechanismus der Karzinogenese und Metastasierung von NSCLC. Diese Wirkstoffe zeigen pleiotrope zelluläre Effekte mit pro-apoptotischer Wirkung. Daher gibt es derzeit eine Reihe klinischer Studien in Kombination mit Immuntherapeutika zur Therapie des NSCLC (Mamdani and Jalal, 2020).

Im HTS der Hirnmetastase BM52 führte die HIF-Prolylhydroxylase-Inhibition durch Roxadustat zu einer signifikanten Zellviabilitätsreduktion. Auf der anderen Seite können HSP90 Inhibitoren HIF sowohl unter hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen eliminieren (Isaacs et al., 2002). Darüber hinaus liegen auch für HDAC-Inhibitoren Hinweise vor, dass diese mit HIF interagieren und dessen Degradation induzieren (Masoud and Li, 2015). Insbesondere die Expression von STK11 (HIF ist ein *downstream* Effektor von STK11) ist durch Methylierung seiner Promotorregion und posttranslationale Modifikationen durch microRNAs reguliert. Um die Funktion dieses Tumorsuppressorgens festzustellen, sind Mutationsanalysen daher unzulänglich. Um Patienten mit betreffenden

Alterationen im Rahmen klinischer Studien zu identifizieren, sollte dies Berücksichtigung finden (Pons-Tostivint et al., 2021).

In der Hirnmetastase BM55 eines amelanotischen Melanoms fielen neben KIT-Inhibitoren drei weitere Wirkstoffe im Wirkstoffscreening auf, die sich signifikant auf die Zellviabilität auswirkten. Entrectinib ist ein potenter multi-TKI, der speziell für eine exzellente Penetration der Bluthirnschranke entwickelt wurde (Ardini et al., 2016). Die Verträglichkeit dieses Wirkstoffes konnte bereits in zwei Phase I Studien unter anderem in Patienten mit malignem Melanom und BM nachgewiesen werden (Drilon et al., 2017). Außerdem konnte die Viabilität des Zellmodells signifikant unter der Behandlung mit Thioridazin reduziert werden. Dieses als Neuroleptikum in der Behandlung der Schizophrenie zugelassene Pharmakon ist ein Dopamin-Rezeptorantagonist. Die häufig in Melanozyten eines malignen Melanoms dysregulierte Melaninbiogenese ist ein Levodopa-abhängiger Prozess. Darüber hinaus ist das decarboxylierte Stoffwechselprodukt von Levodopa Dopamin; ein zentraler Neurotransmitter. Dopamin-abhängige Stoffwechselwege haben sich aufgrund ihrer Rolle bei der Karzinogenese in unterschiedlichen Entitäten zu einem Ziel antineoplastischer Therapeutika entwickelt. Eine Reihe von *in vitro* und *in vivo* Experimenten belegt die antiproliferative Wirkung von Dopaminrezeptorantagonisten in Tumorzellen. Obwohl der Wirkmechanismus bisher nicht im Detail aufgedeckt worden ist, zeigte sich auch hier eine Beteiligung des PI3K- und MAPK-Signalwegs (Grant et al., 2022). Zuletzt zeigte auch Verteporfin, ein Inhibitor des YAP/TAZ-Signalweges, eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens im BM55-Modell. YAP und TAZ wurden als wichtige Transkriptionsregulatoren im Rahmen des Hippo-Signalweges in Gliomen identifiziert und spielen darüber hinaus in vielen weiteren Entitäten eine wesentliche Rolle in Rezeptortyrosinkinase-Signalwegen (Liu-Chittenden et al., 2012). Das Besondere an diesem Wirkstoff ist seine Eigenschaft neben der pharmakologischen Wirkung auch als Fluoreszenzfarbstoff sowie als Photosensibilisator eingesetzt werden zu können (Read, 2022). Einerseits kann Verteporfin daher als intraoperativer Fluoreszenzfarbstoff zur FGR genutzt werden, ohne dass Veränderungen am Equipment für die 5-ALA FGR vorgenommen werden müssen (Vigneswaran et al., 2020). Andererseits ist Verteporfin ein potenter Photosensibilisator, der von Glioblastomstammzelllinien bei geringsten Konzentrationen aufgenommen wird und deren Zelltod bei Aktivierung mittels eines 689 nm Laserlichts induziert (Jeising et al., 2022). Eine synergistische Ausschöpfung des therapeutischen Potentials von Verteporfin könnte in einer intraoperativen Nutzung als Fluoreszenzfarbstoff und ergänzenden photodynamischen Behandlung sowie anschließender adjuvanter Darreichungen bestehen.

In Anbetracht der beeindruckenden Studienergebnisse immuntherapeutischer Ansätze zur Behandlung von BM ergibt sich die Frage nach dieser Behandlung sogar bei Patienten mit behandelbarer Zielmutation. Nivolumab in Kombination mit Ipilimumab sollte inzwischen als Erstlinie bei Patienten mit Melanom BM ungeachtet des *BRAF*-Mutationsstatus eingesetzt werden (Tawbi et al., 2018, Le Rhun et al., 2021). Da die Effektivität dieser Immuntherapie unter Kortikosteroideinnahme bei symptomatischen BM jedoch stark reduziert ist (Long et al., 2018), ist ab einer Tagesdosis von 4 mg Dexamethason eine *BRAF*-zielgerichtete Therapie angezeigt (Le Rhun et al., 2021). Diese Erkenntnis lässt sich auch auf andere Entitäten übertragen und ist ein Hinweis für zielgerichtete Therapien in diesem Setting. Darüber hinaus liegen wie bspw. für eine *STK11*-Mutation intrinsische Resistenzen gegen eine Immuntherapie vor (Mograbi et al., 2021).

Inzwischen sollte auch in der Neuroonkologie eine personalisierte Therapiestrategie erwogen werden. Lazaridis et al. (2022) konnten zeigen, dass Patienten mit rezidiviertem Glioblastom ein medianes Gesamtüberleben von 13 Monaten bei einer molekular zielgerichteten, personalisierten Therapie gegenüber 4,3 Monaten bei der Standardtherapie aufwiesen. Die personalisierten Therapien wurden dabei auf Grundlage klinischer oder sogar präklinischer Daten beliebiger onkologischer Erkrankungen für die entsprechende genetische Alteration ausgewählt. Die zielgerichtete Behandlung zeigte dabei ein sicheres Nebenwirkungsprofil, welches vergleichbar mit dem der Standardtherapie war (Lazaridis et al., 2022). Hinsichtlich des größeren Umfangs an Daten für genetisch zielgerichtete Therapien in verschiedenen Primärtumorentitäten regen diese Erkenntnisse vor dem Hintergrund eines moderaten Nebenwirkungsprofils zur personalisierten Stratifizierung und Behandlung von Patienten mit BM an.

Zhu et al. (2022) beschrieben kürzlich eine neue Methode, *in situ* Wirkstofftestungen mit mittlerem Durchsatz an Schnitten von Mäusegehirnen durchzuführen. Immundefizienten Mäusen wurde zuvor eine GFP (*green fluorescent protein*; deutsch: grün fluoreszierendes Protein)-exprimierende NSCLC BM Zelllinie intrakardial injiziert. Nach Metastasierung wurden zerebrale Schnitte angefertigt und einem Wirkstoffscreening mit 114 Wirkstoffen unterzogen. Von diesen erzielten 17 eine Reduktion der Biolumineszenz von 80% oder mehr in den Metastasen. DEBIO-0932, ein Inhibitor von HSP90 war dabei von besonderem Interesse, da er die Bluthirnschranke durchdringt sowie ein moderates Toxizitätsprofil aufweist. In anschließend durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen auf das Vorkommen von HSP90 in BM von 40 NSCLC und 20 Mammakarzinomen zeigte sich, dass 98% der Metastasen positiv waren. Im Vergleich zu ihrem Primärtumor wiesen 43% der BM eine Zunahme sowie 40% eine vergleichbare

HSP90 Expression auf. Unabhängig von der Primärtumorentität zeigt sich daher eine hohe HSP90 Expression in BM, dessen nukleares Vorkommen in NSCLC Patienten mit einem schlechteren Überleben sowie einer Neigung zur Fernmetastasierung korreliert. Die Autoren etablierten daraufhin 19 Zellmodelle unterschiedlicher BM-Entitäten und onkogener Profile und testeten diese gegen DEBIO-0932. Insgesamt 74% der Zellmodelle waren sensitiv gegen den HSP90-Inhibitor (Zhu et al., 2022). Auch in der eigenen Studie ergaben sich im HTS für die Hirnmetastasen BM52 und BM56 Hinweise auf die Wirksamkeit der Inhibition von HSP90 durch Tanespimycin (Abbildung 17C). Diese Wirksamkeit wird darauf zurückgeführt, dass HSP90 als Chaperon in vielen onkogenen Signalwegen (wie HER2, ALK, ROS1, EGFR und BRAF) involviert ist (Neckers and Workman, 2012). Darüber hinaus zeigte sich im Mausmodell insbesondere ein vielversprechendes Anwendungsgebiet der HSP90-Inhibition als Adjuvanz nach mikrochirurgischer Resektion von BM (Zhu et al., 2022). Diese Arbeit zeigt daher das Potential, auf Basis der etablierten Plattform Rückschlüsse auf neue Ansatzpunkte in der Therapie von BM schließen zu können und eröffnet dadurch neue translationale Ansätze.

Um die von Zhu et al. (2022) etablierte Plattform auf die Fähigkeit zu testen, das Therapieansprechen *in vivo* vorhersagen zu können, wurden 14 Glioblastomzelllinien in der beschriebenen Technik xenotransplantiert und die gewonnenen Schnitte anschließend *in situ* dem Stupp-Protokoll zugeführt. Der Einschluss von Glioblastompatienten begründete sich hierbei darin, dass für diese ein standardisiertes Therapieprotokoll besteht; wohingegen der Therapieverlauf nach operativer Resektion bei BM-Patienten sehr heterogen ist. Die Patienten wurden nach dem Stupp-Protokoll (Stupp et al., 2005) behandelt und das Therapieansprechen wurde nach Abschluss der Therapie mittels MRT-basierter Tumolvolumetrie ermittelt. Das auf Basis der *in situ* Plattform ermittelte Ansprechen auf die Therapie korrelierte in 86% mit dem Ansprechen auf die Therapie des zugehörigen Patienten (Zhu et al., 2022). Der Status der *MGMT* (O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase)-Promotormethylierung als etablierter prädiktiver Biomarker für die Glioblastomtherapie (Mansouri et al., 2019) korrelierte hingegen nur zu 50% mit dem Therapieansprechen der Patienten (Abbildung 24) (Zhu et al., 2022). Diese Ergebnisse zeigen die Möglichkeit auf, mithilfe der etablierten Plattform Avatare zur Vorhersage auf das Therapieansprechen von Hirntumorpatienten zu erstellen.

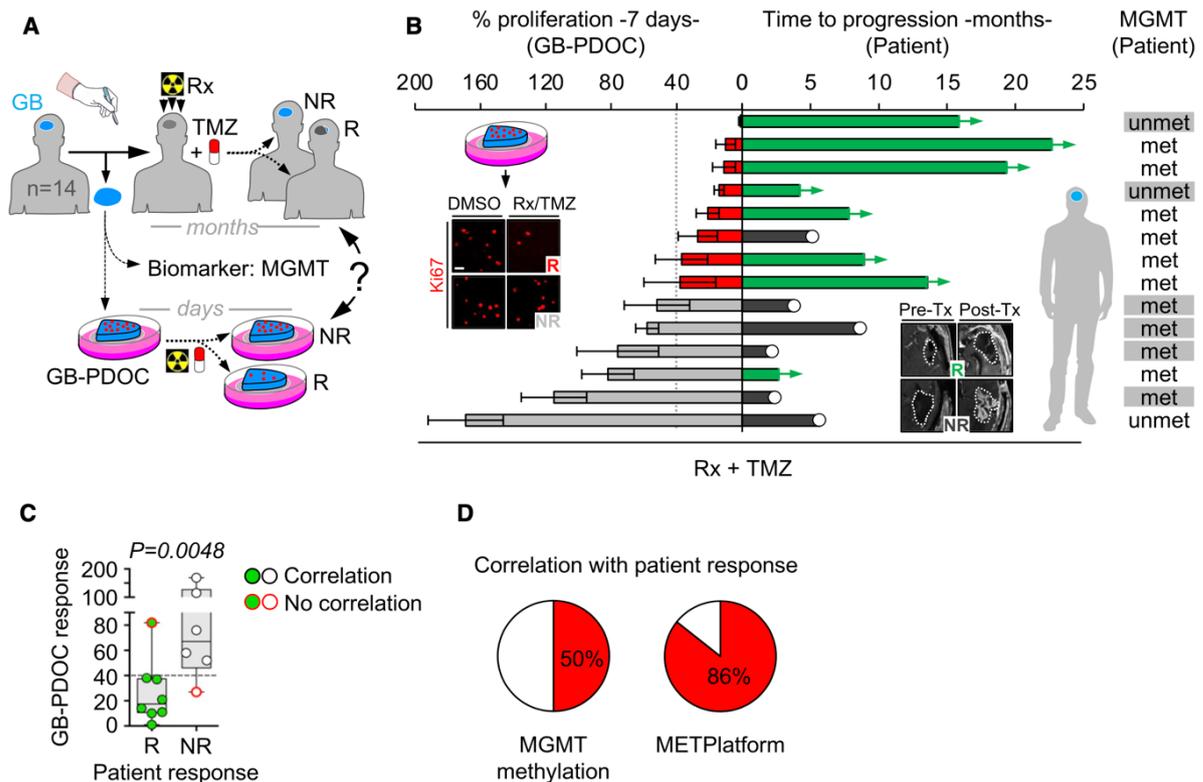


Abb. 24: Avatare zur Vorhersage des Therapieansprechens auf das Stupp-Protokoll in Glioblastompatienten.

A: Schematische Darstellung des oben beschriebenen Versuchsablaufes; B: Gegenüberstellung der Proliferation der Avatare innerhalb von einer Woche nach Abschluss der Therapie *in situ* mit der Zeitspanne bis zum Krankheitsprogress des korrespondierenden Patienten mit jeweiligem Status der *MGMT*-Promotormethylierung (die Einteilung in Therapieansprechen vs. kein Therapieansprechen wurde *in situ* anhand der Ki67-Proliferationsrate und im Patienten anhand der posttherapeutischen MRT-basierten Tumolvolumetrie erstellt); C: Darstellung der Korrelation zwischen posttherapeutischer Proliferationsrate der Avatare mit der Gruppierung der Patienten aufgrund des Therapieansprechens als Box-Whisker-Plot (Jeder Punkt entspricht einem Patienten des zugehörigen GB-PDOC; die Linie in der Box dem Median. Die Boxen reichen vom oberen bis zum unteren Quartil und die Antennen vom Minimal- bis zum Maximalwert. Der P-Wert wurde anhand eines zweiseitigen t-Tests berechnet.); D: Gegenüberstellung des Anteils der korrekten Vorhersage des Therapieansprechens auf Grundlage des *MGMT*-Promotormethylierungsstatus oder der etablierten Avatare als Tortendiagramme (aus Zhu et al., 2022). GB (Glioblastom); Rx (Radiotherapie); TMZ (Temozolomid); NR (*non-responder*): engl. für kein Therapieansprechen; R (*responder*): engl. für Therapieansprechen; GB-PDOC (*Glioblastoma patient-derived organotypic cultures*): engl. für von Glioblastompatienten stammende organotypische Zellkulturen; DMSO (Dimethylsulfoxid); METPlatform: von Zhu et al. (2022) etablierte, in A schematisch dargestellte *in situ* Plattform zur Wirkstofftestung.

Zhu et al. (2022) konnten auf Basis ihrer *in situ* Plattform eine Reihe wesentlicher Ziele in der Therapie von BM identifizieren, die sich mit den in der eigenen Studie identifizierten Ansätzen weitgehend decken. Ihr methodischer Ansatz identifizierte HSP90, MEK1/2, CDKs, RAF1, BRAF, VEGFR, PDGFR, FGFR, DNA-PK, PI3K, ATR und KIT als Schlüsselmechanismen bei der Ausbildung von BM (Zhu et al., 2022). Trotz der geringen Fallzahl erbrachte das HTS auch in dieser Studie Hinweise auf eine wirksame Inhibition von HSP90, FGFR und KIT sowie *downstream* Effektoren von MEK1/2, RAF1 und BRAF. Hier verdichten sich offenbar präklinische Studienergebnisse zu therapeutischen Ansatzpunkten für BM, die nun im Rahmen klinischer Studien überprüft werden können.

Abschließend muss der Stellenwert der Hochdurchsatztherapietestung gegenüber der Panelsequenzierung diskutiert werden. Letztere ergibt eine Liste möglicher Therapieziele ohne Rangfolge. Die Entscheidungsfindung zur weiteren Therapieplanung obliegt dabei ohne Möglichkeit, das Therapieansprechen vorherzusagen, dem Patienten und behandelnden Ärzten. Eine individuelle Hochdurchsatztherapietestung ermöglicht dabei eine weitergehende Priorisierung der Ergebnisse. So konnten in dieser Studie signifikante Effekte von JAK-Inhibitoren im HTS der Hirnmetastasen BM55 und BM60 identifiziert werden, wohingegen die zugrundeliegende *JAK3*-Mutation formal von unklarer Pathogenität war. Die *FGFR3*-Mutation in BM59 ist sogar wahrscheinlich benigne, im HTS zeigte sich für BM59 jedoch ein signifikantes Ansprechen auf FGFR-Inhibitoren. Dies zeigt die methodische Limitation einer reinen Panelsequenzierung, die lediglich Ziele therapeutischer Interventionen aufdeckt, jedoch keine Modellierung der Wirksamkeit erlaubt. Darüber hinaus konnten in den *in vitro* Testungen Wirkstoffe identifiziert werden, die normalerweise nicht in der Therapieplanung dieser Entität eingesetzt worden wären und Bestandteil insbesondere von klinischen Untersuchungen Chemotherapie-resistenter Tumore sein könnten (Morikawa et al., 2023). So bspw. für die Hirnmetastase BM56, deren Sequenzierung keine zielgerichtet therapierbare Alteration ergeben hatte. Hier zeigte sich für HDAC- und HSP90-Inhibitoren eine signifikante Wirkung *in vitro*, die angesichts der Hinweise auf Effekte im Magenkarzinom und BM möglicherweise auf Basis eines individuellen Heilversuches eingesetzt werden könnten.

Aus der hier dargestellten Fülle an Therapieoptionen leitet sich vor allem eines ab: Der Bedarf an prospektiv randomisierten Studien zur Definition einer optimalen Kombinationstherapie aus Systemtherapien mittels TKIs und Immuntherapie, Operation und Radiotherapie (Le Rhun et al., 2021) sowie innovativer Lokalthérapien. Innovative (prä-)klinische Ansätze in der Behandlung von BM kombinieren chirurgische,

strahlentherapeutische und pharmakologische Verfahren und werden zurzeit intensiv beforscht. Hier zu nennen sind bspw. die *laser interstitial thermal therapy* (LITT) (Ahluwalia et al., 2018), die intraoperative Strahlentherapie (Cifarelli and Jacobson, 2021) sowie die Photodynamische Therapie mit 5-Aminolävulinsäure (Schipmann et al., 2020) oder Verteporfin (Jeising et al., 2022). Hier gilt es die einschlägigen Entwicklungen bei den Systemtherapien inklusive deren Implikationen für die übrigen Modalitäten zu berücksichtigen. An dieser Stelle sei bspw. die Option einer sequentiellen operativen Probengewinnung im Rahmen einer Therapie unter TKIs erwähnt (Chen and Fu, 2011, Schäfer et al., 2019).

Eine multidisziplinäre Therapieentscheidung im Rahmen eines (molekularen) Tumorboards steht jedoch immer im Mittelpunkt der Entscheidungen, insbesondere bei Konstellationen mit teilweise geringem Evidenzlevel der Entscheidungsgrundlage (Kage, 2021). Hier können digitale Lösungen wie *artificial intelligence* (AI)-basierte Applikationen helfen, die Konkordanz mit aktuellen Daten und Leitlinien zu verbessern (Ural et al., 2022).

4.4. Limitationen

Die vorliegende Studie weist eine Reihe wesentlicher Limitationen auf:

Allen voran erlaubt die geringe Fallzahl keine Ableitung allgemeingültiger Grundsätze. Darüber hinaus sind die vorliegenden Ergebnisse teils methodisch limitiert. So wurde in der initial von Zhu et al. (2022) durchgeführten Wirkstofftestung der *in situ* Ansatz auch mit einer Testung von Sphäroiden der verwendeten BM Zellkultur verglichen, um die Konkordanz der verschiedenen Modelle im Hinblick auf das Ansprechen auf die verwendeten Wirkstoffe zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass nur sieben der 17 *in situ* identifizierten Kandidaten wirksam waren (Zhu et al., 2022). Dies unterstreicht den Einfluss der Mikroumgebung in BM auf das Therapieansprechen (Boire et al., 2020) und limitiert daher rein Zellmodell-basierte Plattformen. Außerdem wurden die Zellmodelle hier nicht weitergehend charakterisiert im Hinblick auf Proliferationsaktivität oder prädiktive Marker. Die gezielten Wirkstofftestungen wurden ohne belastbare Qualitätskontrollen durchgeführt und weder hier noch im HTS wurden Wirkstoffeffekte weitergehend mechanistisch charakterisiert. Darüber hinaus fehlen eine Reihe klinisch bedeutsamer Inhibitoren in der für das HTS eingesetzten *Clinical Library* (wie bspw. Sotorasib, Adagrasib, Ripretinib, Bemcentinib und Naporafenib). Eine Modellierung der Toxizität auf hämatologische Zellen im Rahmen des hier vorliegenden Screens ist bisher nicht validiert, d.h. die präklinischen Ergebnisse könnten möglicherweise bei multimorbiden Patienten und Patienten in schlechtem klinischem Zustand nur bedingt Anwendung finden.

4.5. Schlussfolgerungen

1. Tumorsphäroide sind ein valider Ansatz zur kurzfristigen Etablierung von genetisch repräsentativen Zellmodellen aus zerebralen Metastasen.
2. Tumor Treating Fields sind eine vielversprechende Therapiemodalität, die in allen hier untersuchten Zellmodellen eine signifikante Reduktion der Zellviabilität induzierten.
3. Inhibitoren des MAPK- und AMPK-Signalweges, von JAK und KIT sowie HSP90- und HDAC-Inhibitoren sind potentielle, molekular zielgerichtete Therapeutika gegen BM.
4. Eine personalisierte Therapieplanung könnte zukünftig auf der Basis eines komplementierenden Einsatzes von NGS-basierter Profilierung und *in vitro* HTS erstellt werden.

5. Anhang

Gen-Panel nNGM v1

ALK (NM_004304.4): Exone 22, 23, 24 und 25; BRAF (NM_004333.4): Exone 11 und 15; CTNNB1 (NM_001904.3): Exon 3; EGFR (NM_005228.3): Exone 18, 19, 20 und 21; ERBB2 (NM_004448.2): 8, 19, und 20; FGFR1 (NM_023110.2): 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14 und 15; FGFR2 (Transkript A: NM_000141.4): Exone 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14 und 15, , Transkript B: (NM_022970.3): Exone 8, 9, 12 und 18; FGFR3 (NM_000142.4): Exone 3, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 16 und 18; FGFR4 (NM_213647.1): 3, 6, 9, 12, 13, 15 und 16; IDH1 (NM_005896.2): Exon 4; IDH2 (NM_002168.2): Exon 4; KRAS (NM_033360.2): Exone 2, 3 und 4; MAP2K1 (NM_002755.3): Exone 2 und 3; MET (NM_001127500.2): Exone 14, 16, 17, 18 und 19 sowie Intron 13 und die ersten 100 bp von Intron 14; NRAS (NM_002524.4): Exone 2, 3 und 4; PIK3CA (NM_006218.2): Exone 10 und 21; PTEN (NM_000314.4): Exone 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8; ROS1 (NM_002944.2): Exone 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 und 41; TP53 (NM_000546.5): Exone 4, 5, 6, 7, 8.

Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (ThermoFisher Scientific)

ABL1 (NM_005157.5): Exone 4-7, AKT1 (NM_001014431.1): Exone 3, 6; ALK (NM_004304.4): Exone 23, 25; APC (NM_000038.5): Exon 16; ATM (NM_000051.3): Exone 8, 9, 12, 17, 26, 34-36, 39, 50, 54-56, 59, 61, 63; BRAF (NM_004333.4): Exone 11, 15; CDH1 (NM_004360.4): Exone 3, 8, 9; CDKN2A (NM_001195132.1): Exon 2; CSF1R (NM_005211.3): Exone 7, 22; CTNNB1 (NM_001904.3): Exon 3; EGFR (NM_005228.4):

Exone 3, 7, 15, 18-21; ERBB2 (NM_004448.3): Exone 19-21; ERBB4 (NM_005235.2): Exone 3, 4, 6-9, 15, 23; EZH2 (NM_004456.4): Exon 16; FBXW7 (NM_033632.3): Exone 5, 8-11; FGFR1 (NM_001174067.1): Exone 5, 8; FGFR2 (NM_000141.4): Exone 7, 9, 12; FGFR3 (NM_000142.4): Exone 7, 9, 14, 16, 18; FLT3 (NM_004119.2): Exone 11, 14, 16, 20; GNA11 (NM_002067.4): Exon 5; GNAQ (NM_002072.4): Exon 5; GNAS (NM_000516.5): Exone 8-9; HNF1A (NM_000545.6): Exone 3-4; HRAS (NM_001130442.2): Exone 2-3; IDH1 (NM_005896.3): Exon 4; IDH2 (NM_002168.3): Exon 4; JAK2 (NM_004972.3): Exon 14; JAK3 (NM_000215.3): Exone 4, 13, 16; KDR (NM_002253.2): Exone 6, 7, 11, 19, 21, 26, 27, 30; KIT (NM_000222.2): Exone 2, 9-11, 13-15, 17, 18; KRAS (NM_033360.3): Exone 2-4; MET (NM_001127500.2): Exone 2, 11, 14, 16, 19; MLH1 (NM_000249.3): Exon 12; MPL (NM_005373.2): Exon 10; NOTCH1 (NM_017617.4): Exone 26, 27, 34; NPM1 (NM_002520.6): Exon 11; NRAS (NM_002524.4): Exone 2-4; PDGFRA (NM_006206.5): Exone 12, 14, 15, 18; PIK3CA (NM_006218.3): Exone 2, 5, 7, 8, 10, 14, 19, 21; PTEN (NM_000314.6): Exone 1, 3, 5-8; PTPN11 (NM_002834.4): Exone 3, 13; RB1 (NM_000321.2): Exone 4, 6, 10, 11, 14, 17, 18, 20-22; RET (NM_020975.4): Exone 10, 11, 13, 15, 16; SMAD4 (NM_005359.5): Exone 3-6, 8-12; SMARCB1 (NM_003073.4): Exone 2, 4, 5, 9; SMO (NM_005631.4): Exone 3, 5, 6, 9, 11; SRC (NM_198291.2): Exon 14; STK11 (NM_000455.4): Exone 1, 4, 6, 8; TP53 (NM_000546.5): Exone 2, 4-8, 10; VHL (NM_000551.3): Exone 1-3).

Wirkstoffe der Hochdurchsatztherapietestung

3,3-Diindolylmethane	Empagliflozin	Pemetrexed
3-DeazaneplanocinA	Enasidenib	Pemigatinib
5-Azacytidine	Encorafenib	Pentostatin
5-Fluorouracil	Entinostat	Perifosine
6-Mercaptopurine	Entrectinib	Pexidartinib
6-Thioguanine	Enzalutamide	PF4691502
Abarelix	Enzastaurin	Pipobroman
Abemaciclib	EpigallocatechinGallate	Pomalidomide
Abiraterone	Epirubicin	Ponatinib
Acalabrutinib	Erdafitinib	Pralatrexate
Afatinibdi	Eribulinmesylate	Prednisolone
Agerafenib	Erismodegib	Prednisone
Alectinib	Erlotinib	Procarbazine
Alisertib	Estramustinephosphatesodium	Pyrotinib
Alpelisib	Etoposide	Quizartinib

Altretamine	Everolimus	R406
Amifostine	Fedratinib	Radotinib
Amonafide	Floxuridine	Rapamycin
Amsacrine	Fludarabinephosphate	Ravoxertinib
Anacetrapib	Flutamide	Regorafenib
Anastrozole	Fosbretabulindisodium	Relugolix
Andrographolide	Fostamatinib	Retinoicacid
Apalutamide	Fulvestrant	Ribociclib
Apaziquone	Ganetespib	Rigosertibsodium
Aprepitant	GANT61	Ritonavir
Artesunate	Gefitinib	Romidepsin
Asciminib	Gemcitabine	Roxadustat
Atrasentan	Gilteritinib	Rucaparibphosphate
Auranofin	Glasdegib	Ruxolitinibphosphate
Avapritinib	GSK126	Sapanisertib
Axitinib	Homoharringtonine	Selinexor
BarasertibHQA	Hydroxyurea	Selpercatinib
Bardoxolonemethyl	Ibrutinib	Selumetinib
Baricitinibphosphate	Idarubicin	Semaxinib
Bazedoxifeneacetate	Idelalisib	Sertraline
Belinostat	Imatinibmesylate	SNS314
Bendamustine	Imiquimod	Sorafenibtosylate
Berberine	Ingenolmebutate	Staurosporine
Bestatin	Iniparib	Streptozocin
Betahistine	Irinotecan	Sunitinib
Bexarotene	Isoquercetin	TAK632
Bicalutamide	Isotretinoin	TAK715
Binimetinib	Itraconazole	Talazoparib
Birabresib	Ivosidenib	Tamoxifen
Bleomycinsulfate	Ixabepilone	Tanespimycin
Bortezomib	Ixazomib	Tariquidar
Bosutinib	Lapatinib	Tasquinimod
Brigatinib	Larotrectinibsulfate	Tazemetostat
Busulfan	Lenvatinib	Temozolomide
Cabazitaxel	Letrozole	Temsirolimus

CabozantinibSmalate	LGK974	Teniposide
Canertinib	Linifanib	Thalidomide
Capecitabine	Linsitinib	Thioridazine
Captopril	Lobaplatin	ThioTEPA
Carboplatin	Lomustine	Tipifarnib
Carfilzomib	Lonafarnib	Tipiracil
Carmustine	Lorlatinib	Tivantinib
Cediranib	LY3009120	Tivozanib
Celecoxib	Marimastat	Tofacitinibcitrate
Ceritinib	Masitinib	Topotecan
Chlorambucil	Megestrol	Trabectedin
Chlormethine	Melphalan	Trametinib
CI994	Methotrexate	Treosulfan
CiclosporinA	Midostaurin	Trifluorothymidine
Cisplatin	MitomycinC	TubastatinA
Cladribine	Mitoxantrone	Tucidinostat
Clofarabine	MK752	Ulixertinib
Cobimetinib	Molibresib	Uramustine
Copanlisib	Momelotinib	Valproicacidsodiumsalt
Crizotinib	Motesanibdiphosphate	Valrubicin
Cyclicsomatostatin	Mozavaptan	Vandetanib
Cytarabine	Nedaplatin	Varlitinib
Dabrafenibmesylate	Nelarabine	Vatalanib
Dacarbazine	Neratinib	Veliparib
Dacomitinib	Nilotinib	Vemurafenib
Dactinomycin	Nilutamide	Venetoclax
Dapagliflozin	Nimorazole	Verteporfin
Darolutamide	Nintedanib	Vinblastinesulfate
Dasatinib	Obatoclax	Vincristinesulfate
Daunorubicin	Olaparib	Vinfluninetartrate
Decitabine	Opaganib	Vinorelbine
Deforolimus	Orantinib	Vismodegib
Dexamethasone	Osimertinib	Volasertib
Dinaciclib	Oxaliplatin	Vorinostat
Disulfiram	Paclitaxel	WP1066

Docetaxel	Pacritinib	Zanubrutinib
Dovitinib	Palbociclib	Zibotentan
Doxorubicin	Palifosfamide	Zoledronicacid
Dutasteride	Pamiparib	Zosuquidartri
Duvelisib	Panobinostat	
Elesclomol	Pazopanib	

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Wirkstoffe der Hochdurchsatztherapietestung.

Diese Wirkstoffe wurden im Rahmen der Hochdurchsatztherapietestung als Bestandteil der bestehenden *Clinical Library* verwendet. Der Großteil dieser Wirkstoffe ist bereits für unterschiedliche Indikationen von der FDA zugelassen.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

- AHLUWALIA, M., BARNETT, G. H., DENG, D., TATTER, S. B., LAXTON, A. W., MOHAMMADI, A. M., LEUTHARDT, E., CHAMOUN, R., JUDY, K., ASHER, A., ESSIG, M., DIETRICH, J. & CHIANG, V. L. 2018. Laser ablation after stereotactic radiosurgery: a multicenter prospective study in patients with metastatic brain tumors and radiation necrosis. *J Neurosurg*, 130, 804-811.
- AHMED, K. A., BERGLUND, A. E., WELSH, E. A., NAGHAVI, A. O., KIM, Y., YU, M., ROBINSON, T. J., ESCHRICH, S. A., JOHNSTONE, P. A. S. & TORRES-ROCA, J. F. 2017. The radiosensitivity of brain metastases based upon primary histology utilizing a multigene index of tumor radiosensitivity. *Neuro Oncol*, 19, 1145-1146.
- AL-BATRAN, S. E., HOMANN, N., PAULIGK, C., GOETZE, T. O., MEILER, J., KASPER, S., KOPP, H. G., MAYER, F., HAAG, G. M., LULEY, K., LINDIG, U., SCHMIEGEL, W., POHL, M., STOEHLMACHER, J., FOLPRECHT, G., PROBST, S., PRASNIKAR, N., FISCHBACH, W., MAHLBERG, R., TROJAN, J., KOENIGSMANN, M., MARTENS, U. M., THUSS-PATIENCE, P., EGGER, M., BLOCK, A., HEINEMANN, V., ILLERHAUS, G., MOEHLER, M., SCHENK, M., KULLMANN, F., BEHRINGER, D. M., HEIKE, M., PINK, D., TESCHENDORF, C., LOHR, C., BERNHARD, H., SCHUCH, G., RETHWISCH, V., VON WEIKERSTHAL, L. F., HARTMANN, J. T., KNEBA, M., DAUM, S., SCHULMANN, K., WENIGER, J., BELLE, S., GAISER, T., ODUNCU, F. S., GUNTNER, M., HOZAEEL, W., REICHART, A., JAGER, E., KRAUS, T., MONIG, S., BECHSTEIN, W. O., SCHULER, M., SCHMALENBERG, H., HOFHEINZ, R. D. & INVESTIGATORS, F. A. 2019. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet*, 393, 1948-1957.
- ALBIGES, L., ANDRE, F., BALLEYGUIER, C., GOMEZ-ABUIN, G., CHOMPRET, A. & DELALOGUE, S. 2005. Spectrum of breast cancer metastasis in

- BRCA1 mutation carriers: highly increased incidence of brain metastases. *Ann Oncol*, 16, 1846-7.
- ANDERS, C. K., DEAL, A. M., MILLER, C. R., KHORRAM, C., MENG, H., BURROWS, E., LIVASY, C., FRITCHIE, K., EWEND, M. G., PEROU, C. M. & CAREY, L. A. 2011. The prognostic contribution of clinical breast cancer subtype, age, and race among patients with breast cancer brain metastases. *Cancer*, 117, 1602-11.
- ARDINI, E., MENICHINCHERI, M., BANFI, P., BOSOTTI, R., DE PONTI, C., PULCI, R., BALLINARI, D., CIOMEI, M., TEXIDO, G., DEGRASSI, A., AVANZI, N., AMBOLDI, N., SACCARDO, M. B., CASERO, D., ORSINI, P., BANDIERA, T., MOLOGNI, L., ANDERSON, D., WEI, G., HARRIS, J., VERNIER, J. M., LI, G., FELDER, E., DONATI, D., ISACCHI, A., PESENTI, E., MAGNAGHI, P. & GALVANI, A. 2016. Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor with Activity in Multiple Molecularly Defined Cancer Indications. *Mol Cancer Ther*, 15, 628-39.
- ARVANITIS, C. D., FERRARO, G. B. & JAIN, R. K. 2020. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*, 20, 26-41.
- BACHELOT, T., ROMIEU, G., CAMPONE, M., DIÉRAS, V., CROPET, C., DALENC, F., JIMENEZ, M., LE RHUN, E., PIERGA, J.-Y., GONÇALVES, A., LEHEURTEUR, M., DOMONT, J., GUTIERREZ, M., CURÉ, H., FERRERO, J.-M. & LABBE-DEVILLIERS, C. 2013. Lapatinib plus capecitabine in patients with previously untreated brain metastases from HER2-positive metastatic breast cancer (LANDSCAPE): a single-group phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 14, 64-71.
- BADIE, A., GAIDDON, C. & MELLITZER, G. 2022. Histone Deacetylase Functions in Gastric Cancer: Therapeutic Target? *Cancers (Basel)*, 14.
- BAHLEDA, R., MERIC-BERNSTAM, F., GOYAL, L., TRAN, B., HE, Y., YAMAMIYA, I., BENHADJI, K. A., MATOS, I. & ARKENAU, H. T. 2020. Phase I, first-in-human study of futibatinib, a highly selective, irreversible FGFR1-4 inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol*, 31, 1405-1412.
- BAILLEUX, C., EBERST, L. & BACHELOT, T. 2021. Treatment strategies for breast cancer brain metastases. *Br J Cancer*, 124, 142-155.
- BARKER, F. G., 2ND 2004. Craniotomy for the resection of metastatic brain tumors in the U.S., 1988-2000: decreasing mortality and the effect of provider caseload. *Cancer*, 100, 999-1007.
- BARNHOLTZ-SLOAN, J. S., SLOAN, A. E., DAVIS, F. G., VIGNEAU, F. D., LAI, P. & SAWAYA, R. E. 2004. Incidence Proportions of Brain Metastases in Patients Diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *Journal of Clinical Oncology*, 22, 2865-2872.
- BECCO, P., GALLO, S., POLETTI, S., FRASCIONE, M. P. M., CROTTO, L., ZACCAGNA, A., PARUZZO, L., CARAVELLI, D., CARNEVALE-SCHIANCA, F. & AGLIETTA, M. 2020. Melanoma Brain Metastases in the Era of Target Therapies: An Overview. *Cancers (Basel)*, 12.
- BEHJATI, S. & TARPEY, P. S. 2013. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 98, 236-8.
- BLAIR, H. A. 2019. Fedratinib: First Approval. *Drugs*, 79, 1719-1725.
- BOIRE, A., BRASTIANOS, P. K., GARZIA, L. & VALIENTE, M. 2020. Brain metastasis. *Nat Rev Cancer*, 20, 4-11.

- BRASTIANOS, P. K., CARTER, S. L., SANTAGATA, S., CAHILL, D. P., TAYLOR-WEINER, A., JONES, R. T., VAN ALLEN, E. M., LAWRENCE, M. S., HOROWITZ, P. M., CIBULSKIS, K., LIGON, K. L., TABERNERO, J., SEOANE, J., MARTINEZ-SAEZ, E., CURRY, W. T., DUNN, I. F., PAEK, S. H., PARK, S. H., MCKENNA, A., CHEVALIER, A., ROSENBERG, M., BARKER, F. G., 2ND, GILL, C. M., VAN HUMMELEN, P., THORNER, A. R., JOHNSON, B. E., HOANG, M. P., CHOUËIRI, T. K., SIGNORETTI, S., SOUGNEZ, C., RABIN, M. S., LIN, N. U., WINER, E. P., STEMMER-RACHAMIMOV, A., MEYERSON, M., GARRAWAY, L., GABRIEL, S., LANDER, E. S., BEROUKHIM, R., BATCHELOR, T. T., BASELGA, J., LOUIS, D. N., GETZ, G. & HAHN, W. C. 2015. Genomic Characterization of Brain Metastases Reveals Branched Evolution and Potential Therapeutic Targets. *Cancer Discov*, 5, 1164-1177.
- BRIA, E., CUPPONE, F., FORNIER, M., NISTICO, C., CARLINI, P., MILELLA, M., SPERDUTI, I., TERZOLI, E., COGNETTI, F. & GIANNARELLI, D. 2008. Cardiotoxicity and incidence of brain metastases after adjuvant trastuzumab for early breast cancer: the dark side of the moon? A meta-analysis of the randomized trials. *Breast Cancer Res Treat*, 109, 231-9.
- BROWN, P. D., GONDI, V., PUGH, S., TOME, W. A., WEFEL, J. S., ARMSTRONG, T. S., BOVI, J. A., ROBINSON, C., KONSKI, A., KHUNTIA, D., GROSSHANS, D., BENZINGER, T. L. S., BRUNER, D., GILBERT, M. R., ROBERGE, D., KUNDAPUR, V., DEVISSETTY, K., SHAH, S., USUKI, K., ANDERSON, B. M., STEA, B., YOON, H., LI, J., LAACK, N. N., KRUSER, T. J., CHMURA, S. J., SHI, W., DESHMUKH, S., MEHTA, M. P., KACHNIC, L. A. & FOR, N. R. G. O. 2020. Hippocampal Avoidance During Whole-Brain Radiotherapy Plus Memantine for Patients With Brain Metastases: Phase III Trial NRG Oncology CC001. *J Clin Oncol*, 38, 1019-1029.
- BROWN, P. D., PUGH, S., LAACK, N. N., WEFEL, J. S., KHUNTIA, D., MEYERS, C., CHOUCAIR, A., FOX, S., SUH, J. H., ROBERGE, D., KAVADI, V., BENTZEN, S. M., MEHTA, M. P., WATKINS-BRUNER, D. & RADIATION THERAPY ONCOLOGY, G. 2013. Memantine for the prevention of cognitive dysfunction in patients receiving whole-brain radiotherapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neuro Oncol*, 15, 1429-37.
- BRUNING-RICHARDSON, A., SHAW, G. C., TAMS, D., BREND, T., SANGANEE, H., BARRY, S. T., HAMM, G., GOODWIN, R. J. A., SWALES, J. G., KING, H., STEELE, L., MORTON, R., WIDYADARI, A., WARD, T. A., ESTEVES, F., BOISSINOT, M., MAVRIA, G., DROOP, A., LAWLER, S. E. & SHORT, S. C. 2021. GSK-3 Inhibition Is Cytotoxic in Glioma Stem Cells through Centrosome Destabilization and Enhances the Effect of Radiotherapy in Orthotopic Models. *Cancers (Basel)*, 13.
- CAGNEY, D. N., MARTIN, A. M., CATALANO, P. J., REDIG, A. J., LIN, N. U., LEE, E. Q., WEN, P. Y., DUNN, I. F., BI, W. L., WEISS, S. E., HAASKOGAN, D. A., ALEXANDER, B. M. & AIZER, A. A. 2017. Incidence and prognosis of patients with brain metastases at diagnosis of systemic malignancy: a population-based study. *Neuro Oncol*, 19, 1511-1521.
- CAIOLA, E., IEZZI, A., TOMANELLI, M., BONALDI, E., SCAGLIOTTI, A., COLOMBO, M., GUFFANTI, F., MICOTTI, E., GARASSINO, M. C., MINOLI, L., SCANZIANI, E., BROGGINI, M. & MARABESE, M. 2020.

- LKB1 Deficiency Renders NSCLC Cells Sensitive to ERK Inhibitors. *J Thorac Oncol*, 15, 360-370.
- CAMIDGE, D. R., KIM, H. R., AHN, M. J., YANG, J. C., HAN, J. Y., LEE, J. S., HOCHMAIR, M. J., LI, J. Y., CHANG, G. C., LEE, K. H., GRIDELLI, C., DELMONTE, A., GARCIA CAMPELO, R., KIM, D. W., BEARZ, A., GRIESINGER, F., MORABITO, A., FELIP, E., CALIFANO, R., GHOSH, S., SPIRA, A., GETTINGER, S. N., TISEO, M., GUPTA, N., HANEY, J., KERSTEIN, D. & POPAT, S. 2018. Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 379, 2027-2039.
- CAPPER, D., JONES, D. T. W., SILL, M., HOVESTADT, V., SCHRIMPF, D., STURM, D., KOELSCHE, C., SAHM, F., CHAVEZ, L., REUSS, D. E., KRATZ, A., WEFERS, A. K., HUANG, K., PAJTLER, K. W., SCHWEIZER, L., STICHEL, D., OLAR, A., ENGEL, N. W., LINDENBERG, K., HARTER, P. N., BRACZYNSKI, A. K., PLATE, K. H., DOHMEN, H., GARVALOV, B. K., CORAS, R., HOLSKEN, A., HEWER, E., BEWERUNGE-HUDLER, M., SCHICK, M., FISCHER, R., BESCHORNER, R., SCHITTENHELM, J., STASZEWSKI, O., WANI, K., VARLET, P., PAGES, M., TEMMING, P., LOHMANN, D., SELT, F., WITT, H., MILDE, T., WITT, O., ARONICA, E., GIANGASPERO, F., RUSHING, E., SCHEURLLEN, W., GEISENBERGER, C., RODRIGUEZ, F. J., BECKER, A., PREUSSER, M., HABERLER, C., BJERKVIG, R., CRYAN, J., FARRELL, M., DECKERT, M., HENCH, J., FRANK, S., SERRANO, J., KANNAN, K., TSIRIGOS, A., BRUCK, W., HOFER, S., BREHMER, S., SEIZ-ROSENHAGEN, M., HANGGI, D., HANS, V., ROZSNOKI, S., HANSFORD, J. R., KOHLHOF, P., KRISTENSEN, B. W., LECHNER, M., LOPES, B., MAWRIN, C., KETTER, R., KULOZIK, A., KHATIB, Z., HEPPNER, F., KOCH, A., JOUVET, A., KEOHANE, C., MUHLEISEN, H., MUELLER, W., POHL, U., PRINZ, M., BENNER, A., ZAPATKA, M., GOTTARDO, N. G., DRIEVER, P. H., KRAMM, C. M., MULLER, H. L., RUTKOWSKI, S., VON HOFF, K., FRUHWALD, M. C., GNEKOW, A., FLEISCHHACK, G., TIPPELT, S., CALAMINUS, G., MONORANU, C. M., PERRY, A., JONES, C., et al. 2018. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*, 555, 469-474.
- CASTANEDA, C. A., CASTILLO, M., BERNABE, L. A., SANCHEZ, J., CASAVILCA, S., GARCÍA-CORROCHANO, P., PONCE, J., VILLAROBLES, M. R., LOPEZ, C. B. & ORREGO, E. 2018. Impact of pathological features of brain metastases in prognosis. *Biomarkers in Medicine*, 12, 475-485.
- CERTO, F., STUMMER, W., FARAH, J. O., FREYSCHLAG, C., VISOCCHI, M., MORRONE, A., ALTIERI, R., TOCCACELI, G., PESCHILLO, S., THOME, C., JENKINSON, M. & BARBAGALLO, G. 2019. Supramarginal resection of glioblastoma: 5-ALA fluorescence, combined intraoperative strategies and correlation with survival. *J Neurosurg Sci*, 63, 625-632.
- CHAKRAVARTY, D., GAO, J., PHILLIPS, S. M., KUNDRA, R., ZHANG, H., WANG, J., RUDOLPH, J. E., YAEGER, R., SOUMERAI, T., NISSAN, M. H., CHANG, M. T., CHANDARLAPATY, S., TRAINA, T. A., PAIK, P. K., HO, A. L., HANTASH, F. M., GRUPE, A., BAXI, S. S., CALLAHAN, M. K., SNYDER, A., CHI, P., DANILA, D., GOUNDER, M., HARDING, J. J., HELLMANN, M. D., IYER, G., JANJIGIAN, Y., KALEY, T., LEVINE, D. A., LOWERY, M., OMURO, A., POSTOW, M. A., RATHKOPF, D.,

- SHOUSHTARI, A. N., SHUKLA, N., VOSS, M., PARAISO, E., ZEHIR, A., BERGER, M. F., TAYLOR, B. S., SALTZ, L. B., RIELY, G. J., LADANYI, M., HYMAN, D. M., BASELGA, J., SABBATINI, P., SOLIT, D. B. & SCHULTZ, N. 2017. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol*, 2017.
- CHAN, A., MOY, B., MANSI, J., EJLERTSEN, B., HOLMES, F. A., CHIA, S., IWATA, H., GNANT, M., LOIBL, S., BARRIOS, C. H., SOMALI, I., SMICHKOSKA, S., MARTINEZ, N., ALONSO, M. G., LINK, J. S., MAYER, I. A., COLD, S., MURILLO, S. M., SENEAL, F., INOUE, K., RUIZ-BORREGO, M., HUI, R., DENDULURI, N., PATT, D., RUGO, H. S., JOHNSTON, S. R. D., BRYCE, R., ZHANG, B., XU, F., WONG, A., MARTIN, M. & EXTE, N. E. T. S. G. 2021. Final Efficacy Results of Neratinib in HER2-positive Hormone Receptor-positive Early-stage Breast Cancer From the Phase III ExteNET Trial. *Clin Breast Cancer*, 21, 80-91 e7.
- CHEN, Y.-F. & FU, L.-W. 2011. Mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1, 197-207.
- CHRISTODOULOU, C., BAFALOUKOS, D., LINARDOU, H., ARAVANTINOS, G., BAMIAS, A., CARINA, M., KLOUVAS, G., SKARLOS, D. & HELLENIC COOPERATIVE ONCOLOGY, G. 2005. Temozolomide (TMZ) combined with cisplatin (CDDP) in patients with brain metastases from solid tumors: a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) Phase II study. *J Neurooncol*, 71, 61-5.
- CIFARELLI, C. P. & JACOBSON, G. M. 2021. Intraoperative Radiotherapy in Brain Malignancies: Indications and Outcomes in Primary and Metastatic Brain Tumors. *Front Oncol*, 11, 768168.
- CLARKE, M. F., DICK, J. E., DIRKS, P. B., EAVES, C. J., JAMIESON, C. H., JONES, D. L., VISVADER, J., WEISSMAN, I. L. & WAHL, G. M. 2006. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66, 9339-44.
- COUNSELL, C. E., COLLIE, D. A. & GRANT, R. 1996. Incidence of intracranial tumours in the Lothian region of Scotland, 1989-90. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 61, 143-50.
- CROKER, A. K., GOODALE, D., CHU, J., POSTENKA, C., HEDLEY, B. D., HESS, D. A. & ALLAN, A. L. 2009. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med*, 13, 2236-2252.
- DARYANANI, D., PLUKKER, J. T., DE JONG, M. A., HAAXMA-REICHE, H., NAP, R., KUIPER, H. & HOEKSTRA, H. J. 2005. Increased incidence of brain metastases in cutaneous head and neck melanoma. *Melanoma Res*, 15, 119-24.
- DAVIES, M. A., SAIAG, P., ROBERT, C., GROB, J.-J., FLAHERTY, K. T., ARANCE, A., CHIARION-SILENI, V., THOMAS, L., LESIMPLE, T., MORTIER, L., MOSCHOS, S. J., HOGG, D., MÁRQUEZ-RODAS, I., DEL VECCHIO, M., LEBBÉ, C., MEYER, N., ZHANG, Y., HUANG, Y., MOOKERJEE, B. & LONG, G. V. 2017. Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAFV600-mutant melanoma brain metastases (COMBI-MB): a multicentre, multicohort, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 18, 863-873.

- DELATTRE, J. Y., KROL, G., THALER, H. T. & POSNER, J. B. 1988. Distribution of brain metastases. *Arch Neurol*, 45, 741-4.
- DRILON, A., OXNARD, G. R., TAN, D. S. W., LOONG, H. H. F., JOHNSON, M., GAINOR, J., MCCOACH, C. E., GAUTSCHI, O., BESSE, B., CHO, B. C., PELED, N., WEISS, J., KIM, Y. J., OHE, Y., NISHIO, M., PARK, K., PATEL, J., SETO, T., SAKAMOTO, T., ROSEN, E., SHAH, M. H., BARLESI, F., CASSIER, P. A., BAZHENOVA, L., DE BRAUD, F., GARRALDA, E., VELCHETI, V., SATOUCHI, M., OHASHI, K., PENNELL, N. A., RECKAMP, K. L., DY, G. K., WOLF, J., SOLOMON, B., FALCHOOK, G., EBATA, K., NGUYEN, M., NAIR, B., ZHU, E. Y., YANG, L., HUANG, X., OLEK, E., ROTHENBERG, S. M., GOTO, K. & SUBBIAH, V. 2020a. Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 383, 813-824.
- DRILON, A., SIENA, S., DZIADZIUSZKO, R., BARLESI, F., KREBS, M. G., SHAW, A. T., DE BRAUD, F., ROLFO, C., AHN, M.-J., WOLF, J., SETO, T., CHO, B. C., PATEL, M. R., CHIU, C.-H., JOHN, T., GOTO, K., KARAPETIS, C. S., ARKENAU, H.-T., KIM, S.-W., OHE, Y., LI, Y.-C., CHAE, Y. K., CHUNG, C. H., OTTERSON, G. A., MURAKAMI, H., LIN, C.-C., TAN, D. S. W., PRENEN, H., RIEHL, T., CHOW-MANEVAL, E., SIMMONS, B., CUI, N., JOHNSON, A., ENG, S., WILSON, T. R. & DOEBELE, R. C. 2020b. Entrectinib in ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer: integrated analysis of three phase 1–2 trials. *The Lancet Oncology*, 21, 261-270.
- DRILON, A., SIENA, S., OU, S. I., PATEL, M., AHN, M. J., LEE, J., BAUER, T. M., FARAGO, A. F., WHELER, J. J., LIU, S. V., DOEBELE, R., GIANNETTA, L., CERIA, G., MARRAPESE, G., SCHIRRU, M., AMATU, A., BENCARDINO, K., PALMERI, L., SARTORE-BIANCHI, A., VANZULLI, A., CRESTA, S., DAMIAN, S., DUCA, M., ARDINI, E., LI, G., CHRISTIANSEN, J., KOWALSKI, K., JOHNSON, A. D., PATEL, R., LUO, D., CHOW-MANEVAL, E., HORNBY, Z., MULTANI, P. S., SHAW, A. T. & DE BRAUD, F. G. 2017. Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov*, 7, 400-409.
- DYE, N. B., GONDI, V. & MEHTA, M. P. 2015. Strategies for preservation of memory function in patients with brain metastases. *Chin Clin Oncol*, 4, 24.
- ERAMO, A., LOTTI, F., SETTE, G., PILOZZI, E., BIFFONI, M., DI VIRGILIO, A., CONTICELLO, C., RUCO, L., PESCHLE, C. & DE MARIA, R. 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, 15, 504-14.
- ESCHRICH, S. A., PRAMANA, J., ZHANG, H., ZHAO, H., BOULWARE, D., LEE, J. H., BLOOM, G., ROCHA-LIMA, C., KELLEY, S., CALVIN, D. P., YEATMAN, T. J., BEGG, A. C. & TORRES-ROCA, J. F. 2009. A gene expression model of intrinsic tumor radiosensitivity: prediction of response and prognosis after chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 75, 489-96.
- FABI, A., FELICI, A., METRO, G., MIRRI, A., BRIA, E., TELERA, S., MOSCETTI, L., RUSSILLO, M., LANZETTA, G., MANSUETO, G., PACE, A., MASCHIO, M., VIDIRI, A., SPERDUTI, I., COGNETTI, F. & CARAPPELLA, C. M. 2011. Brain metastases from solid tumors: disease outcome

- according to type of treatment and therapeutic resources of the treating center. *J Exp Clin Cancer Res*, 30, 10.
- FALLAHI-SICHANI, M., HONARNEJAD, S., HEISER, L. M., GRAY, J. W. & SORGER, P. K. 2013. Metrics other than potency reveal systematic variation in responses to cancer drugs. *Nat Chem Biol*, 9, 708-14.
- FELSBURG, J. & REIFENBERGER, G. 2000. Neuropathologie und molekulare Grundlagen von Metastasen im zentralen Nervensystem. *Der Onkologe*, 6, 919-929.
- FLAHERTY, K. R., WELLS, A. U., COTTIN, V., DEVARAJ, A., WALSH, S. L. F., INOUE, Y., RICHELDI, L., KOLB, M., TETZLAFF, K., STOWASSER, S., COECK, C., CLERISME-BEATY, E., ROSENSTOCK, B., QUARESMA, M., HAEUFEL, T., GOELDNER, R. G., SCHLENKER-HERCEG, R., BROWN, K. K. & INVESTIGATORS, I. T. 2019. Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *N Engl J Med*, 381, 1718-1727.
- FOLKMAN, J. & MOSCONA, A. 1978. Role of cell shape in growth control. *Nature*, 273, 345-9.
- FRIDMAN, R., BENTON, G., ARANOUTOVA, I., KLEINMAN, H. K. & BONFIL, R. D. 2012. Increased initiation and growth of tumor cell lines, cancer stem cells and biopsy material in mice using basement membrane matrix protein (Cultrex or Matrigel) co-injection. *Nat Protoc*, 7, 1138-44.
- GALLDIKS, N., LANGEN, K. J., ALBERT, N. L., CHAMBERLAIN, M., SOFFIETTI, R., KIM, M. M., LAW, I., LE RHUN, E., CHANG, S., SCHWARTING, J., COMBS, S. E., PREUSSER, M., FORSYTH, P., POPE, W., WELLER, M. & TONN, J. C. 2019. PET imaging in patients with brain metastasis-report of the RANO/PET group. *Neuro Oncol*, 21, 585-595.
- GASPAR, L., SCOTT, C., ROTMAN, M., ASBELL, S., PHILLIPS, T., WASSERMAN, T., MCKENNA, W. G. & BYHARDT, R. 1997. Recursive partitioning analysis (RPA) of prognostic factors in three radiation therapy oncology group (RTOG) brain metastases trials. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 37, 745-751.
- GILADI, M., MUNSTER, M., SCHNEIDERMAN, R. S., VOLOSHIN, T., PORAT, Y., BLAT, R., ZIELINSKA-CHOMEJ, K., HAAG, P., BOMZON, Z., KIRSON, E. D., WEINBERG, U., VIKTORSSON, K., LEWENSOHN, R. & PALTI, Y. 2017. Tumor treating fields (TTFields) delay DNA damage repair following radiation treatment of glioma cells. *Radiat Oncol*, 12, 206.
- GIORDANA, M. T., CORDERA, S. & BOGHI, A. 2000. Cerebral metastases as first symptom of cancer: a clinico-pathologic study. *J Neurooncol*, 50, 265-73.
- GOLDBERG, I. 2024. METIS Phase 3 Clinical Trial Met Primary Endpoint, Demonstrating a Statistically Significant Extension in Time to Intracranial Progression for Patients with Brain Metastases from Non-Small Cell Lung Cancer. Novocure Website.
- GOLDBERG, S. B., GETTINGER, S. N., MAHAJAN, A., CHIANG, A. C., HERBST, R. S., SZNOL, M., TSIOURIS, A. J., COHEN, J., VORTMEYER, A., JILAVEANU, L., YU, J., HEGDE, U., SPEAKER, S., MADURA, M., RALABATE, A., RIVERA, A., ROWEN, E., GERRISH, H., YAO, X., CHIANG, V. & KLUGER, H. M. 2016. Pembrolizumab for patients with melanoma or non-small-cell lung cancer and untreated brain metastases:

- early analysis of a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 17, 976-983.
- GONCALVES, P. H., PETERSON, S. L., VIGNEAU, F. D., SHORE, R. D., QUARSHIE, W. O., ISLAM, K., SCHWARTZ, A. G., WOZNIAK, A. J. & GADGEEL, S. M. 2016. Risk of brain metastases in patients with nonmetastatic lung cancer: Analysis of the Metropolitan Detroit Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) data. *Cancer*, 122, 1921-7.
- GONG, L., WANG, Q. I., ZHAO, L., YUAN, Z., LI, R. & WANG, P. 2013. Factors affecting the risk of brain metastasis in small cell lung cancer with surgery: is prophylactic cranial irradiation necessary for stage I-III disease? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 85, 196-200.
- GRANT, C. E., FLIS, A. L. & RYAN, B. M. 2022. Understanding the role of dopamine in cancer: past, present and future. *Carcinogenesis*, 43, 517-527.
- GRIESINGER, F., EBERHARDT, W., NUSCH, A., REISER, M., ZAHN, M. O., MAINTZ, C., BERNHARDT, C., LOSEM, C., STENZINGER, A., HEUKAMP, L. C., BUTTNER, R., MARSCHNER, N., JANICKE, M., FLEITZ, A., SPRING, L., SAHLMANN, J., KARATAS, A., HIPPER, A., WEICHERT, W., HEILMANN, M., SADJADIAN, P., GLEIBER, W., GRAH, C., WALLER, C. F., RECK, M., RITTMAYER, A., CHRISTOPOULOS, P., SEBASTIAN, M., THOMAS, M. & GROUP, C. R. 2021. Biomarker testing in non-small cell lung cancer in routine care: Analysis of the first 3,717 patients in the German prospective, observational, nation-wide CRISP Registry (AIO-TRK-0315). *Lung Cancer*, 152, 174-184.
- GUTZMER, R., VORDERMARK, D., HASSEL, J. C., KREX, D., WENDL, C., SCHADENDORF, D., SICKMANN, T., RIEKEN, S., PUKROP, T., HOLLER, C., EIGENTLER, T. K. & MEIER, F. 2020. Melanoma brain metastases - Interdisciplinary management recommendations 2020. *Cancer Treat Rev*, 89, 102083.
- HUGHES, R. T., MASTERS, A. H., MCTYRE, E. R., FARRIS, M. K., CHUNG, C., PAGE, B. R., KLEINBERG, L. R., HEPEL, J., CONTESSA, J. N., CHIANG, V., RUIZ, J., WATABE, K., SU, J., FIVEASH, J. B., BRAUNSTEIN, S., CHAO, S., ATTIA, A., AYALA-PEACOCK, D. N. & CHAN, M. D. 2019. Initial SRS for Patients With 5 to 15 Brain Metastases: Results of a Multi-Institutional Experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 104, 1091-1098.
- IMBER, B. S., SEHGAL, R., SAGANTY, R., REINER, A. S., ILICA, A. T., MIAO, E., LI, B. T., RIELY, G. J., YU, H. A., PANAGEAS, K. S., YOUNG, R. J., PIKE, L. R. G. & MOSS, N. S. 2023. Intracranial Outcomes of De Novo Brain Metastases Treated With Osimertinib Alone in Patients With Newly Diagnosed EGFR-Mutant NSCLC. *JTO Clin Res Rep*, 4, 100607.
- ISAACS, J. S., JUNG, Y. J., MIMNAUGH, E. G., MARTINEZ, A., CUTTITTA, F. & NECKERS, L. M. 2002. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem*, 277, 29936-44.
- JEISING, S., GEERLING, G., GUTHOFF, R., HANGGI, D., SABEL, M., RAPP, M. & NICKEL, A. C. 2022. In-Vitro Use of Verteporfin for Photodynamic Therapy in Glioblastoma. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 40, 103049.
- JEISING, S., NICKEL, A. C., TRUBEL, J., FELSBERG, J., PICARD, D., LEPRIVIER, G., WOLTER, M., HUYNH, M. K., OLIVERA, M. B.,

- KAULICH, K., HABERLE, L., ESPOSITO, I., KLAU, G. W., STEINMANN, J., BEEZ, T., RAPP, M., SABEL, M., DIETRICH, S., REMKE, M., CORNELIUS, J. F., REIFENBERGER, G. & QIN, N. 2024. A clinically compatible in vitro drug-screening platform identifies therapeutic vulnerabilities in primary cultures of brain metastases. *J Neurooncol*, 169, 613-623.
- JEON, J. Y., CHOI, J. W., ROH, H. G. & MOON, W. J. 2014. Effect of imaging time in the magnetic resonance detection of intracerebral metastases using single dose gadobutrol. *Korean J Radiol*, 15, 145-50.
- JIANG, K., PARKER, M., MATER, J., AZAD, T. D., KAMSON, D. O., KLEINBERG, L., YE, X., RINCON-TORROELLA, J. & BETTEGOWDA, C. 2023. Epidemiology and survival outcomes of synchronous and metachronous brain metastases: a retrospective population-based study. *Neurosurg Focus*, 55, E3.
- JOSHI, R. S., HIRSHMAN, B. R., ALI, M. A., ALATTAR, A., CARROLL, K., NAGANO, O., AIYAMA, H., SERIZAWA, T., YAMAMOTO, M. & CHEN, C. C. 2019. Prognostic Importance of Cumulative Intracranial Tumor Volume in Patients with Gastrointestinal Brain Metastasis Treated with Stereotactic Radiosurgery. *World Neurosurg*, 121, e747-e754.
- JUAN, L. J., SHIA, W. J., CHEN, M. H., YANG, W. M., SETO, E., LIN, Y. S. & WU, C. W. 2000. Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J Biol Chem*, 275, 20436-43.
- KAGE, H. 2021. *Multidisciplinary tumour board: poor concordance for tumours with low levels of evidence* [Online]. ESMO Congress 2021. Available: <https://dailyreporter.esmo.org/esmo-congress-2021/no-title/multidisciplinary-tumour-board-poor-concordance-for-tumours-with-low-levels-of-evidence> [Accessed 20.11.2022].
- KAMP, M. A., DIBUE, M., NIEMANN, L., REICHELT, D. C., FELSBURG, J., STEIGER, H. J., SZELENYI, A., RAPP, M. & SABEL, M. 2012. Proof of principle: supramarginal resection of cerebral metastases in eloquent brain areas. *Acta Neurochir (Wien)*, 154, 1981-6.
- KAMP, M. A., DIBUE-ADJEI, M., CORNELIUS, J. F., SLOTTY, P. J., STEIGER, H. J., AHMADI, S. A., RAPP, M. & SABEL, M. 2019. Is it all a matter of size? Impact of maximization of surgical resection in cerebral tumors. *Neurosurg Rev*, 42, 835-842.
- KAMP, M. A., FISCHER, I., BUHNER, J., TUROWSKI, B., CORNELIUS, J. F., STEIGER, H. J., RAPP, M., SLOTTY, P. J. & SABEL, M. 2016. 5-ALA fluorescence of cerebral metastases and its impact for the local-in-brain progression. *Oncotarget*, 7, 66776-66789.
- KAMP, M. A., RAPP, M., BUHNER, J., SLOTTY, P. J., REICHELT, D., SADAT, H., DIBUE-ADJEI, M., STEIGER, H. J., TUROWSKI, B. & SABEL, M. 2015. Early postoperative magnet resonance tomography after resection of cerebral metastases. *Acta Neurochir (Wien)*, 157, 1573-80.
- KARANAM, N. K., DING, L., AROUMOGAME, A. & STORY, M. D. 2020. Tumor treating fields cause replication stress and interfere with DNA replication fork maintenance: Implications for cancer therapy. *Transl Res*, 217, 33-46.
- KARANAM, N. K., SRINIVASAN, K., DING, L., SISHC, B., SAHA, D. & STORY, M. D. 2017. Tumor-treating fields elicit a conditional vulnerability to ionizing radiation via the downregulation of BRCA1 signaling and reduced

- DNA double-strand break repair capacity in non-small cell lung cancer cell lines. *Cell Death Dis*, 8, e2711.
- KAYAMA, T., SATO, S., SAKURADA, K., MIZUSAWA, J., NISHIKAWA, R., NARITA, Y., SUMI, M., MIYAKITA, Y., KUMABE, T., SONODA, Y., ARAKAWA, Y., MIYAMOTO, S., BEPPU, T., SUGIYAMA, K., NAKAMURA, H., NAGANE, M., NAKASU, Y., HASHIMOTO, N., TERASAKI, M., MATSUMURA, A., ISHIKAWA, E., WAKABAYASHI, T., IWADATE, Y., OHUE, S., KOBAYASHI, H., KINOSHITA, M., ASANO, K., MUKASA, A., TANAKA, K., ASAI, A., NAKAMURA, H., ABE, T., MURAGAKI, Y., IWASAKI, K., AOKI, T., WATANABE, T., SASAKI, H., IZUMOTO, S., MIZOGUCHI, M., MATSUO, T., TAKESHIMA, H., HAYASHI, M., JOKURA, H., MIZOWAKI, T., SHIMIZU, E., SHIRATO, H., TAGO, M., KATAYAMA, H., FUKUDA, H., SHIBUI, S. & JAPAN CLINICAL ONCOLOGY, G. 2018. Effects of Surgery With Salvage Stereotactic Radiosurgery Versus Surgery With Whole-Brain Radiation Therapy in Patients With One to Four Brain Metastases (JCOG0504): A Phase III, Noninferiority, Randomized Controlled Trial. *J Clin Oncol*, JCO2018786186.
- KIRSON, E. D., DBALY, V., TOVARYS, F., VYMAZAL, J., SOUSTIEL, J. F., ITZHAKI, A., MORDECHOVICH, D., STEINBERG-SHAPIRA, S., GURVICH, Z., SCHNEIDERMAN, R., WASSERMAN, Y., SALZBERG, M., RYFFEL, B., GOLDSHER, D., DEKEL, E. & PALT, Y. 2007. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 10152-7.
- KIRSON, E. D., GILADI, M., GURVICH, Z., ITZHAKI, A., MORDECHOVICH, D., SCHNEIDERMAN, R. S., WASSERMAN, Y., RYFFEL, B., GOLDSHER, D. & PALT, Y. 2009. Alternating electric fields (TTFields) inhibit metastatic spread of solid tumors to the lungs. *Clin Exp Metastasis*, 26, 633-40.
- KLEMM, F., MAAS, R. R., BOWMAN, R. L., KORNETE, M., SOUKUP, K., NASSIRI, S., BROULAND, J. P., IACOBUZIO-DONAHUE, C. A., BRENNAN, C., TABAR, V., GUTIN, P. H., DANIEL, R. T., HEGI, M. E. & JOYCE, J. A. 2020. Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells. *Cell*, 181, 1643-1660 e17.
- KOVALCHUK, B., BERGHOF, A. S., KARREMAN, M. A., FREY, K., PIECHUTTA, M., FISCHER, M., GROSCH, J., HEILAND, S., BRECKWOLDT, M. O., HILBERG, F., WICK, W. & WINKLER, F. 2020. Nintedanib and a bi-specific anti-VEGF/Ang2 nanobody selectively prevent brain metastases of lung adenocarcinoma cells. *Clin Exp Metastasis*, 37, 637-648.
- KROP, I. E., LIN, N. U., BLACKWELL, K., GUARDINO, E., HUOBER, J., LU, M., MILES, D., SAMANT, M., WELSLAU, M. & DIERAS, V. 2015. Trastuzumab emtansine (T-DM1) versus lapatinib plus capecitabine in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and central nervous system metastases: a retrospective, exploratory analysis in EMILIA. *Ann Oncol*, 26, 113-119.
- KURZ, H., SANDAU, K. & CHRIST, B. 1997. On the bifurcation of blood vessels--Wilhelm Roux's doctoral thesis (Jena 1878)--a seminal work for biophysical modelling in developmental biology. *Ann Anat*, 179, 33-6.

- LACOUTURE, M. E., DAVIS, M. E., ELZINGA, G., BUTOWSKI, N., TRAN, D., VILLANO, J. L., DIMEGLIO, L., DAVIES, A. M. & WONG, E. T. 2014. Characterization and management of dermatologic adverse events with the NovoTTF-100A System, a novel anti-mitotic electric field device for the treatment of recurrent glioblastoma. *Semin Oncol*, 41 Suppl 4, S1-14.
- LADERIAN, B., MUNDI, P., FOJO, T. & S, E. B. 2020. Emerging Therapeutic Implications of STK11 Mutation: Case Series. *Oncologist*, 25, 733-737.
- LAMB, Y. N. 2022. Pacritinib: First Approval. *Drugs*, 82, 831-838.
- LAMBA, N., CATALANO, P. J., CAGNEY, D. N., HAAS-KOGAN, D. A., BUBRICK, E. J., WEN, P. Y. & AIZER, A. A. 2021a. Seizures Among Patients with Brain Metastases: A Population- and Institutional-level Analysis. *Neurology*.
- LAMBA, N., WEN, P. Y. & AIZER, A. A. 2021b. Epidemiology of brain metastases and leptomeningeal disease. *Neuro Oncol*, 23, 1447-1456.
- LANDRUM, M. J., CHITIPIRALLA, S., BROWN, G. R., CHEN, C., GU, B., HART, J., HOFFMAN, D., JANG, W., KAUR, K., LIU, C., LYOSHIN, V., MADDIPATLA, Z., MAITI, R., MITCHELL, J., O'LEARY, N., RILEY, G. R., SHI, W., ZHOU, G., SCHNEIDER, V., MAGLOTT, D., HOLMES, J. B. & KATTMAN, B. L. 2020. ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic Acids Res*, 48, D835-D844.
- LAZARIDIS, L., SCHMIDT, T., OSTER, C., BLAU, T., PIERSCIANEK, D., SIVEKE, J. T., BAUER, S., SCHILDHAUS, H. U., SURE, U., KEYVANI, K., KLEINSCHNITZ, C., STUSCHKE, M., HERRMANN, K., DEUSCHL, C., SCHEFFLER, B., KEBIR, S. & GLAS, M. 2022. Precision neuro-oncology: a pilot analysis of personalized treatment in recurrent glioma. *J Cancer Res Clin Oncol*.
- LE RHUN, E., GUCKENBERGER, M., SMITS, M., DUMMER, R., BACHELOT, T., SAHM, F., GALLDIKS, N., DE AZAMBUJA, E., BERGHOFF, A. S., METELLUS, P., PETERS, S., HONG, Y. K., WINKLER, F., SCHADENDORF, D., VAN DEN BENT, M., SEOANE, J., STAHEL, R., MINNITI, G., WESSELING, P., WELLER, M., PREUSSER, M., BOARD, E. E. & CLINICALGUIDELINES@ESMO.ORG, E. G. C. E. A. 2021. EANO-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of patients with brain metastasis from solid tumours. *Ann Oncol*, 32, 1332-1347.
- LEE, H. W., LEE, J. I., LEE, S. J., CHO, H. J., SONG, H. J., JEONG, D. E., SEO, Y. J., SHIN, S., JOUNG, J. G., KWON, Y. J., CHOI, Y. L., PARK, W. Y., LEE, H. M., SEOL, H. J., SHIM, Y. M., JOO, K. M. & NAM, D. H. 2015. Patient-derived xenografts from non-small cell lung cancer brain metastases are valuable translational platforms for the development of personalized targeted therapy. *Clin Cancer Res*, 21, 1172-82.
- LEE, J., KOTLIAROVA, S., KOTLIAROV, Y., LI, A., SU, Q., DONIN, N. M., PASTORINO, S., PUROW, B. W., CHRISTOPHER, N., ZHANG, W., PARK, J. K. & FINE, H. A. 2006. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9, 391-403.
- LIN, N. U., GELMAN, R. S., YOUNGER, W. J., SOHL, J., FREEDMAN, R. A., SORENSEN, A. G., BULLITT, E., HARRIS, G. J., MORGANSTERN, D., SCHNEIDER, B. P., KROP, I. E. & WINER, E. P. 2013a. Phase II trial of

- carboplatin (C) and bevacizumab (BEV) in patients (pts) with breast cancer brain metastases (BCBM). *Journal of Clinical Oncology*, 31, 513-513.
- LIN, N. U., WEFEL, J. S., LEE, E. Q., SCHIFF, D., VAN DEN BENT, M. J., SOFFIETTI, R., SUH, J. H., VOGELBAUM, M. A., MEHTA, M. P., DANCEY, J., LINSKEY, M. E., CAMIDGE, D. R., AOYAMA, H., BROWN, P. D., CHANG, S. M., KALKANIS, S. N., BARANI, I. J., BAUMERT, B. G., GASPAR, L. E., HODI, F. S., MACDONALD, D. R., WEN, P. Y. & RESPONSE ASSESSMENT IN NEURO-ONCOLOGY, G. 2013b. Challenges relating to solid tumour brain metastases in clinical trials, part 2: neurocognitive, neurological, and quality-of-life outcomes. A report from the RANO group. *Lancet Oncol*, 14, e407-16.
- LIU-CHITTENDEN, Y., HUANG, B., SHIM, J. S., CHEN, Q., LEE, S. J., ANDERS, R. A., LIU, J. O. & PAN, D. 2012. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev*, 26, 1300-5.
- LONG, G. V., ATKINSON, V., LO, S., SANDHU, S., GUMINSKI, A. D., BROWN, M. P., WILMOTT, J. S., EDWARDS, J., GONZALEZ, M., SCOLYER, R. A., MENZIES, A. M. & MCARTHUR, G. A. 2018. Combination nivolumab and ipilimumab or nivolumab alone in melanoma brain metastases: a multicentre randomised phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 19, 672-681.
- MAMDANI, H. & JALAL, S. I. 2020. Histone Deacetylase Inhibition in Non-small Cell Lung Cancer: Hype or Hope? *Front Cell Dev Biol*, 8, 582370.
- MANSOURI, A., HACHEM, L. D., MANSOURI, S., NASSIRI, F., LAPERRIERE, N. J., XIA, D., LINDEMAN, N. I., WEN, P. Y., CHAKRAVARTI, A., MEHTA, M. P., HEGI, M. E., STUPP, R., ALDAPE, K. D. & ZADEH, G. 2019. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro Oncol*, 21, 167-178.
- MAO, X. G., ZHANG, X., XUE, X. Y., GUO, G., WANG, P., ZHANG, W., FEI, Z., ZHEN, H. N., YOU, S. W. & YANG, H. 2009. Brain Tumor Stem-Like Cells Identified by Neural Stem Cell Marker CD15. *Transl Oncol*, 2, 247-57.
- MARQUARDT, V., THERUVATH, J., PAUCK, D., PICARD, D., QIN, N., BLUMEL, L., MAUE, M., BARTL, J., AHMADOV, U., LANGINI, M., MEYER, F. D., COLE, A., CRUZ-CRUZ, J., GRAEF, C. M., WOLFL, M., MILDE, T., WITT, O., ERDREICH-EPSTEIN, A., LEPRIVIER, G., KAHLERT, U., STEFANSKI, A., STUHLER, K., KEIR, S. T., BIGNER, D. D., HAUER, J., BEEZ, T., KNOBBE-THOMSEN, C. B., FISCHER, U., FELSBERG, J., HANSEN, F. K., VIBHAKAR, R., VENKATRAMAN, S., CHESHIER, S. H., REIFENBERGER, G., BORKHARDT, A., KURZ, T., REMKE, M. & MITRA, S. 2023. Tacedinaline (CI-994), a class I HDAC inhibitor, targets intrinsic tumor growth and leptomeningeal dissemination in MYC-driven medulloblastoma while making them susceptible to anti-CD47-induced macrophage phagocytosis via NF-kB-TGM2 driven tumor inflammation. *J Immunother Cancer*, 11.
- MARTIN, M., HOLMES, F. A., EJLERTSEN, B., DELALOGUE, S., MOY, B., IWATA, H., VON MINCKWITZ, G., CHIA, S. K. L., MANSI, J., BARRIOS, C. H., GNANT, M., TOMASEVIC, Z., DENDULURI, N., SEPAROVIC, R., GOKMEN, E., BASHFORD, A., RUIZ BORREGO, M., KIM, S. B.,

- JAKOBSEN, E. H., CICENIENE, A., INOUE, K., OVERKAMP, F., HEIJNS, J. B., ARMSTRONG, A. C., LINK, J. S., JOY, A. A., BRYCE, R., WONG, A., MORAN, S., YAO, B., XU, F., AUERBACH, A., BUYSE, M., CHAN, A. & EXTE, N. E. T. S. G. 2017. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in HER2-positive breast cancer (ExteNET): 5-year analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 18, 1688-1700.
- MASOUD, G. N. & LI, W. 2015. HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*, 5, 378-89.
- MAVRAKIS, A. N., HALPERN, E. F., BARKER, F. G., 2ND, GONZALEZ, R. G. & HENSON, J. W. 2005. Diagnostic evaluation of patients with a brain mass as the presenting manifestation of cancer. *Neurology*, 65, 908-11.
- MILLER, K. D., NOGUEIRA, L., DEVASIA, T., MARIOTTO, A. B., YABROFF, K. R., JEMAL, A., KRAMER, J. & SIEGEL, R. L. 2022. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*, 72, 409-436.
- MINNITI, G., SCARINGI, C., PAOLINI, S., LANZETTA, G., ROMANO, A., CICONE, F., OSTI, M., ENRICI, R. M. & ESPOSITO, V. 2016. Single-Fraction Versus Multifraction (3 x 9 Gy) Stereotactic Radiosurgery for Large (>2 cm) Brain Metastases: A Comparative Analysis of Local Control and Risk of Radiation-Induced Brain Necrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 95, 1142-8.
- MITRA, A., MISHRA, L. & LI, S. 2013. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends Biotechnol*, 31, 347-54.
- MOGRABI, B., HEEKE, S. & HOFMAN, P. 2021. The Importance of STK11/LKB1 Assessment in Non-Small Cell Lung Carcinomas. *Diagnostics (Basel)*, 11.
- MORIKAWA, A., LI, J., ULINTZ, P., CHENG, X., APFEL, A., ROBINSON, D., HOPKINS, A., KUMAR-SINHA, C., WU, Y. M., SERHAN, H., VERBAL, K., THOMAS, D., HAYES, D. F., CHINNAIYAN, A. M., BALADANDAYUTHAPANI, V., HETH, J., SOELLNER, M. B., MERAJVER, S. D. & MERRILL, N. 2023. Optimizing Precision Medicine for Breast Cancer Brain Metastases with Functional Drug Response Assessment. *Cancer Res Commun*, 3, 1093-1103.
- MULLALLY, A., HOOD, J., HARRISON, C. & MESA, R. 2020. Fedratinib in myelofibrosis. *Blood Adv*, 4, 1792-1800.
- MULVENNA, P., NANKIVELL, M., BARTON, R., FAIVRE-FINN, C., WILSON, P., MCCOLL, E., MOORE, B., BRISBANE, I., ARDRON, D., HOLT, T., MORGAN, S., LEE, C., WAITE, K., BAYMAN, N., PUGH, C., SYDES, B., STEPHENS, R., PARMAR, M. K. & LANGLEY, R. E. 2016. Dexamethasone and supportive care with or without whole brain radiotherapy in treating patients with non-small cell lung cancer with brain metastases unsuitable for resection or stereotactic radiotherapy (QUARTZ): results from a phase 3, non-inferiority, randomised trial. *The Lancet*, 388, 2004-2014.
- MUN, E. J., BABIKER, H. M., WEINBERG, U., KIRSON, E. D. & VON HOFF, D. D. 2018. Tumor-Treating Fields: A Fourth Modality in Cancer Treatment. *Clin Cancer Res*, 24, 266-275.
- NADAL, E., RODRIGUEZ-ABREU, D., MASSUTI, B., JUAN-VIDAL, O., HUIDOBRO VENCE, G., LOPEZ, R., DE CASTRO CARPEÑO, J., ESTIVAL, A., CAMPELO, R. G., SULLIVAN, I., FELIP, E., BLASCO, A.,

- GUIRADO, M., VILARINO, N., SIMO, M., SANAHUJA, M., HERNANDEZ, A., NAVARRO, V. & BRUNA, J. 2022. Updated analysis from the ATEZO-BRAIN trial: Atezolizumab plus carboplatin and pemetrexed in patients with advanced nonsquamous non-small cell lung cancer with untreated brain metastases. *Journal of Clinical Oncology*, 40, 9010-9010.
- NAYAK, L., LEE, E. Q. & WEN, P. Y. 2012. Epidemiology of brain metastases. *Curr Oncol Rep*, 14, 48-54.
- NECKERS, L. & WORKMAN, P. 2012. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin Cancer Res*, 18, 64-76.
- NICKEL, A. C., PICARD, D., QIN, N., WOLTER, M., KAULICH, K., HEWERA, M., PAUCK, D., MARQUARDT, V., TORGA, G., MUHAMMAD, S., ZHANG, W., SCHNELL, O., STEIGER, H. J., HANGGI, D., FRITSCH, E., HER, N. G., NAM, D. H., CARRO, M. S., REMKE, M., REIFENBERGER, G. & KAHLERT, U. D. 2021. Longitudinal stability of molecular alterations and drug response profiles in tumor spheroid cell lines enables reproducible analyses. *Biomed Pharmacother*, 144, 112278.
- NOLTE, S. M., VENUGOPAL, C., MCFARLANE, N., MOROZOVA, O., HALLETT, R. M., O'FARRELL, E., MANORANJAN, B., MURTY, N. K., KLURFAN, P., KACHUR, E., PROVIAS, J. P., FARROKHAYAR, F., HASSELL, J. A., MARRA, M. & SINGH, S. K. 2013. A cancer stem cell model for studying brain metastases from primary lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 105, 551-62.
- NUSSBAUM, E. S., DJALILIAN, H. R., CHO, K. H. & HALL, W. A. 1996. Brain metastases. Histology, multiplicity, surgery, and survival. *Cancer*, 78, 1781-8.
- O'BRIEN, C. A., POLLETT, A., GALLINGER, S. & DICK, J. E. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445, 106-10.
- OSTROM, Q. T., WRIGHT, C. H. & BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. 2018. Brain metastases: epidemiology. *Handb Clin Neurol*, 149, 27-42.
- PACINI, L., JENKS, A. D., LIMA, N. C. & HUANG, P. H. 2021. Targeting the Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Family in Lung Cancer. *Cells*, 10.
- PARK, H. S., LLOYD, S., DECKER, R. H., WILSON, L. D. & YU, J. B. 2012. Overview of the Surveillance, Epidemiology, and End Results database: evolution, data variables, and quality assurance. *Curr Probl Cancer*, 36, 183-90.
- PATCHELL, R. A., TIBBS, P. A., REGINE, W. F., DEMPSEY, R. J., MOHIUDDIN, M., KRYSCIO, R. J., MARKESBERY, W. R., FOON, K. A. & YOUNG, B. 1998. Postoperative radiotherapy in the treatment of single metastases to the brain: a randomized trial. *JAMA*, 280, 1485-9.
- PATCHELL, R. A., TIBBS, P. A., WALSH, J. W., DEMPSEY, R. J., MARUYAMA, Y., KRYSCIO, R. J., MARKESBERY, W. R., MACDONALD, J. S. & YOUNG, B. 1990. A randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain. *N Engl J Med*, 322, 494-500.
- PATEL, A. J., SUKI, D., HATIBOGLU, M. A., RAO, V. Y., FOX, B. D. & SAWAYA, R. 2015. Impact of surgical methodology on the complication rate and functional outcome of patients with a single brain metastasis. *J Neurosurg*, 122, 1132-43.

- PATIL, T., SMITH, D. E., BUNN, P. A., AISNER, D. L., LE, A. T., HANCOCK, M., PURCELL, W. T., BOWLES, D. W., CAMIDGE, D. R. & DOEBELE, R. C. 2018. The Incidence of Brain Metastases in Stage IV ROS1-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer and Rate of Central Nervous System Progression on Crizotinib. *J Thorac Oncol*, 13, 1717-1726.
- PAZ-ARES, L., DVORKIN, M., CHEN, Y., REINMUTH, N., HOTTA, K., TRUKHIN, D., STATSENKO, G., HOCHMAIR, M. J., ÖZGÜROĞLU, M., JI, J. H., VOITKO, O., POLTORATSKIY, A., PONCE, S., VERDERAME, F., HAVEL, L., BONDARENKO, I., KAZARNOWICZ, A., LOSONCZY, G., CONEV, N. V., ARMSTRONG, J., BYRNE, N., SHIRE, N., JIANG, H., GOLDMAN, J. W., BATAGELJ, E., CASARINI, I., PASTOR, A. V., SENA, S. N., ZARBA, J. J., BURGHUBER, O., HARTL, S., HOCHMAIR, M. J., LAMPRECHT, B., STUDNICKA, M., ALBERTO SCHLITTLER, L., AUGUSTO MARTINELLI DE OLIVEIRA, F., CALABRICH, A., COLAGIOVANNI GIROTTO, G., DOS REIS, P., FAUSTO NINO GORINI, C., RAFAEL MARTINS DE MARCHI, P., SERODIO DA ROCHA BALDOTTO, C., SETTE, C., ZUKIN, M., CONEV, N. V., DUDOV, A., ILIEVA, R., KOYNOV, K., KRASTEVA, R., TONEV, I., VALEV, S., VENKOVA, V., BI, M., CHEN, C., CHEN, Y., CHEN, Z., FANG, J., FENG, J., HAN, Z., HU, J., HU, Y., LI, W., LIANG, Z., LIN, Z., MA, R., MA, S., NAN, K., SHU, Y., WANG, K., WANG, M., WU, G., YANG, N., YANG, Z., ZHANG, H., ZHANG, W., ZHAO, J., ZHAO, Y., ZHOU, C., ZHOU, J., ZHOU, X., HAVEL, L., KOLEK, V., KOUBKOVA, L., ROUBEC, J., SKRICKOVA, J., ZEMANOVA, M., CHOUAID, C., HILGERS, W., LENA, H., MORO-SIBILOT, D., ROBINET, G., SOUQUET, P.-J., ALT, J., BISCHOFF, H., GROHE, C., LAACK, E., LANG, S., PANSE, J., REINMUTH, N., SCHULZ, C., et al. 2019. Durvalumab plus platinum–etoposide versus platinum–etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 394, 1929-1939.
- PESTALOZZI, B. C., ZAHRIEH, D., PRICE, K. N., HOLMBERG, S. B., LINDTNER, J., COLLINS, J., CRIVELLARI, D., FEY, M. F., MURRAY, E., PAGANI, O., SIMONCINI, E., CASTIGLIONE-GERTSCH, M., GELBER, R. D., COATES, A. S., GOLDHIRSCH, A. & INTERNATIONAL BREAST CANCER STUDY, G. 2006. Identifying breast cancer patients at risk for Central Nervous System (CNS) metastases in trials of the International Breast Cancer Study Group (IBCSG). *Ann Oncol*, 17, 935-44.
- PONS-TOSTIVINT, E., LUGAT, A., FONTENAU, J. F., DENIS, M. G. & BENNOUNA, J. 2021. STK11/LKB1 Modulation of the Immune Response in Lung Cancer: From Biology to Therapeutic Impact. *Cells*, 10.
- POSNER, J. B. & CHERNIK, N. L. 1978. Intracranial metastases from systemic cancer. *Adv Neurol*, 19, 579-92.
- PREUSSER, M., BERGHOFF, A. S., BERGER, W., ILHAN-MUTLU, A., DINHOF, C., WIDHALM, G., DIECKMANN, K., WOHRER, A., HACKL, M., VON DEIMLING, A., STREUBEL, B. & BIRNER, P. 2014. High rate of FGFR1 amplifications in brain metastases of squamous and non-squamous lung cancer. *Lung Cancer*, 83, 83-9.
- RAMALINGAM, S., SKOULIDIS, F., GOVINDAN, R., VELCHETI, V., LI, B., BESSE, B., DY, G., KIM, D., SCHULER, M., VINCENT, M., WILSON, F., PARK, J., GUTIERREZ, J., TRAN, Q., JONES, S. & WOLF, J. 2021.

- P52.03 Efficacy of Sotorasib in KRAS p.G12C-Mutated NSCLC with Stable Brain Metastases: A Post-Hoc Analysis of CodeBreakK 100. *Journal of Thoracic Oncology*, 16.
- RASPER, M., SCHAFFER, A., PIONTEK, G., TEUFEL, J., BROCKHOFF, G., RINGEL, F., HEINDL, S., ZIMMER, C. & SCHLEGEL, J. 2010. Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. *Neuro Oncol*, 12, 1024-33.
- READ, R. D. 2022. Repurposing the drug verteporfin as anti-neoplastic therapy for glioblastoma. *Neuro Oncol*.
- RECK, M., KAISER, R., MELLENGAARD, A., DOUILLARD, J. Y., ORLOV, S., KRZAKOWSKI, M., VON PAWEL, J., GOTTFRIED, M., BONDARENKO, I., LIAO, M., GANN, C. N., BARRUECO, J., GASCHLER-MARKEFSKI, B., NOVELLO, S. & GROUP, L. U.-L. S. 2014. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 15, 143-55.
- REGENBOGEN, T., CHEN, L., TRINKAUS, K., WANG-GILLAM, A., TAN, B. R., AMIN, M., PEDERSEN, K. S., PARK, H., SURESH, R., LIM, K. H., RATCHFORD, E., BROWN, A. & LOCKHART, A. C. 2017. Pacritinib to inhibit JAK/STAT signaling in refractory metastatic colon and rectal cancer. *J Gastrointest Oncol*, 8, 985-989.
- RIELY, G. J., SMIT, E. F., AHN, M. J., FELIP, E., RAMALINGAM, S. S., TSAO, A., JOHNSON, M., GELSOMINO, F., ESPER, R., NADAL, E., OFFIN, M., PROVENCIO, M., CLARKE, J., HUSSAIN, M., OTTERSON, G. A., DAGOGO-JACK, I., GOLDMAN, J. W., MORGENSZTERN, D., ALCASID, A., USARI, T., WISSEL, P., WILNER, K., PATHAN, N., TONKOVYD, S. & JOHNSON, B. E. 2023. Phase II, Open-Label Study of Encorafenib Plus Binimetinib in Patients With BRAF(V600)-Mutant Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 41, 3700-3711.
- RIVERA, E., MEYERS, C., GROVES, M., VALERO, V., FRANCIS, D., ARUN, B., BROGLIO, K., YIN, G., HORTOBAGYI, G. N. & BUCHHOLZ, T. 2006. Phase I study of capecitabine in combination with temozolomide in the treatment of patients with brain metastases from breast carcinoma. *Cancer*, 107, 1348-54.
- ROMINIYI, O., VANDERLINDEN, A., CLENTON, S. J., BRIDGEWATER, C., ALTAMIMI, Y. & COLLIS, S. J. 2021. Tumour treating fields therapy for glioblastoma: current advances and future directions. *Br J Cancer*, 124, 697-709.
- ROSENZWEIG, S. A. 2018. Acquired Resistance to Drugs Targeting Tyrosine Kinases. *Adv Cancer Res*, 138, 71-98.
- ROSTAMI, R., MITTAL, S., ROSTAMI, P., TAVASSOLI, F. & JABBARI, B. 2016. Brain metastasis in breast cancer: a comprehensive literature review. *J Neurooncol*, 127, 407-14.
- SABARI, J. K., VELCHETI, V., SHIMIZU, K., STRICKLAND, M. R., HEIST, R. S., SINGH, M., NAYYAR, N., GIOBBIE-HURDER, A., DIGUMARTHY, S. R., GAINOR, J. F., RAJAN, A. P., NIEBLAS-BEDOLLA, E., BURNS, A. C., HALLIN, J., OLSON, P., CHRISTENSEN, J. G., KURZ, S. C., BRASTIANOS, P. K. & WAKIMOTO, H. 2022. Activity of Adagrasib (MRTX849) in Brain Metastases: Preclinical Models and Clinical Data from

- Patients with KRASG12C-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 28, 3318-3328.
- SALGIA, R. 2014. Fibroblast growth factor signaling and inhibition in non-small cell lung cancer and their role in squamous cell tumors. *Cancer Med*, 3, 681-92.
- SAWAYA, R., HAMMOUD, M., SCHOPPA, D., HESS, K. R., WU, S. Z., SHI, W. M. & WILDRICK, D. M. 1998. Neurosurgical outcomes in a modern series of 400 craniotomies for treatment of parenchymal tumors. *Neurosurgery*, 42, 1044-55; discussion 1055-6.
- SCHACKERT, G., LINDNER, C., PETSCHKE, S., LEIMERT, M. & KIRSCH, M. 2013. Retrospective study of 127 surgically treated patients with multiple brain metastases: indication, prognostic factors, and outcome. *Acta Neurochir (Wien)*, 155, 379-87.
- SCHÄFER, N., GIELEN, G. H., RAUSCHENBACH, L., KEBIR, S., TILL, A., REINARTZ, R., SIMON, M., NIEHUSMANN, P., KLEINSCHNITZ, C., HERRLINGER, U., PIETSCH, T., SCHEFFLER, B. & GLAS, M. 2019. Longitudinal heterogeneity in glioblastoma: moving targets in recurrent versus primary tumors. *J Transl Med*, 17, 96.
- SCHEBESCH, K. M., HOHNE, J., NOEVA, E., PUKROP, T., ARACELI, T., SCHMIDT, N. O. & PROESCHOLDT, M. 2023. Brain metastasis resection: the impact of fluorescence guidance (MetResect study). *Neurosurg Focus*, 55, E10.
- SCHELLINGER, P. D., MEINCK, H. M. & THRON, A. 1999. Diagnostic accuracy of MRI compared to CCT in patients with brain metastases. *J Neurooncol*, 44, 275-81.
- SCHIPMANN, S., MUTHER, M., STOGBAUER, L., ZIMMER, S., BROKINKEL, B., HOLLING, M., GRAUER, O., SUERO MOLINA, E., WARNEKE, N. & STUMMER, W. 2020. Combination of ALA-induced fluorescence-guided resection and intraoperative open photodynamic therapy for recurrent glioblastoma: case series on a promising dual strategy for local tumor control. *J Neurosurg*, 1-11.
- SCHNEIDER, J. L., MUZIKANSKY, A., LIN, J. J., KRUEGER, E. A., LENNES, I. T., JACOBSON, J. O., CHENG, M., HEIST, R. S., PIOTROWSKA, Z., GAINOR, J. F., SHAW, A. T. & DAGOGO-JACK, I. 2022. A Phase 2 Study of Lorlatinib in Patients With ROS1-Rearranged Lung Cancer With Brain-Only Progression on Crizotinib. *JTO Clin Res Rep*, 3, 100347.
- SCHODEL, P., JUNGER, S. T., WITTERSHEIM, M., REINHARDT, H. C., SCHMIDT, N. O., GOLDBRUNNER, R., PROESCHOLDT, M. & GRAU, S. 2020. Surgical resection of symptomatic brain metastases improves the clinical status and facilitates further treatment. *Cancer Med*, 9, 7503-7510.
- SHAH, H. A., LESKINEN, S., KHILJI, H., NARAYAN, V., BEN-SHALOM, N. & D'AMICO, R. S. 2022. Utility of 5-ALA for fluorescence-guided resection of brain metastases: a systematic review. *J Neurooncol*, 160, 669-675.
- SIGAUD, R., ROSCH, L., GATZWEILER, C., BENZEL, J., VON SOOSTEN, L., PETERZIEL, H., SELT, F., NAJAFI, S., AYHAN, S., GERLOFF, X. F., HOFMANN, N., BUDENBENDER, I., SCHMITT, L., FOERSTER, K. I., BURHENNE, J., HAEFELI, W. E., KORSHUNOV, A., SAHM, F., VAN TILBURG, C. M., JONES, D. T. W., PFISTER, S. M., KNOERZER, D., KREIDER, B. L., SAUTER, M., PAJTLER, K. W., ZUCKERMANN, M., OEHME, I., WITT, O. & MILDE, T. 2023. The first-in-class ERK inhibitor

- ulixertinib shows promising activity in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-driven pediatric low-grade glioma models. *Neuro Oncol*, 25, 566-579.
- SINGH, M., MANORANJAN, B., MAHENDRAM, S., MCFARLANE, N., VENUGOPAL, C. & SINGH, S. K. 2014. Brain metastasis-initiating cells: survival of the fittest. *Int J Mol Sci*, 15, 9117-33.
- SORIA, J. C., OHE, Y., VANSTEENKISTE, J., REUNGWETWATTANA, T., CHEWASKULYONG, B., LEE, K. H., DECHAPHUNKUL, A., IMAMURA, F., NOGAMI, N., KURATA, T., OKAMOTO, I., ZHOU, C., CHO, B. C., CHENG, Y., CHO, E. K., VOON, P. J., PLANCHARD, D., SU, W. C., GRAY, J. E., LEE, S. M., HODGE, R., MAROTTI, M., RUKAZENKOV, Y., RAMALINGAM, S. S. & INVESTIGATORS, F. 2018. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 378, 113-125.
- STARK, A. M., STOHRING, C., HEDDERICH, J., HELD-FEINDT, J. & MEHDORN, H. M. 2011. Surgical treatment for brain metastases: Prognostic factors and survival in 309 patients with regard to patient age. *J Clin Neurosci*, 18, 34-8.
- STUHLMILLER, T. J., COHEN, S., JAIN, S. K., NAIR, S., WEINBERG, B. A., GINN, S., WOOD, A., KNOERZER, D., BOX, J. A., FEDEROWICZ, B. & KESARI, S. 2022. Updated clinical outcomes from ULI-EAP-100, an intermediate expanded access program for ulixertinib (BVD-523). *Journal of Clinical Oncology*, 40, e15101-e15101.
- STUMMER, W., PICHLMEIER, U., MEINEL, T., WIESTLER, O. D., ZANELLA, F. & REULEN, H.-J. 2006. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology*, 7, 392-401.
- STUPP, R., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M. J., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M. J., BELANGER, K., BRANDES, A. A., MAROSI, C., BOGDAHAN, U., CURSCHMANN, J., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., GORLIA, T., ALLGEIER, A., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J. G., EISENHAEUER, E., MIRIMANOFF, R. O., EUROPEAN ORGANISATION FOR, R., TREATMENT OF CANCER BRAIN, T., RADIOTHERAPY, G. & NATIONAL CANCER INSTITUTE OF CANADA CLINICAL TRIALS, G. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, 987-96.
- STUPP, R., TAILLIBERT, S., KANNER, A., READ, W., STEINBERG, D., LHERMITTE, B., TOMS, S., IDBAIH, A., AHLUWALIA, M. S., FINK, K., DI MECO, F., LIEBERMAN, F., ZHU, J. J., STRAGLIOTTO, G., TRAN, D., BREM, S., HOTTINGER, A., KIRSON, E. D., LAVY-SHAHAF, G., WEINBERG, U., KIM, C. Y., PAEK, S. H., NICHOLAS, G., BRUNA, J., HIRTE, H., WELLER, M., PALT, Y., HEGI, M. E. & RAM, Z. 2017. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 318, 2306-2316.
- STUPP, R., WONG, E. T., KANNER, A. A., STEINBERG, D., ENGELHARD, H., HEIDECHE, V., KIRSON, E. D., TAILLIBERT, S., LIEBERMANN, F., DBALY, V., RAM, Z., VILLANO, J. L., RAINOV, N., WEINBERG, U., SCHIFF, D., KUNSCHNER, L., RAIZER, J., HONNORAT, J., SLOAN, A., MALKIN, M., LANDOLFI, J. C., PAYER, F., MEHDORN, M., WEIL, R. J.,

- PANNULLO, S. C., WESTPHAL, M., SMRCKA, M., CHIN, L., KOSTRON, H., HOFER, S., BRUCE, J., COSGROVE, R., PALEOLOGOUS, N., PALTU, Y. & GUTIN, P. H. 2012. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer*, 48, 2192-202.
- SU, X., XIE, Y., ZHANG, J., LI, M., ZHANG, Q., JIN, G. & LIU, F. 2022. HIF- α activation by the prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat suppresses chemoresistant glioblastoma growth by inducing ferroptosis. *Cell Death Dis*, 13, 861.
- SUH, J. H., KOTECHA, R., CHAO, S. T., AHLUWALIA, M. S., SAHGAL, A. & CHANG, E. L. 2020. Current approaches to the management of brain metastases. *Nat Rev Clin Oncol*, 17, 279-299.
- TAWBI, H. A., FORSYTH, P. A., ALGAZI, A., HAMID, O., HODI, F. S., MOSCHOS, S. J., KHUSHALANI, N. I., LEWIS, K., LAO, C. D., POSTOW, M. A., ATKINS, M. B., ERNSTOFF, M. S., REARDON, D. A., PUZANOV, I., KUDCHADKAR, R. R., THOMAS, R. P., TARHINI, A., PAVLICK, A. C., JIANG, J., AVILA, A., DEMELO, S. & MARGOLIN, K. 2018. Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain. *N Engl J Med*, 379, 722-730.
- TERHEYDEN, P., KRACKHARDT, A. & EIGENTLER, T. 2019. The Systemic Treatment of Melanoma. *Dtsch Arztebl Int*, 116, 497-504.
- THAKUR, C. & CHEN, F. 2019. Connections between metabolism and epigenetics in cancers. *Semin Cancer Biol*, 57, 52-58.
- TIMMER, M., WERNER, J. M., ROHN, G., ORTMANN, M., BLAU, T., CRAMER, C., STAVRINOU, P., KRISCHEK, B., MALLMAN, P. & GOLDBRUNNER, R. 2017. Discordance and Conversion Rates of Progesterone-, Estrogen-, and HER2/neu-Receptor Status in Primary Breast Cancer and Brain Metastasis Mainly Triggered by Hormone Therapy. *Anticancer Res*, 37, 4859-4865.
- TOLANEY, S. M., SAHEBJAM, S., LE RHUN, E., BACHELOT, T., KABOS, P., AWADA, A., YARDLEY, D., CHAN, A., CONTE, P., DIERAS, V., LIN, N. U., BEAR, M., CHAPMAN, S. C., YANG, Z., CHEN, Y. & ANDERS, C. K. 2020. A Phase II Study of Abemaciclib in Patients with Brain Metastases Secondary to Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 26, 5310-5319.
- TOMCZAK, R., WUNDERLICH, A., GORICH, J., BRAMBS, H. J. & RILINGER, N. 2003. Brain abscesses in diffusion-weighted imaging (DWI) - comparison to cystic brain tumors. *Radiologe*, 43, 661-4.
- TROPEPE, V., SIBILIA, M., CIRUNA, B. G., ROSSANT, J., WAGNER, E. F. & VAN DER KOOY, D. 1999. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol*, 208, 166-88.
- TSAO, M. N., XU, W., WONG, R. K., LLOYD, N., LAPERRIERE, N., SAHGAL, A., RAKOVITCH, E. & CHOW, E. 2018. Whole brain radiotherapy for the treatment of newly diagnosed multiple brain metastases. *Cochrane Database Syst Rev*, 1, CD003869.
- TSUKADA, Y., FOUAD, A., PICKREN, J. W. & LANE, W. W. 1983. Central nervous system metastasis from breast carcinoma. Autopsy study. *Cancer*, 52, 2349-54.

- URAL, Y., ELTER, T., YILMAZ, Y., HALLEK, M., DATTA, R. R., KLEINERT, R., HEIDENREICH, A. & PFISTER, D. A. 2022. Validation and implementation of a mobile app decision support system for quality assurance of tumor boards. Analyzing the concordance rates for prostate cancer from a multidisciplinary tumor board of a University Cancer Center.
- VAN ALLEN, E. M., WAGLE, N., SUCKER, A., TREACY, D. J., JOHANNESSEN, C. M., GOETZ, E. M., PLACE, C. S., TAYLOR-WEINER, A., WHITTAKER, S., KRYUKOV, G. V., HODIS, E., ROSENBERG, M., MCKENNA, A., CIBULSKIS, K., FARLOW, D., ZIMMER, L., HILLEN, U., GUTZMER, R., GOLDINGER, S. M., UGUREL, S., GOGAS, H. J., EGBERTS, F., BERKING, C., TREFZER, U., LOQUAI, C., WEIDE, B., HASSEL, J. C., GABRIEL, S. B., CARTER, S. L., GETZ, G., GARRAWAY, L. A., SCHADENDORF, D. & DERMATOLOGIC COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP OF, G. 2014. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov*, 4, 94-109.
- VARGAS-TOSCANO, A., NICKEL, A. C., LI, G., KAMP, M. A., MUHAMMAD, S., LEPRIVIER, G., FRITSCH, E., BARKER, R. A., SABEL, M., STEIGER, H. J., ZHANG, W., HANGGI, D. & KAHLERT, U. D. 2020. Rapalink-1 Targets Glioblastoma Stem Cells and Acts Synergistically with Tumor Treating Fields to Reduce Resistance against Temozolomide. *Cancers (Basel)*, 12.
- VERSTOVSEK, S., GERDS, A. T., VANNUCCHI, A. M., AL-ALI, H. K., LAVIE, D., KUYKENDALL, A. T., GROSICKI, S., IURLO, A., GOH, Y. T., LAZAROIU, M. C., EGYED, M., FOX, M. L., MCLORNAN, D., PERKINS, A., YOON, S. S., GUPTA, V., KILADJIAN, J. J., GRANACHER, N., LEE, S. E., OCROTEALA, L., PASSAMONTI, F., HARRISON, C. N., KLENCKE, B. J., RO, S., DONAHUE, R., KAWASHIMA, J., MESA, R. & INVESTIGATORS, M. S. 2023. Momelotinib versus danazol in symptomatic patients with anaemia and myelofibrosis (MOMENTUM): results from an international, double-blind, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet*, 401, 269-280.
- VIGNESWARAN, K., BOYD, N. H., OH, S. Y., LALLANI, S., BOUCHER, A., NEILL, S. G., OLSON, J. J. & READ, R. D. 2020. YAP/TAZ Transcriptional Coactivators Create Therapeutic Vulnerability to Verteporfin in EGFR-mutant Glioblastoma. *Clin Cancer Res*.
- VOGELBAUM, M. A., ANGELOV, L., LEE, S. Y., LI, L., BARNETT, G. H. & SUH, J. H. 2006. Local control of brain metastases by stereotactic radiosurgery in relation to dose to the tumor margin. *J Neurosurg*, 104, 907-12.
- WANG, E., XIANG, K., ZHANG, Y. & WANG, X.-F. 2022. Patient-derived organoids (PDOs) and PDO-derived xenografts (PDOXs): New opportunities in establishing faithful pre-clinical cancer models. *Journal of the National Cancer Center*.
- WAZA, M., ADACHI, H., KATSUNO, M., MINAMIYAMA, M., TANAKA, F. & SOBUE, G. 2006. Alleviating neurodegeneration by an anticancer agent: an Hsp90 inhibitor (17-AAG). *Ann N Y Acad Sci*, 1086, 21-34.
- WELLER, M. 2015. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Hirnmetastasen und Meningeosis neoplastica. *Deutsche Gesellschaft für Neurologie*.
- WOLF, J., PLANCHARD, D., HEIST, R. S., SOLOMON, B., SEBASTIAN, M., SANTORO, A., REGUART, N., STAMMBERGER, U., MANGANELLI, L.,

- WU, H., MAIS, A. & DOOMS, C. 2020. 1387P Phase Ib study of LXH254 + LTT462 in patients with KRAS- or BRAF-mutant NSCLC. *Annals of Oncology*, 31, S881-S882.
- XIE, N., TIAN, C., WU, H., YANG, X., LIU, L., LI, J., XIAO, H., GAO, J., LU, J., HU, X., CAO, M., SHUI, Z., TANG, Y., WANG, X., YANG, J., HU, Z. Y. & OUYANG, Q. 2020. FGFR aberrations increase the risk of brain metastases and predict poor prognosis in metastatic breast cancer patients. *Ther Adv Med Oncol*, 12, 1758835920915305.
- YAEH, A., NANDA, T., JANI, A., ROZENBLAT, T., QURESHI, Y., SAAD, S., LESSER, J., LASSMAN, A. B., ISAACSON, S. R., SISTI, M. B., BRUCE, J. N., MCKHANN, G. M., 2ND & WANG, T. J. 2015. Control of brain metastases from radioresistant tumors treated by stereotactic radiosurgery. *J Neurooncol*, 124, 507-14.
- YAU, T., SWANTON, C., CHUA, S., SUE, A., WALSH, G., ROSTOM, A., JOHNSTON, S. R., O'BRIEN, M. E. & SMITH, I. E. 2006. Incidence, pattern and timing of brain metastases among patients with advanced breast cancer treated with trastuzumab. *Acta Oncol*, 45, 196-201.
- YOO, H., KIM, Y. Z., NAM, B. H., SHIN, S. H., YANG, H. S., LEE, J. S., ZO, J. I. & LEE, S. H. 2009. Reduced local recurrence of a single brain metastasis through microscopic total resection. *J Neurosurg*, 110, 730-6.
- YUAN, J., DONG, X., YAP, J. & HU, J. 2020. The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy. *J Hematol Oncol*, 13, 113.
- ZHANG, J. H., CHUNG, T. D. & OLDENBURG, K. R. 1999. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*, 4, 67-73.
- ZHU, J. J., DEMIREVA, P., KANNER, A. A., PANNULLO, S., MEHDORN, M., AVGEROPOULOS, N., SALMAGGI, A., SILVANI, A., GOLDLUST, S., DAVID, C., BENOUAICH-AMIEL, A. & ZVI RAM ON BEHALF OF THE, E. F. T. I. 2017. Health-related quality of life, cognitive screening, and functional status in a randomized phase III trial (EF-14) of tumor treating fields with temozolomide compared to temozolomide alone in newly diagnosed glioblastoma. *J Neurooncol*, 135, 545-552.
- ZHU, L., RETANA, D., GARCIA-GOMEZ, P., ALVARO-ESPINOSA, L., PRIEGO, N., MASMUDI-MARTIN, M., YEBRA, N., MIARKA, L., HERNANDEZ-ENCINAS, E., BLANCO-APARICIO, C., MARTINEZ, S., SOBRINO, C., AJENJO, N., ARTIGA, M. J., ORTEGA-PAINO, E., TORRES-RUIZ, R., RODRIGUEZ-PERALES, S., RENACER, SOFFIETTI, R., BERTERO, L., CASSONI, P., WEISS, T., MUNOZ, J., SEPULVEDA, J. M., GONZALEZ-LEON, P., JIMENEZ-ROLDAN, L., MORENO, L. M., ESTEBAN, O., PEREZ-NUNEZ, A., HERNANDEZ-LAIN, A., TOLDOS, O., RUANO, Y., ALCAZAR, L., BLASCO, G., FERNANDEZ-ALEN, J., CALEIRAS, E., LAFARGA, M., MEGIAS, D., GRANA-CASTRO, O., NOR, C., TAYLOR, M. D., YOUNG, L. S., VARESLIJA, D., COSGROVE, N., COUCH, F. J., CUSSO, L., DESCO, M., MOURON, S., QUINTELA-FANDINO, M., WELLER, M., PASTOR, J. & VALIENTE, M. 2022. A clinically compatible drug-screening platform based on organotypic cultures identifies vulnerabilities to prevent and treat brain metastasis. *EMBO Mol Med*, 14, e14552.

7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. M. Sabel bedanken. Gemeinsam mit Frau Professor Dr. M. Rapp hat er meine Begeisterung für die Neurochirurgie entfaltet, mich weit über diese Arbeit hinaus gefördert und meinen Werdegang geprägt. Herr Professor Dr. M. Kamp und Herr Professor Dr. U. Kahlert haben diese Arbeit initiiert – auch Ihnen gilt mein Dank. Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Felsberg, Institut für Neuropathologie, möchte ich für seine Unterstützung und Co-Betreuung dieses Vorhabens danken. Frau Dr. A.-C. Nickel war für mich in den vergangenen Jahren die wichtigste Ansprechpartnerin für die inhaltliche Arbeit an diesem Projekt. Ihrem außergewöhnlichen Forschergeist gilt mein besonderer Dank. Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. J.-F. Cornelius für die Möglichkeit, in der Klinik für Neurochirurgie promovieren zu dürfen und die Resultate meiner Arbeit auf verschiedenen Kongressen vorstellen zu können. Vielen Dank an Herrn M. Hewera für seine Hilfe im Labor der Klinik für Neurochirurgie sowie auch an alle Operateure für die Bereitstellung von Gewebeproben. Bei der Medizinischen Fakultät möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums der Forschungskommission bedanken. Ein besonderer Dank gilt allen Patienten, die sich bereit erklärt haben, an dieser Studie teilzunehmen.

Außerdem möchte ich mich für die Zusammenarbeit auf dem Campus bedanken:

Die Gensequenzierungen wurden am Institut für Neuropathologie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Reifenberger von Frau Dr. M. Wolter sowie Frau Dr. K. Kaulich durchgeführt. Die Bestrahlungsexperimente erfolgten im Labor für Molekulare Radioonkologie von Herrn Priv.-Doz. Dr. D. Sohn an der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie. Die Hochdurchsatzwirkstofftestungen wurden in der HTS-Core-Facility der Medizinischen Fakultät unter der Leitung von Frau Dr. N. Qin und der Mithilfe von Frau cand. med. J. Trübel durchgeführt.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Lebensgefährtin Katharina. Sie hat mich durch alle Phasen dieses Projektes begleitet und mir stets den Rücken gestärkt. Danken möchte ich meiner Familie, die mir dieses Studium ermöglicht und meinen Charakter derart geprägt hat, es stets begeistert fortzusetzen und erfolgreich abzuschließen. Letztlich möchte ich noch meinen Freunden danken; dafür, dass ich mich immer auf sie verlassen kann.