

Aus der Neurochirurgischen Klinik der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Steiger

**Die δ -Aminolaevulinsäure gestützte
photodynamische Therapie humaner Gliome in-vitro
und in-vivo**

Dissertation

zu Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Philipp Jörg Slotty

2010

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. J. Vesper

Korreferent: PD Dr. med. B. Turowski

Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an, interessant zu werden, wo sie aufhört.
Justus Freiherr von Liebig, (1803 - 1873), deutscher Chemiker

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	
1 Einleitung	7
1.1 Das anaplastische Astrozytom	7
1.2 Das Glioblastoma multiforme	8
1.3 Apoptose/Nekrose	10
1.4 Die Photodynamische Therapie	13
1.5 Fragestellung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Verwendete Reagenzien, Kits, Gerätschaften und Software.....	16
2.2 Versuchsaufbau	17
2.3 Die ALA-PDT bei Sphäroiden der Zelllinien U87, U251 und U373.....	18
2.4 Die ALA-PDT in vivo.....	19
2.5 Funktionen und Eigenschaften der untersuchten Proteine	24
2.5.1 Ki-67.....	24
2.5.2 Caspase 3.....	24
2.5.3 Apoptosis-Induzierender Faktor (AIF).....	25
2.6 Methoden.....	26
2.6.1 Immunhistochemie	26
2.6.2 Fluoreszenz-Mikroskopie.....	28
2.6.3 TUNEL-Färbung	28
2.6.4 DAPI-Färbung.....	29
3 Ergebnisse	29
3.1 Ergebnisse der Zelllinien-Färbungen	30
3.1.1 Ki-67 Färbungen der Zelllinien.....	30
3.1.2 Caspase 3 Färbungen der Zelllinien.....	30
3.1.3 Ergebnisse der TUNEL-Färbungen der Zelllinien.....	31
3.1.4 Ergebnisse der Zelllinien-Färbung für AIF	37
3.2 Ergebnisse der Färbungen intraoperative gewonnener Proben	38
3.2.1 Ergebnisse der Ki-67 Färbungen der intraoperativ gewonnenen Proben.....	38
3.2.2 Ergebnisse der Caspase-3 Färbungen intraoperativ gewonnener Proben	40
3.2.3 Ergebnisse der TUNEL-Färbung intraoperativ gewonnener Proben	41

3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	45
4	Diskussion	46
4.1	Wirkungsnachweis der ALA-PDT	47
4.2	Wie wirkt die ALA-PDT in der Zelle	48
4.3	Der Faktor Zeit	49
4.4	Die Rolle der Caspasen	50
5	Thesen	50
6	Literaturverzeichnis.....	52
7	Dank	58
8	Abschließende Worte und Widmung	59

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel erstellt habe; aus fremden Quellen übernommene Daten und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Erstellung des Manuskriptes habe ich Hilfe erhalten von

Professor Dr. med. W. Stummer und Professor Dr. med. J. Vesper

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher vorgelegt und wurde nicht veröffentlicht.

Düsseldorf, 24.1.2010

Philipp J. Slotty

Abkürzungen:

5-ALA	5(δ)-Amino-Laevulinsäure
AIF	apoptosis inducing factor
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
CAD	caspase-activated deoxyribonuclease
CD	Cluster of differentiation
DNA	desoxyribonucleic acid
DNAse	Desoxyribonuklease
DFF	DNA Fragmentation Factor
GBM	Glioblastoma multiforme
ICAD	inhibitor of CAD
KG	Körpergewicht
Ki-67	Kiel-67, syn. MIB-1, Proliferationsmarker
HE	Hämatoxylin-Eosin
PDT	Photodynamische Therapie
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
sc	Santa Cruz Biotechnology Inc.©
WHO	World Health Organisation
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die von den Astrozyten ausgehenden Tumoren des zentralen Nervensystems stellen mit ca. 32% die größte Gruppe aller intrazerebralen Raumforderungen dar. Gefolgt von Metastasen mit ca. 25% und meningealen Tumoren mit ca. 15%, stellen sie trotz weit reichender Fortschritte in Diagnostik, chirurgischer sowie adjuvanter Therapie weiterhin in allen ihren Varianten eine enorme, bei Weitem noch nicht beherrschte Herausforderung für die Behandelnden dar. Weiterhin sind die Astrozytome, das pilozytische Astrozytom des Kindes- und jungen Erwachsenenalters ausgenommen, mit einer schlechten, in aller Regel infausten Prognose verbunden. Auch die primär niedriggradigen Astrozytome neigen zu maligner Transformation, wenngleich mit zum Teil über Jahrzehnte stabilem Verlauf.

Die WHO teilt die Astrozytome in vier Malignitätsgrade ein, die sich an der den histopathologischen Kriterien orientieren. (Böcker et al., 2000; Sarkar et al., 2009)

WHO-Klassifikation der astrozytären Tumoren des ZNS

WHO Grad I	pilozytisches Astrozytom
WHO Grad II	niedriggradiges Astrozytom, oligodendrogiales Astrozytom
WHO Grad III	anaplastisches Astrozytom
WHO Grad IV	Glioblastom

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der astrozytären Tumoren des ZNS

Diese Arbeit fokussiert sich auf die höhergradigen Grad III^o und IV^o Tumoren.

1.1 Das anaplastische Astrozytom

Grad III^o Astrozytome (anaplastische Astrozytome) entwickeln sich häufig aus niedriggradigen Tumoren. Schon bei Grad II^o Astrozytomen findet eine diffuse Infiltration in das Nachbargewebe statt. Eine vollständige chirurgische Exstirpation ist daher in aller Regel nicht möglich. In den residuellen Tumorzellen akkumulieren weitere genetische Veränderungen, welche eine maligne Transformation in einen Grad III^o Tumor mit sich bringen können. Hier finden sich, besonders im Vergleich zu Grad II^o Tumoren, Deletionen des Chromosoms 19q. Der Ki-67-Index (syn. MIB-1-Index), als Marker einer erhöhten zellulären Proliferationsrate, variiert zwischen 5-10% mit einer großen Streubreite. So finden sich in einer Vielzahl der Tumoren geringere, eher Grad II^o Tumoren entsprechende Ki-67-Indizes.

Zur histopathologischen Sicherung eines Grad III° Tumors müssen daher Kernatypien, atypische Mitosen, eine hohe Zelldichte sowie mehrkernige Zellen nachweisbar sein. Die genetischen Veränderungen sind mannigfaltig. So finden sich neben Mutation des p53-Gens Veränderungen in zahlreichen anderen Tumorsuppressorgenen wie p14, CDKN2A und CDKN2B, eine Überexpression des epidermal growth factor receptor (EGFR) ist nicht regelmäßig nachweisbar, eine erhöhte Expression korreliert mit einer schlechteren Prognose (Sarkar et al., 2009).

Diese Grad III° Tumoren können soweit sie überlebt werden in ein sekundäres Glioblastom übergehen (Böcker et al., 2000).

1.2 Das Glioblastoma multiforme

Mit einer Inzidenz von 3-4 Neuerkrankungen bei 100.000 Einwohner und einem Anteil von 69% aller astocytären Tumoren des zentralen Nervensystems, stellt das Glioblastoma multiforme (GBM) das häufigste primäre Malignom des ZNS dar.

Mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 42,4 % in den ersten 5 Monaten und 3,3% zwei Jahre nach Diagnosestellung im Spontanverlauf ist das GBM zugleich mit einer schlechten Prognose verknüpft. Einen wesentlichen prognostischen Faktor stellt, neben der Lokalisation und dem Tumorprogress, das Alter bei Diagnosestellung dar. So sinkt das mediane Überleben bei Diagnosestellung über 80 Jahre auf 1,6 Monate, während es bei Diagnosestellung vor Erreichen des fünfzigsten Lebensjahres 8,8 Monate beträgt. Im Erkrankungskollektiv besteht eine deutliche Bevorzugung des männlichen Geschlechtes mit 1,7:1, das mediane Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren (Ohgaki et al., 2005).

Man unterscheidet innerhalb der Glioblastome zwischen primären GBM, welche mit 95% die deutliche Mehrheit ausmachen und sekundären GBM, welche sich durch Malignisierung aus einem niedriggradigen Astrozytom entwickeln. Dieser Mechanismus liegt etwa 5% der GBM zugrunde.

Histologisch handelt es sich um astrozytäre Tumore, welcher diffus das umliegende Gewebe infiltrieren. Die histopathologische Abgrenzung zum anaplastischen Astrozytom findet über einen erhöhten mittlerer Ki-67-Index von 15-20% sowie pathologische Gefäßproliferate und Nekrosen statt (Sarkar et al., 2009). Die WHO (World Health Organisation) klassifiziert das GBM aufgrund seiner schlechten Prognose als Grad IV Tumor (WHO ICD, 2007).

Die genetischen Veränderungen sind wie bei den Grad III° Tumoren vielgestaltig. Häufig findet sich eine Überexpression des EGFR, welche mit einem rascheren Tumorwachstum sowie einer schlechteren Prognose verknüpft ist. Ein loss-of-heterozygosity (LOH) auf dem langen Arm des Chromosoms 10 zählt zu den stabilsten genetischen Veränderungen und findet sich in 60-80% aller Glioblastome. Dieser Lokalisation können zahlreiche Tumorsuppressorgene (z.B. PTEN (Phosphatase and Tensin homolog)) zugeordnet werden. Zusätzlich finden sich Veränderungen in zahlreichen weiteren Tumorsuppressorgenen und Zellzyklusregulatoren wie MDM2 und MDM4, CDKN2A, p14 und p53.

Der Anamnese bis zur Diagnosestellung ist meist kurz, in aller Regel wenige Monate. Im Vordergrund stehen Kopfschmerzen, epileptische Anfälle und durch die Tumorlokalisierung bedingte fokale neurologische Ausfälle wie Sprachstörungen und Lähmungen. Seltener kommt es durch Einblutungen in das Tumorgewebe zu akuten neurologischen Symptomen mit folgender Diagnosestellung.

Die diagnostische Kaskade umfasst in aller Regel eine cerebrale Computertomographie in der der Verdacht auf eine intracerebrale Raumforderung gestellt wird. Eine anschließende Kontrastmittel-gestützte Kernspintomographie und gegebenenfalls eine Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Darstellung eines erhöhten Stoffwechsel-Umsatzes.

In Abhängigkeit von Tumorlokalisierung, Allgemeinzustand des Patienten und Dringlichkeit der Intervention erfolgt die Diagnosesicherung durch eine Biopsie oder die operative Resektion.

In zahlreichen Studien der letzten Jahre konnte der positive Einfluss einer möglichst vollständigen Resektion auf das Gesamtüberleben, die mediane Überlebenszeit und die Zeitspanne bis zum Auftreten eines Rezidivs (PFS, progression free survival) nachgewiesen werden (Stummer et al., 2006, Pichlmeier et al., 2008). Durch die Anwendung Fluoreszenz-gestützter Resektionsverfahren lässt sich der Anteil der, in der postoperativen Kernspintomographie, vollständig entfernten Glioblastome relevant steigern. (Pichlmeier U. et al., 2008). Die vollständige, mikroskopische Resektion des Glioblastoms ist aufgrund der ausgeprägten, weit reichenden Infiltration des umliegenden Gewebes nicht zu erreichen. In funktionell bedeutsamen Lokalisationen ist eine Resektion oftmals nicht möglich.

Dies verdeutlicht die Bedeutung adjuvanter Therapiekonzepte. Neben Chemotherapie und Bestrahlung, wurde auf Basis der ALA -Fluoreszenz die photodynamische Therapie zur Behandlung inoperabler (Rezidiv-)Gliome entwickelt, deren Wirkungsmechanismus in-vitro und in-vivo Inhalt dieser Arbeit ist.

1.3 Apoptose/Nekrose

Die Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose ist elementar, nicht nur in Hinblick auf diese Arbeit. Handelt es sich bei der Nekrose um eine ungezielte Zerstörung, welche in aller Regel eine ganze Zellgruppe, ungeachtet ihrer Funktion und individueller genetischen Besonderheiten betrifft, ist die Apoptose ein gezielter, wohlgeplanter, energieverbrauchender Prozess.

Zelluläre Nekrose tritt in aller Regel dort auf, wo Zellen durch äußere Einflüsse in einer Form geschädigt werden, die Ihnen eine Reparatur der entstandenen Schäden unmöglich macht und keine Zeit oder Möglichkeit für ein gezieltes Absterben im Rahmen einer Apoptose bietet.

Die auslösenden Noxen, wie mechanische Schädigung, Strahlung, Hitze, Sauerstoff- und Nährstoffmangel sowie Schädigungen des genetischen Materials, sind bei beiden Vorgängen ähnlich, unterscheiden sich jedoch bezüglich ihrer Brisanz (Plaetzer et al., 2003). Zusätzlich zu diesen Schädigungsmustern als Auslösung des Zelltodes gibt es noch die Möglichkeit der Liganden-vermittelten Apoptose, z.B. über den zur Tumornekrosefaktor-Superfamilie gehörenden CD-95 (Apo-1)-Rezeptor (Krammer 2000).

Der Nekrose liegt dabei in aller Regel eine Schädigung der Zellmembran zugrunde. Das Membranpotential bricht zusammen, Zytoplasma tritt aus. Die Zellorganellen schwellen an. Es bilden sich Vakuolen, der Zellkern schrumpft zunächst, um dann rasch zu zerfallen. Diese Form des Zelltodes ist aufgrund des Freiwerdens intakter, chemotaktischer intrazellulärer Komponenten von einer Immunantwort begleitet, welche besonders über neutrophile Granulozyten eine Entzündungsreaktion hervorruft.

Im Gegensatz dazu findet bei der Apoptose eine Vorbereitung auf die Auflösung der Zelle statt. Die speziell für diesen Fall vorgesehenen Kontrollmechanismen sind intakt. Es handelt sich um einen programmierten Zelltod. Die Organellen und die Zellmembran der Zellen bleiben nach Auslösung des apoptotischen Signals relativ lange intakt. Die DNA zerfällt nicht, sondern wird gezielt durch Endonukleasen in regelmäßige Bruchstücke, welche oligonukleosomalen Fragmenten entsprechen, zerlegt. Eine Immunantwort findet nicht statt, die Zellreste werden von Makrophagen aufgenommen (Ganten et al., 1997, Löffler et al., 1997).

Currie et al. prägten 1972 den Begriff der Apoptose (griech. für Herabfallen, wie Blätter von einem Baum) nachdem sie in vielen unterschiedlichen Geweben einen ähnlich ablaufenden Prozeß des Zelltodes beobachteten. Sie erkannten das unterschiedliche Muster der morphologischen Veränderungen im Vergleich zur Nekrose und schlussfolgerten, daß es sich

um einen physiologischen, ubiquitär vorkommenden Mechanismus handeln muss (Wyllie et al., 1980).

Mittlerweile sind eine Vielzahl von an der Apoptose beteiligten Abläufe und Proteine bekannt. Zur bekanntesten Gruppe zählen die Caspasen.

Durch diese Gruppe von Enzymen wird unter anderem durch die Freisetzung von Cytochrome c und Smac/DIABLO aus den Mitochondrien eine Kette von Ereignissen ausgelöst, welche letztendlich in der apoptotischen Auflösung der Zelle münden (Furre et al., 2006).

Zahlreiche, überwiegend zur Bcl-2 Familie gehörende Regulatorproteine wie das pro-apoptische Bax, Bak und Bid, aber auch anti-apoptische Faktoren wie Bcl-2 und Bcl-X sind an der Induktion der Apoptose beteiligt und ihrerseits in ihrer Expression von Zellzyklusregulatoren wie Survivin abhängig. So führt eine Translokation von Bax aus dem Cytosol in die Mitochondrien über die Öffnung der mitochondrialen Membran zu einer Freisetzung von pro-apoptischen Proteinen wie Cytochrome c (Kang D W, 2007, Antonsson B et al., 2000). Freies Cytochrom c bildet mit cytosolischem Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) und ATP (Adenosintriphosphat) das so genannte Apoptosom über welches Pro-Caspase-9 in die aktive Form gespalten wird. Diese wiederum aktiviert Effektor-Caspase-3, welche unter anderem den inaktiven Heterodimer DFF45/ICAD spaltet und nukleäres DFF40 (DNA fragmentation factor) freisetzt. Dies ist eine effektive DNase, welche zu einer DNA-Fragmentierung mit oligonukleosomalen Bruchstücken und damit unabwendbar zur Apoptose führt (Widak, 2000), (siehe Abbildung 1).

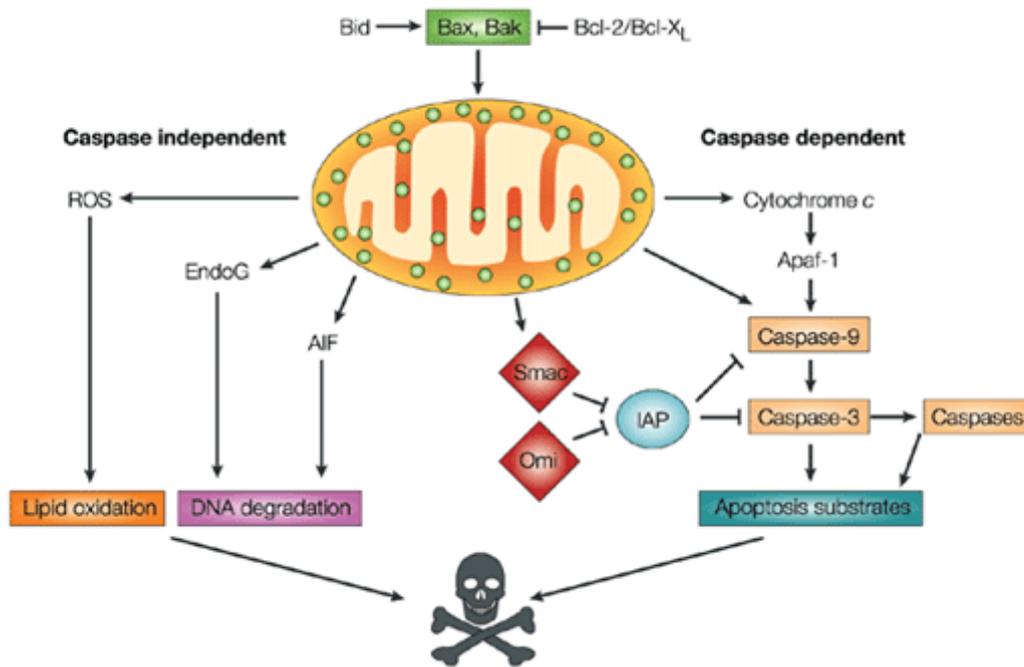


Abbildung 1: Unterschiedliche Wege der Apoptose-Induktion, ROS: reactive oxygen species, EndoG: Endonuklease G, die weiteren Abkürzungen sind Eigennamen der Proteine (modifiziert nach Jin et al., 2002)

Neben der Caspasen-abhängigen Apoptose wurden in letzter Zeit Wege der Caspasen-unabhängigen Apoptose beschrieben.

Als ein wesentliches Protein der Caspasen-unabhängigen Apoptose konnte AIF (apoptosis inducing factor) identifiziert werden. AIF ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert. Ob es dort abseits seiner pro-apoptotischen Wirkung eine Funktion im Rahmen der normalen Zellhomöostase ausübt, ist nicht abschließend geklärt.

Durch zahlreiche Stimuli, insbesondere Hitze und Schädigung der mitochondrialen Atmungskette mit Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies konnte eine Translokation von AIF in den Zellkern nachgewiesen werden. Diese Aktivierung von AIF tritt noch vor der Freisetzung von Cytochrome c als wesentlicher Aktivator der Caspasen-abhängigen Apoptose ein. Im Zellkern wirkt AIF als Endonuklease und führt zu einer DNA-Fragmentation in oligonukleosomale Fragmente. In mehreren Experimenten konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess ausgesprochen schnell und unabhängig von Caspasen stattfindet (Daugas E et al., 2000, Granville J et al., 2001)

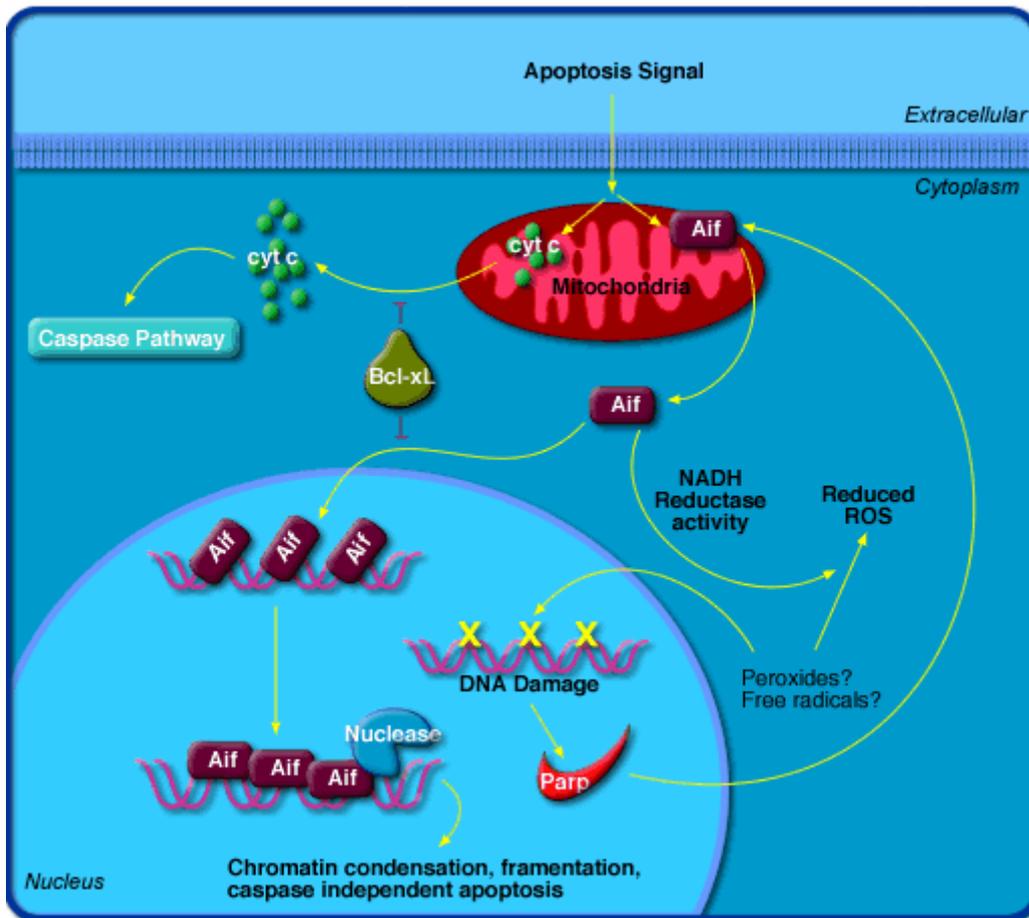


Abbildung 2: Aktivierung und Funktion des AIF in der Caspasen-unabhängigen Apoptose, modifiziert nach Biocarta[®], PARP: Poly [ADP-ribose] polymerase, cyt c: Cytochrome c (mod. nach Croston, 2009)

1.4 Die Photodynamische Therapie

Grundlage der Photodynamischen Therapie (PDT) ist die Kombination eines in erkranktem Gewebe kumulierenden Stoffes (Photosensitizer) mit Bestrahlung im Bereich der Wellenlänge des sichtbaren Lichts. Nach heutigen Erkenntnissen führt die Absorption des Lichtes in den Zellen zur Bildung aggressiver Sauerstoffspezies ($^1\text{O}_2$, Hyperoxidanionen), welche über eine Schädigung der mitochondrialen Atmungskette zum Zelltod führen.

Diese Verfahren findet seit den 1960er Jahren kontrollierte Anwendung in der Dermatologie. Als Photosensitizer kommen hauptsächlich Porphyrin-Derivate zur Anwendung. In den letzten Jahren wurde die Behandlung solider Tumoren mittels der PDT erforscht, heute hat die Methode unter anderem in den USA eine Zulassung zur Behandlung von Lungen- und Oesophagus-Karzinomen (Allison et al., 2009).

Unter Verwendung von exogen zugeführtem Hematoporphyrinderivat (HpD) oder seinen in der Zusammensetzung reineren Abkömmlingen Photofrin® (Natrium-Porphimer) und Photofrin II® (Dihematoporphyrinester) wurde die PDT auch bei malignen Gliomen angewendet.

Diese für die Gliomtherapie eingesetzten Hämatoaphyrinderivate besitzen zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen. Unter anderem führen sie zur anhaltenden Photosensibilisierung der Haut. Patienten, die diese Substanzen erhalten, müssen sich bis zu zwei Monate lang vor Sonnenlicht schützen. Problematisch erscheint zudem eine unspezifische Schädigung von normalem Hirngewebe durch die PDT mit Hämatoaphyrinderivaten. Diese zusätzliche Schädigung ist vermutlich Folge einer Mitbewegung ("bulk flow") von intravenös verabreichten Sensibilisatoren mit dem Tumorödem in das dem Tumor angrenzende Normalgewebe. Auch scheinen intravenös applizierte Hämatoaphyrinderivate das Gefäßendothel unspezifisch zu sensibilisieren.

Im Unterschied hierzu reichert sich der 5-ALA-Metabolit Protoporphyrin IX beim Menschen ausschließlich im malignen Gliomgewebe, dabei auch in infiltrierenden Zellen an. Es läßt sich hingegen nicht im Endothel von Tumor- oder Hirngewebe nachweisen. Zudem ist Protoporphyrin IX nur über 24 Stunden in der Haut nachweisbar, so dass sich eine längerfristige Sensibilisierung der Haut ausschließen lässt. Die Zerstörung von Tumorzellen durch photodynamische Therapie mit 5-ALA erfolgt durch unmittelbare Schädigung der Tumorzellen und nicht indirekt über eine Schädigung des Gefäßendothels. Es wird davon ausgegangen, dass dabei die Mitochondrien als erstes geschädigt werden (Überriegler et al., 1995). Mit 5-ALA sind neurotoxische Wirkungen einer lokalen Photodynamische Therapie, insbesondere durch synergistische Verstärkung der Toxizität von Strahlen- oder Chemotherapie nicht wahrscheinlich (Rick et al., 1997).

5-Aminolävulinsäure ist körpereigenes Substrat der Porphyrinbiosynthese und als Aminosäure selbst nicht fluoreszierend. Malignome setzen mehr oder minder selektiv 5-ALA zu fluoreszierenden Porphyrinen v.a. Protoporphyrin IX, einem Intermediärprodukt der Hämioynthese, um. Seine chemische Struktur bedingt eine intensive Rotfluoreszenz mit Emissionsmaxima bei 635 und 704 nm und einem Absorptionsmaximum bei ca. 400 nm. Auch maligne Gliomzellen sind in der Lage, selektiv exogen zugeführtes 5-ALA in fluoreszierendes Protoporphyrin IX umzusetzen und zu akkumulieren. Unter Fluoreszenzanregung mit blau-violetten Licht ($\lambda = 385 - 440 \text{ nm}$) und entsprechender Beobachtungsfiler ($> 440 \text{ nm}$) stellt sich Tumorgewebe rot dar, während normales Gewebe

keine Protoporphyrin IX-Fluoreszenz zeigt. Das rot fluoreszierende Tumorgewebe kann somit selektiv entfernt werden.

Wie andere Porphyrine wirkt Protoporphyrin IX, neben seinen Fluoreszenzeigenschaften, auch als Photosensitizer. Da sich nach Gabe von 5-ALA der Metabolit Protoporphyrin IX selektiv im Tumorgewebe anreichert, bietet sich eine photodynamische Therapie von infiltrierenden Tumorzellen oder solidem Gliomgewebe als Therapieoption an (Stummer et al., 2000).

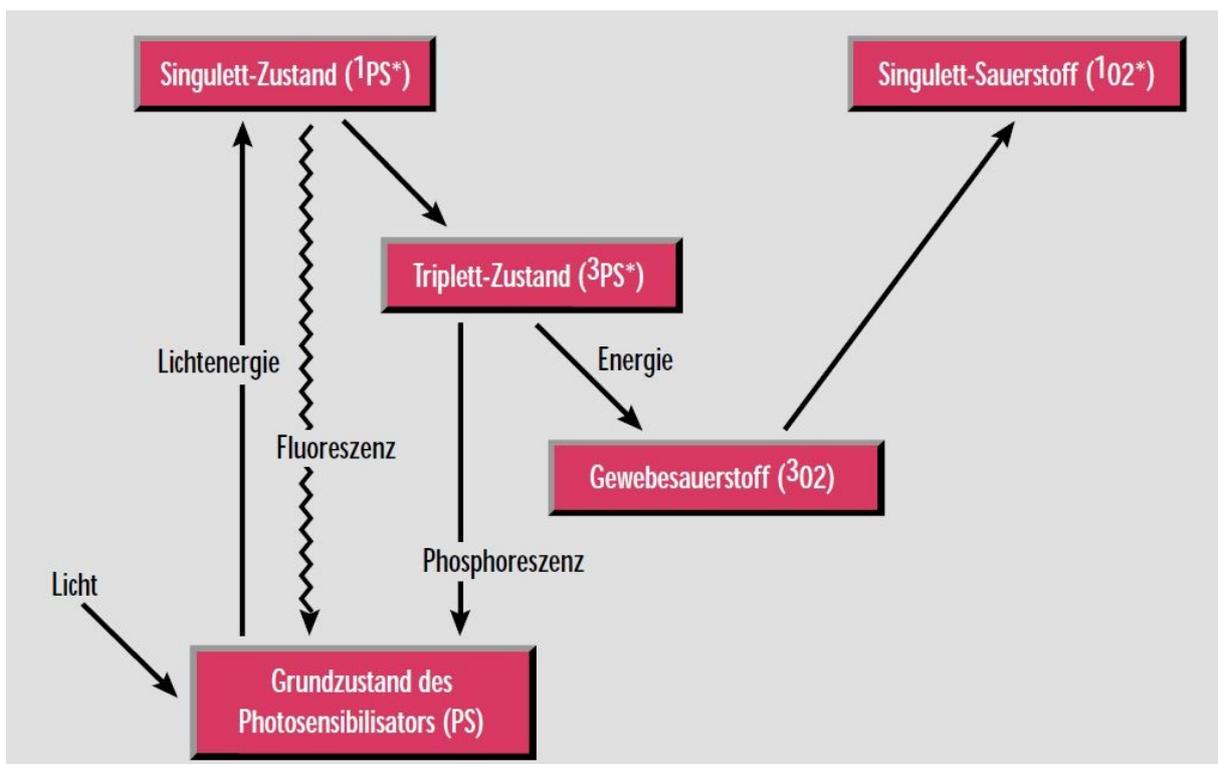


Abbildung 3: Physikochemischer Wirkungsmechanismus der PDT, durch Bestrahlung des Photosensibilisators gibt dieser über den Triplett-Zustand Energie an molekularen Sauerstoff ab, es entsteht hoch-reaktiver Singulett-Sauerstoff (mod. nach Wolf, P).

1.5 Fragestellung

Der unmittelbare Wirkungsmechanismus der ALA-PDT ist trotz Aufdeckung physikochemischer, durch die PDT ausgelöster Vorgänge wie die Bildung radikaler Sauerstoffspezies und Grundlagenexperimente anderer Gruppen bezüglich der biologischen Wirkung weiterhin ungeklärt. Insbesondere der Frage, ob durch eine direkte physikalische Schädigung der Zellen ein nekrotischer Zelltod resultiert oder durch die Schädigung intrazellulärer Moleküle und Strukturen Apoptose induziert wird, soll in dieser Arbeit nachgegangen werden. Hierbei soll besonderes Augenmerk auf die Übertragbarkeit der in den

Zelllinienexperimenten (in-vitro) gewonnenen Erkenntnisse auf die intraoperativ (in-vivo) gewonnenen Proben gelegt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Reagenzien, Kits, Gerätschaften und Software

ABC Staining System Santa Cruz Biotechnology sc-2017 anti-mouse

ABC Staining System Santa Cruz Biotechnology sc-2023 Anti-goat

Ethanol absolut 99,5% p.a.

Ethanol 70% p.a.

AIF – sc-9416, Santa Cruz Biotechnology LOT C1008 goat IgG

AML-193 whole cell lysate, Santa Cruz Biotechnology sc-2204

DAB Substrate – Roche 11718096001 LOT 14200300

CD3 – Santa Cruz Biotechnology sc-59010 Lot D2007 mouse IgG1

CeraLas 635 (BioLitec GmbH, Jena, Germany)

Caspase3 – Santa Cruz Biotechnology sc-1226, LOT J1005, goat IgG

Donkey anti-mouse rhodamine Santa Cruz Biotechnology sc-2300, LOT D0408

DNase 1 REF 10104159001 Roche LOT 14785000

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media)/F-12 – GIBCO/Invitrogen

Donkey anti goat FITC, Santa Cruz Biotechnology sc-2024, LOT L0108

Donkey anti-goat rhodamine Santa Cruz Biotechnology sc-2094, LOT K0807

DPBS - GIBCO 14190 Ref 14190-094

Goat anti-mouse FITC, Santa Cruz Biotechnology sc-2010 LOT D0408

HeLA whole cell lysate – Santa Cruz Biotechnology sc - 2200

In Situ Cell death Detection Kit – Roche 11684817910 – LOT 14492200

Ki67 – Santa Cruz Biotechnology sc23900 LOT H1506 mouse IgG1

Normal donkey serum Santa Cruz Biotechnology sc-2044- LOT H1808

Nikon Eclipse TS100 – Mikroskop

P53 – Santa Cruz Biotechnology sc-71820, LOT J2708 mouse IgG1

Proteinase K – AppliChem A3830,0025, LOT 8K002013

Triton X-100 (Octylphenolpoly(ethyleneglycolether)) – Roche-Cat. No. 11 332 481 001

U87 MG (malignant glioma) - Glioblastom-Zelllinie einer 44-jährigen Frau

U251 MG - Glioblastom-Zelllinie eines 75-jährigen Mannes

U373 – Zelllinie eines anaplastischen Astrozytoms (WHO III°) eines 61-jährigen Mannes

Vectashield Hard Set Mounting Medium with DAPI H-1500

Xylol p.a.

Alle Untersuchungen wurden im neuroonkologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit MS Excel 2003 und SPSS 17, für die Bildbearbeitung kam Corel PhotoPaint X4 zum Einsatz.

Die Versuche begannen mit der Austestung der Möglichkeit, Sphäroide über die Gefrierschnitttechnik auf Objektträger aufgebracht weiteren Untersuchungen zugänglich zu machen. Dies wurde zunächst anhand der Zelllinie U373 mittels HE Färbung evaluiert. Durch Erhöhung der Zahl der Sphäroide pro Versuchsansatz, Verbesserung der Fixierung der Zellen sowie Reduzierung der mechanischen Beanspruchung während des Färbeprozesses konnte die Anzahl der Sphäroide pro Objektträger entscheidend erhöht werden. Im Folgenden wurden zunächst HE, Ki-67, Caspase-3 sowie TUNEL-Färbungen für die jeweiligen Zelllinien durchgeführt. Es folgten aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse in den Zelllinien, die entsprechenden Färbungen an den intraoperativ gewonnenen Proben. Aufgrund der überwiegend negativen Ergebnisse für die Caspasen-Färbungen wurde der Apoptose induzierender Faktor (AIF) als möglicher Promoter einer Caspasen-unabhängigen Apoptose in Betracht gezogen und entsprechend fluoreszenzmikroskopische Färbungen gegen AIF durchgeführt.

2.2 Versuchsaufbau

Grundlegender Gedanke des Versuchsaufbaus ist der Nachweis von Proteinen der Zellzyklus- und Apoptose-Regulation sowie Apoptose-spezifischer DNA-Fragmentation mit dem Ziel, eine direkte physikalische Schädigung der Zelle durch die PDT mit folgender Nekrose von einer Schädigung zellulärer Strukturen und Proteinen mit folgender Apoptose zu unterscheiden.

Hierfür wurde ein Zelllinien-Modell mit humanen Gliomzellen entwickelt. Es wurden drei unterschiedliche Gliom-Zelllinien verwendet, um die Aussagekraft der Versuche zu erhöhen

und eine möglichst generelle Aussage über die stattfindenden Vorgängen treffen zu können. Zusätzlich standen intraoperativ gewonnene Proben ALA-PDT behandelter humaner Gliome zur Verfügung.

2.3 Die ALA-PDT bei Sphäroiden der Zelllinien U87, U251 und U373

Für die in-vitro Versuche wurden drei etablierten, kommerziell erhältlichen Gliom-Zelllinien verwandt und zu Sphäroiden, welche in Kultur von diesen Zelllinien spontan gebildet werden, bis zu einem Durchmesser von ca. 200 μ m kultiviert.

In den Sphäroiden bildet sich aufgrund der mangelnden Diffusion von Nährstoffen durch die peripheren, vitalen Zellschichten eine zentrale Nekrose. Sie bilden dadurch die räumliche und biologische Struktur eines Glioblastoms genauer nach als ein „eindimensionaler“ Zellrasen.

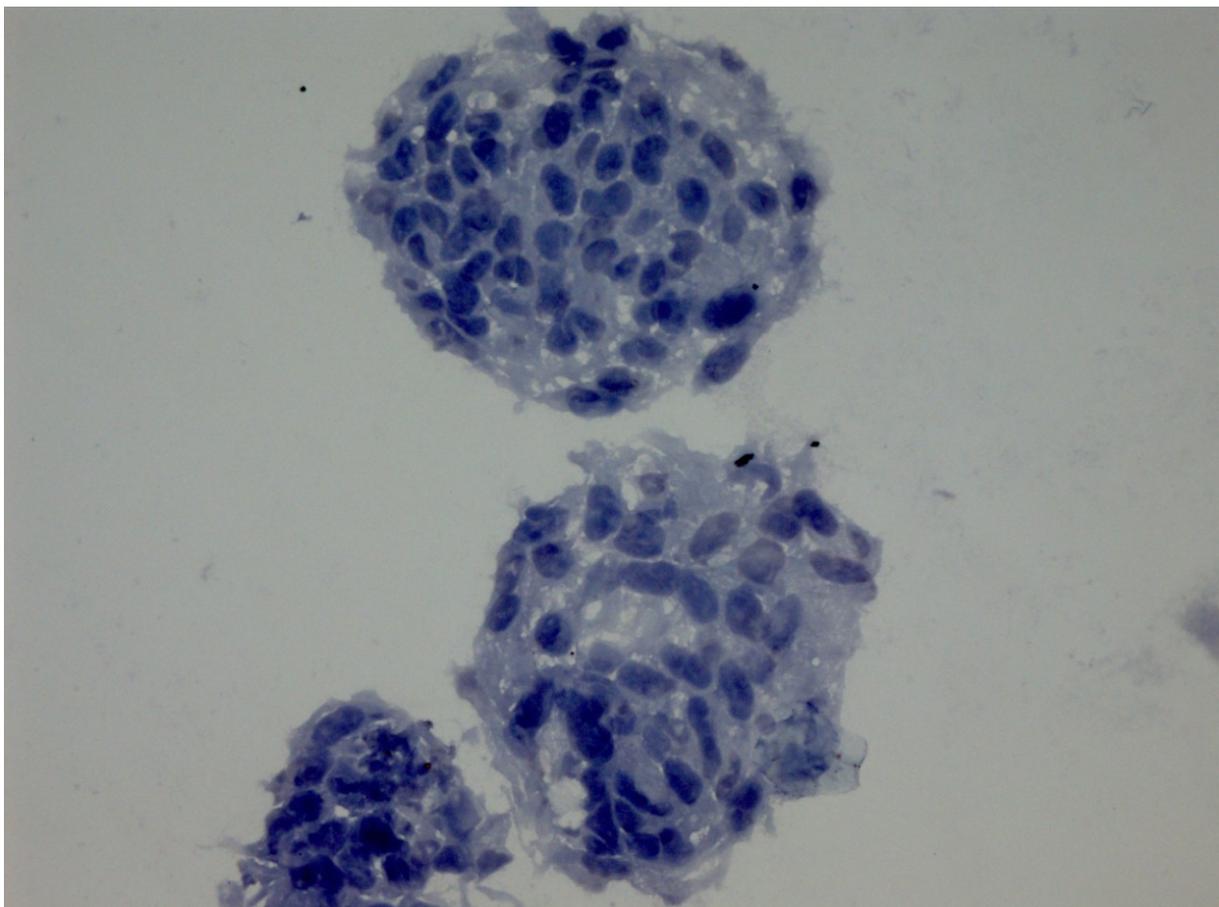


Abbildung 4: Native Sphäroide der Zelllinie U373, Kontroll-Gruppe, Hämalaun-Färbung, 400fache Vergrößerung (eigene Aufnahme)

Die Anzucht der Zellen erfolgte in farblosem DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) (Gibco) mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Natriumpyruvat.

Die Waschschriffe wurden mit DPBS (Gibco) durchgeführt, für das Lösen der Zellen von den Kulturplatten wurden dem DPBS 0,05% Trypsin-EDTA hinzugefügt.

Im Anschluss an die Kultivierung wurden die Zellen in vier Versuchsgruppen unterteilt:

- 1) keine weitere Behandlung der Sphäroide, im folgenden Kontroll-Gruppe genannt,
- 2) Laser-Bestrahlung der Zellen ohne vorherige Inkubation mit 5-ALA, im Folgenden PDT-Gruppe genannt,
- 3) Inkubation der Zellen mit 5-ALA ohne folgende Laser-Bestrahlung, im Folgenden Bestrahlungs-Gruppe genannt,
- 4) Inkubation der Zellen mit 5-ALA und folgende Laser-Bestrahlung, im Weiteren Versuchsgruppe genannt.

Die Inkubation mit 5-ALA erfolgte durch Zugabe von 12,5 µg/ml 5-ALA zum Kulturmedium 30 Minuten vor Weiterbehandlung respektive Ernten der Zellen. Die Laser-Bestrahlung wurde nach Überführung von ca. 100 Sphäroiden auf eine 96-well Platte für 625s mit einer Wellenlänge von 635 nm und einer Leistung von 1 Watt (625 Joule) mit einem CeraLas 635 (BioLitec GmbH) durchgeführt. Dies entspricht einem etablierten Labor-internen Standard zur PDT-Behandlung von Gliom-Sphäroiden (Pannewitz, 2008, unveröffentlichte Ergebnisse).

Im Anschluss wurden die Zellen in Gefrierschnittmedium (TissueTec) überführt, im Kryostat auf 10 µm Dicke geschnitten, auf einen Objektträger gezogen und bis zur weiteren Untersuchung bei -80° Celsius gelagert. Der Zeitraum zwischen Beginn der Bestrahlung und Einfrieren der Zellen lag zwischen 90 bis 120 Minuten.

2.4 Die ALA-PDT in vivo

Nach sorgfältiger Indikationsstellung und Aufklärung der Patienten wurden in den Neurochirurgischen Abteilungen der Universitäten München und Düsseldorf Patienten mit malignen Gliomen mit der ALA-PDT Technik behandelt. Grundlage dieser Therapie war die

Studie „Etablierung der klinischen Anwendung von 5-Aminlävulinsäure zur Photodynamischen Therapie maligner Gliome“, Förderkennzeichen DFG 70-2864, von Dr. rer. Nat. Baumgartner und PD Dr. med. W. Stummer. In allen Fällen handelt es sich um individuelle Heilversuche bei nicht komplett resezierbaren Tumoren aufgrund einer Infiltration funktioneller Strukturen. Einschlusskriterien waren ein Alter zwischen 18 und 60 Jahren sowie eine Karnofsky-Score von mindestens 70 Punkten. Es durften des Weiteren keine Kontraindikationen gegen die Applikation von ALA (z.B. höhergradige Niereninsuffizienz) vorliegen.

Nach oraler Applikation von 20 mg/kg KG in Wasser gelöstem 5-ALA (MedacGmbH, Wedel) 2,5 bis 3,5h vor Narkoseeinleitung erfolgte zunächst die ALA-gestützte Resektion des Tumor in typischer Weise. In den Bereichen, in denen funktionelle Strukturen gefährdet waren, wurde im Anschluss an die Resektion eine PDT durchgeführt. Hierfür wurden Lichtleiter, welche an der Mayfieldhalterung fixiert wurden auf das zu bestrahlende Areal ausgerichtet. An deren Spitze befanden sich an das zu bestrahlende Areal angepasste Licht-Diffusoren. Bei komplexen geometrischen Verhältnissen wurden mehrere Lichtleiter verwendet. Nach Eichung des Systems wurde die Tumoroberfläche mit einer Gesamtdosis von 200 J/cm^2 über eine Dauer von 3600 Sekunden bestrahlt. Die Wellenlänge des Laser (Fa. Ceramoptec) betrug in allen Fällen 635 nm. Diese Wellenlänge hatte sich in Voruntersuchungen im Rahmen oben genannter Studie als am Günstigsten erwiesen. Die Eindringtiefe des Lichts in das solide Tumorgewebe liegt bei dieser Wellenlänge zwischen 2 und 4 mm.

Bei einem Teil der Operationen wurden mit entsprechendem Einverständnis des Patienten, nach Abschluss der PDT, Tumorproben aus den bestrahlten Arealen entnommen und als Paraffinblock asserviert. Diese Proben standen als Untersuchungsmaterial zur Verfügung.

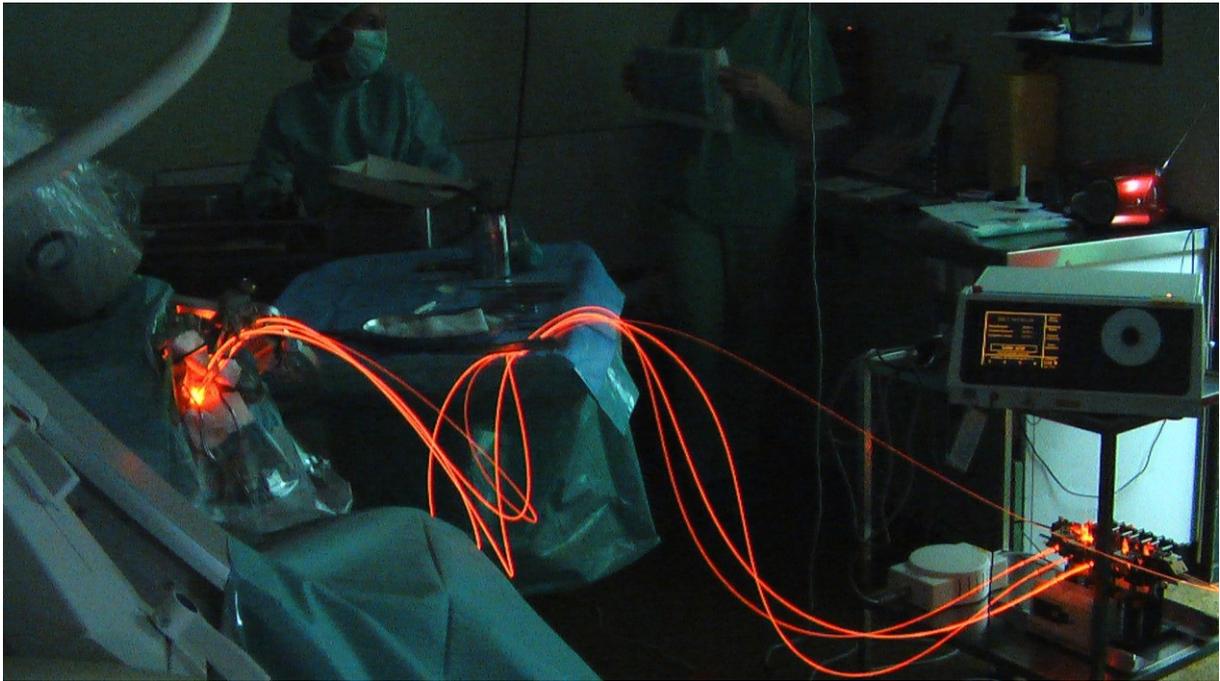


Abbildung 5: Offene PDT während der Bestrahlungsphase, links Kopf des Patienten mit Fixierung der Leichtleiter an der Mayfield-Halterung, rechts Laser und Splitter für die multiplen Fasern (Aufnahme: Prof. Dr. J. Vesper, Neurochirurgie Düsseldorf)

Alternativ zur offenen PDT mit vorhergehender Tumorresektion werden in letzter Zeit auch Patienten mit einer rein stereotaktisch geführten PDT therapiert. Dies ist in Fällen indiziert, in denen selbst eine Teilresektion aufgrund der funktionellen Lokalisation, z.B. bei Hirnstammgliomen, nicht möglich ist. Durch eine Schnellschnittdiagnostik vor Bestrahlungsbeginn erfolgt die Diagnosesicherung, die Planung entspricht der einer Brachytherapie mit einer Gewebseindringtiefe von 2 mm. Diese Methoden werden aktuell im Rahmen individueller Heilversuche auf ihre Wirksamkeit und Sicherheit hin untersucht.

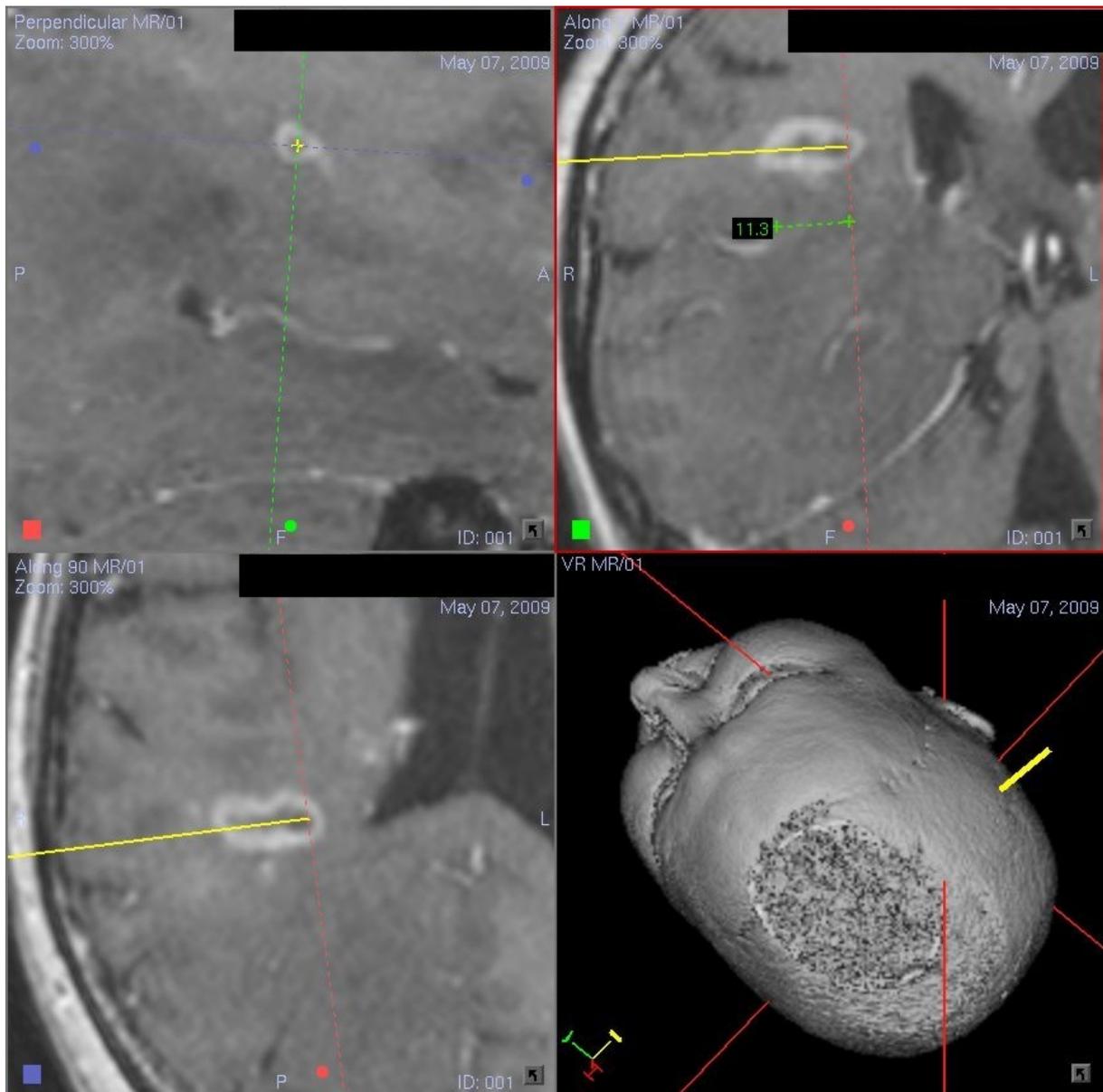


Abbildung 6: Planungsbeispiel einer rein stereotaktischen PDT bei rechts fronto-temporal gelegenem Rezidiv eines anaplastischem Astrozytoms, über die Ausdehnung des Prozesses erfolgt die Auswahl des geeigneten Diffusors (Aufnahme: Prof. Dr. J. Vesper, Neurochirurgie Düsseldorf)

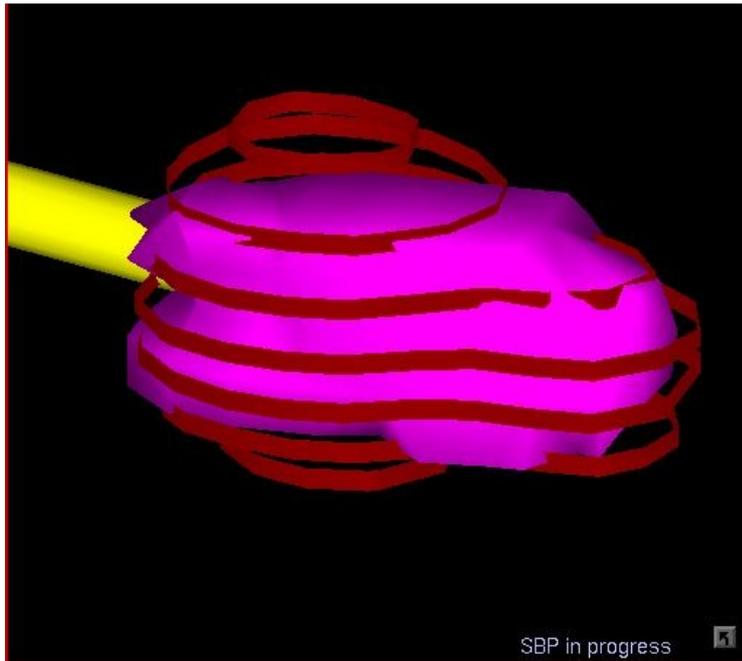


Abbildung 7: Bestrahlungsplanung zum obigen Fall mit errechneter Verteilung der Laser-Leistung im umliegenden Gewebe, Eindringtiefe 2 mm, (Aufnahme: Prof. Dr. J. Vesper, Neurochirurgie Düsseldorf)

	Diagnose	Lokalisation	Geschlecht	Alter bei OP
1	GBM	temporal links	M	49
2	Astrocytom III°	parietal rechts	M	41
3	GBM	parietal rechts	M	67
4	Astrocytom III°	frontal links	M	46
5	Astrocytom III°	cerebellär	W	42
6	GBM	temporal links	W	58
7	GBM	temporal rechts	M	62
8	GBM	temporal links	W	59

Tabelle 2: Übersicht der Patienten, von denen die intraoperativ entnommenen Proben stammen

2.5 Funktionen und Eigenschaften der untersuchten Proteine

2.5.1 Ki-67

Ki-67 ist ein nukleäres Zellzyklusregulatorprotein, dessen Expression eng mit zellulärer Proliferation gekoppelt ist. Genetisch ist Ki-67 beim Menschen 10p-25q kodiert. In ruhenden Zellen (G0-Phase) lässt sich Ki-67 nicht nachweisen. Seine Konzentration steigt im Rahmen des Zellzyklus an und erreicht mit der Mitose sein Maximum.

Eine erhöhte Expression von Ki-67 wurde für zahlreiche solide sowie hämatologische Tumoren nachgewiesen (Sahin et al., 1991), es besteht eine Korrelation zwischen histopathologischen Grading und dem Ki-67-Index, dem Prozentsatz der Ki-67 positiven Zellen (Seigneurin et al., 1991).

Ki-67 wird heute in der Routinediagnostik des GBM zur Darstellung erhöhter mitotischer Aktivität angewandt. Für niedriggradige Gliome ist eine erhöhte Ki-67 Expression mit einer schlechteren Prognose bezüglich des Tumor-spezifischen Überlebens verbunden (Fisher et al., 2002).

Anaplastische Astrozytome zeigen einen Proliferationsindex (Prozentsatz der Ki-67 positiven Zellen) zwischen 5-10%, dieser Anteil steigt in den Grad IV° Tumoren auf 15-20% mit einer weiten Streubreite (Sarkar C et al., 2009).

Ein Abfall der Ki-67 Expression im Anschluss an die PDT konnte 2007 an einem Angiosarkom-Modell durch eine japanische Forschergruppe beschrieben werden (Iizuka et al., 2008).

In dieser Untersuchung wurde ein kommerziell erhältlicher Antikörper von Santa Cruz Biotechnology Inc. verwendet. Es handelt sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper gegen die nukleäre Fraktion der humanen Tumorzelllinie L428, Bestellnummer sc-23900, Chargennummer LOT H1506. Die ideale Verdünnung des primären Antikörpers wurde mit 1:100 bestimmt. Als Positivkontrollen diente HeLa whole cell lysate (sc-2200).

2.5.2 Caspase 3

Caspasen stellen nach bisherigen Erkenntnissen überwiegend Mediatoren der Apoptose dar, über Rezeptoren an der Zelloberfläche oder intrazellulär freigesetzte Botenstoffe werden unterschiedliche Caspasen aus Vorläufer-Proteinen aktiviert. Caspase 3 gilt als spätes Effektor-Protein, durch Spaltung des Vorläufer-Proteins durch Caspase 8 entsteht das aktive Heterodimer. Dieser treibt die Apoptose unter anderem durch die Aktivierung von Gelsolin voran, welches Aktinfilamente spaltet, die Mitochondrienmembran destabilisiert und damit

zur Freisetzung von Cytochrom C führt. Bisherige Untersuchungen zur Rolle der Caspasen bei der PDT der Gliome zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Während in einigen Untersuchungen durchaus eine Aktivierung der Caspasen-Kaskade gezeigt werden konnte (Qi et al., 2002), wurde in anderen Untersuchungen keine Aktivität nachgewiesen (Masami et al., 2008).

Für die Untersuchungen wurde ein monoklonaler Ziegen-IgG-Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology, Bestellnummer sc-1126, Chargennummer LOT J1005 verwendet. Die Verdünnung des primären Antikörpers wurde mit 1:50 bestimmt, als Positivkontrolle diente AML-193 whole cell lysate (sc-2204).

2.5.3 Apoptosis-Induzierender Faktor (AIF)

Neben der Mediation der Apoptose durch die Caspasen gibt es Caspase-unabhängige Apoptose-Induktionswege (Boujrad H., et al., 2007). Eine wichtige Rolle spielt hierbei der Apoptose-Induzierender Faktor, kurz AIF. Es handelt sich um ein phylogenetisch altes Protein, mit einer Masse von circa 65 kDa, welches aus einem 67 kDa Vorläufer-Protein gebildet wird und überwiegend, gemeinsam mit dem Heatshock-Protein 60, in den Membranen der Mitochondrien lokalisiert ist. Die genetische Kodierung liegt auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq24/225). Durch Stimuli, wie oxidativen Stress, wird eine 57 kDa schwere Untereinheit des Proteins freigesetzt (Lorenzo H.K. et al., 1999). Das Protein disloziert nach Aktivierung in das Cytosol und von dort in den Nukleus. Unklar ist bisher, ob AIF dort selbst als DNase fungiert oder indirekt, über eine Aktivierung der Endonuklease G zu einer DNA-Fragmentation mit Bruchstücken von circa 200 kbp (kilo Basenpaaren) Länge führt. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass AIF selbst als DNase aktiv ist. Zusätzlich soll AIF in seiner physiologischen Position innerhalb der mitochondrialen Membran eine Rolle im oxidativen Energiestoffwechsel führen (Porter A G et al., 2006). In Mäusen mit einer reduzierten AIF Aktivität konnte eine erhöhte Anfälligkeit für oxidativen Stress nachgewiesen werden (Klein J et al., 2004).

Klein et al. vermuten eine physiologische Funktion von AIF in der mitochondrialen Membran als Puffer radikaler Sauerstoffspezies. AIF selber besitzt eine DNA-bindende Domäne, durch gezielte Ausschaltung dieser Domäne konnte die pro-apoptotische Wirkung des AIF ausgeschaltet werden (Mate M J et al., 2002).

In der normalen Zelle ist AIF nicht im Zellkern nachweisbar. Eine nukleäre Konzentration von AIF entspricht aktiven apoptotischen Vorgängen.

Besonderes Augenmerk liegt im Rahmen dieser Arbeit auf der direkten Freisetzung von AIF aus den mitochondrialen Membranen als Resultat oxidativen Stresses, da in der Induktion oxidativen Stresses der Wirkungsmechanismus der PDT vermutet wird (Strauss et al., 2008).

Für die Färbungen wurde ein kommerziell erhältlicher monoklonaler Ziegen-Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology verwendet, Bestellnummer sc-9416, Chargennummer LOT C1008. Die ideale Verdünnung des primären Antikörpers wurde mit 1:100 bestimmt, die Positivkontrollen wurden mit AML-193 Zelllysate (sc-2204) durchgeführt.

2.6 Methoden

2.6.1 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung ist ein Standardverfahren der Histologie und dient der lichtmikroskopischen Darstellung zellulärer Proteine. Ihr Vorteil liegt in der hohen Spezifität und einfachen Anwend- und Auswertbarkeit. Zugrunde liegendes Prinzip ist die Markierung eines Antigens mit einem spezifischen Antikörper, welcher über einen Anti-Immunglobulin-Antikörper mit einem Enzym-gekoppelten Antikörper markiert und über die Zugabe eines Enzym-Substrates lichtmikroskopisch darstellbar wird.

Verwendet werden primäre Antikörper unterschiedlicher Tierarten. Als Enzyme kommen die alkalische Phosphatase (AP) oder Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) zum Einsatz. Die Einzelheiten der verwendeten Antikörper sind im Kapitel 2.5 aufgeführt.

Es wurden immunhistochemische Färbekits der Firma Santa Cruz Biotechnology verwendet, in Abhängigkeit der Tierart des primären Antikörpers das ABC Staining System Santa Cruz (sc-2023) anti-goat bei primären Ziegen-Antikörpern oder das ABC Staining System Santa Cruz (sc-2017) anti-mouse bei Maus-Antikörpern.

Beide Systeme verwenden eine biotinylierte Meerrettichperoxidase als Enzym und resultieren in einer braunen Färbung.

Ablauf der immunhistochemischen Färbung:

Vorbereitung Paraffin-eingebetteter Schnitte: zweimaliges Entparaffinieren der Schnitte in Xylol für jeweils 5 min, danach 5 min Waschen in 99,5% Ethanol, zweimal 5 min Waschen in 70% Ethanol, zweimal 5 min Spülen in PBS.

Vorbereitung von Gefrierschnitten: Nach Auftauen bei Raumtemperatur Fixierung der Schnitte in 4% Paraformaldehyd in PBS, 30 min Waschen in PBS, Blocken freier Enzym-Aktivität mit 3% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Methanol, erneutes 5 min Waschen in PBS.

Gemeinsame Endstrecke der Färbung:

1. Permeabilisation der Zellen in 0,1% Triton X-100 mit 0,1% Natriumcitrat bei 37° für 10 min
2. Zweimaliges Spülen mit PBS
3. 24 h Dunkel-Inkubierung mit dem Primärantikörper in einer feuchten Kammer bei 4°C
4. Zweimaliges Spülen in PBS
5. Inkubierung mit dem 1:20 mit PBS verdünnten Link-/Brückenantikörper für 45 Minuten in einer feuchten Kammer bei 20°C und Dunkelheit.
6. Zweimaliges Spülen mit PBS.
7. Inkubierung mit dem Label-/Markerenzym für 45 Minuten in einer feuchten Kammer bei 20°C und Dunkelheit.
8. Zweimaliges Spülen mit PBS.
9. Inkubation mit Chromogen für 20 min bei 20°C in Dunkelheit.
10. Spülen mit Aqua dest.
11. Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Bläuen in handwarmen Leitungswasser bis die gewünschte Farbintensität erreicht ist.
12. Eindecken in Aquamount und lichtmikroskopische Auswertung.

Die jeweiligen Konzentrationen, soweit nicht anders angegeben, richten sich nach den Herstellerangaben, Negativ-Kontrollen wurden über eine Inkubation ohne Zusatz von primärem Antikörper (Schritt 2) durchgeführt.

2.6.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Bereits 1904 wurde von August Köhler die Entdeckung gemacht, dass durch Anregung mit Licht festgelegter Wellenlänge Fluoreszenzen angeregt und die längerwellige Emission detektiert werden kann. Hierüber lässt sich durch Ausblendung nicht gefärbter Bereiche der Zellen eine höhere Ortsauflösung und Sensitivität erreichen. Über Doppelfluoreszenzen lassen sich Rückschlüsse auf funktionelle Zusammenhänge zwischen Proteinen herleiten.

Der Ablauf der Färbung entspricht dem einer immunhistochemischen Färbung, statt Umsetzung eines Farbstoffes durch ein gebundenes Enzym erfolgt hier die Koppelung eines Fluoreszenz-Farbstoffes an den sekundären Antikörper. Als Farbstoffe wurden Fluorescein (FITC), Rhodamine (TRITC) sowie DAPI verwendet. Zur Auswertung diente ein Nikon Eclipse TS100-Mikroskop.

2.6.3 TUNEL-Färbung

Im Rahmen der Apoptose findet im Gegensatz zum Ablauf bei der Nekrose ein gezieltes Cleaving (Zerschneiden) der DNA durch Calcium-abhängige Endonukleasen in Fragmente mit einer konstanten Länge von ca. 180 Basenpaaren (bp) statt. Diese Fragmente entsprechen einem Oligonukleosom, einer DNA-Windung um ein Histon, da die Endonukleasen den DNA-Bereich zwischen den DNA-/Histonkomplexen (linker-DNA) schneiden. Es entstehen mono- und oligonukleosomale DNA-Fragmente. Bei der Nekrose entstehen DNA-Fragmente unspezifischer Länge, da es sich nicht um eine enzymatische Spaltung, sondern um einen Zerfall des Moleküls handelt (Hengartner et al., 2000).

Auf dem Boden dieser Entdeckung wurde erkannt, dass sich über eine Gelelektrophorese apoptotische Zellen als typische DNA-Banden identifizieren lassen. Es entstehen Signale mit konstantem Abstand in Wanderungsrichtung, deren Länge sich über Vergleichs-DNA auf ca. 180 bp bestimmen lässt. Nachteil dieser Methode ist, dass kein in-situ Nachweis möglich ist, Zellpopulationen sich nicht differenzieren lassen und viel Zellmaterial vorliegen muss.

1992 wurde erstmals eine Technik beschrieben, die sich die im Rahmen des gezielten Cleaving freiwerdenden aminoterminalen Hydroxyl-Gruppen zum Nachweis apoptotischer Veränderungen zu Nutze machte. Die Weiterentwicklung dieser Technik ist die TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling). Diese nutzt die TdT (terminale desoxynucleotidyl-Transferase), ein Enzym über das markierte Nukleotide (in diesem Falle

2'-Desoxyuridine 5'-Triphosphat) gezielt an diese freien Hydroxyl-Gruppen angelagert werden. (Negoescu et al., 1996)

Die Nukleotide sind mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt und so direkt auswertbar.

Die TUNEL-Färbung gilt mittlerweile als Standard zum in-situ Nachweis apoptotischer Zellen.

Für die Untersuchungen wurde das In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics, Bestellnummer 11684817910) verwendet, das in diesem Kit enthaltenen dUTP ist mit Fluorescein gekoppelt und erlaubt so eine direkte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung mit einer Anregungswellenlänge von 450-500 nm. Es resultiert eine Grün-Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 515-565 nm.

Alternativ läßt sich über einen Anti-Fluorescein-Antikörper (Schaf-Fab-Fragment), welcher mit Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, eine lichtmikroskopisch auswertbare Färbung erzielen (Converter-POD, im In Situ Cell Death Detection Kit enthalten).

2.6.4 DAPI-Färbung

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, welcher in Adenosin- und Thymin-reichen DNA-Regionen interkaliert und bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 360 nm eine kräftige, blaue Emission mit einer Wellenlänge von ca. 460 nm abstrahlt. Daher findet DAPI Verwendung in der Anfärbung von DNA („Kernfärbung“) und gilt hierfür als spezifisch, wenngleich DAPI auch mit RNA interkaliert. Die resultierende Fluoreszenz fällt deutlich geringer aus und ihr Emissionspektrum weicht leicht vom dem DAPI-markierter DNA ab.

Für die Versuche wurde ein mit DAPI versetztes Eindeckmedium (Vectashield Hard Set Mounting Medium with DAPI, Bestellnummer H-1500, Vector Laboratories) verwendet.

3 Ergebnisse

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden lichtmikroskopisch auf einen erfolgreichen Färbvorgang hin inspiziert, für alle Färbungen wurden entsprechende Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. In Fällen, in denen sich Abweichungen in den Kontrollen zeigten, wurden die Färbungen unter veränderten Färbebedingungen, insbesondere durch Anpassung der Konzentration des primären Antikörpers wiederholt.

Durch Auszählung wurde der Index der positiven Zellen pro 100 Gesamtzellen ermittelt. Bei der Auszählung von Sphäroiden wurden mehrere Sphäroide zusammengefasst.

3.1 Ergebnisse der Zelllinien-Färbungen

Um eine ausreichende Anzahl von Sphäroiden pro Objektträger zu gewährleisten, musste die Anzahl der bestrahlten Sphäroide pro Ansatz von zunächst einigen Dutzend auf ca. 100 Sphäroide pro Ansatz erhöht werden. Durch die Verwendung von Paraformaldehyd zur Fixierung der Zellen und Triton X-100 zur Permeabilisation, ließen sich im Gegensatz zur mechanisch anspruchsvollen Permeabilisation durch Erhitzung auf der Heizplatte oder in der Mikrowelle eine zur Auswertung ausreichende Menge an Sphäroiden auf den einzelnen Objektträgern gewährleisten.

3.1.1 Ki-67 Färbungen der Zelllinien

Ki-67 dient dem Nachweis proliferierender Zellen mit hoher mitotischer Aktivität. Dieser Marker wurde gewählt, um zu zeigen, dass es sich bei den verwendeten Sphäroiden um sich aktiv teilende Zellen handelt und die Vergleichbarkeit der Zelllinien mit den intraoperativ gewonnenen Gliomproben zu unterstreichen. Es erfolgte die lichtmikroskopische Färbung der nativen, unbehandelten Sphäroide. Die Färbungen wurden für jede Zelllinie dreimal wiederholt, angegeben ist der mittlere Ki-67-Index.

Zelllinie	Ki-67 Index, Mittelwert
U373	35%
U87	31,7%
U251	25%

Tabelle 3: mittlerer Ki-67-Index der einzelnen Zelllinien, Kontroll-Gruppe, die Ergebnisse entsprechen vitalen Zellen mit einer hohen mitotischen Aktivität

3.1.2 Caspase 3 Färbungen der Zelllinien

Caspase 3 als Effektorcaspase spielt eine zentrale Rolle in der Caspasen-abhängigen Apoptose. Es wurden lichtmikroskopische Färbungen für alle jeweiligen Gruppen der untersuchten Zelllinien durchgeführt. Es zeigte sich bei allen Zelllinien eine sehr geringe

Aktivität in der Kontroll-, ALA- sowie PDT-Gruppe mit <1%. In der Versuchsgruppe zeigt sich eine Aktivität von maximal 5% der untersuchten Zellen.

Zelllinie	Kontroll-Gruppe	ALA-Gruppe	PDT-Gruppe	Versuchs-Gruppe
U373	<1	<1	<1	5
U87	<1	<1	<1	5
U251	<1	<1	<1	5

Tabelle 4: Prozentsatz der Caspase 3 positiven Zellen, lichtmikroskopische Auswertung, aufgeschlüsselt nach Zelllinie und Versuchsgruppe

Die entsprechenden Positiv-Kontrollen mit AML-193 whole cell lysate zeigten einen erfolgreichen Ablauf des Färbeprozesses, in den negativ Kontrollen ohne Zusatz primären Antikörpers zeigte sich keine Aktivität.

Diese Ergebnisse lagen weit unter denen der apoptotischen Zellen. Es ist daher anzunehmen, dass ein Caspasen-unabhängiger Prozess für die Apoptose-Induktion verantwortlich ist.

3.1.3 Ergebnisse der TUNEL-Färbungen der Zelllinien

Die TUNEL-Methode dient heute in Ihrer weiterentwickelten Form als sicherer und valider Test für apoptotische Zellen. Für die hier dargestellten Ergebnisse wurden, nach zahlreichen Vorversuchen mit Erhöhung der Sphäroidzahl und Veränderung der Vorbehandlung die Versuche jeweils dreimal wiederholt.

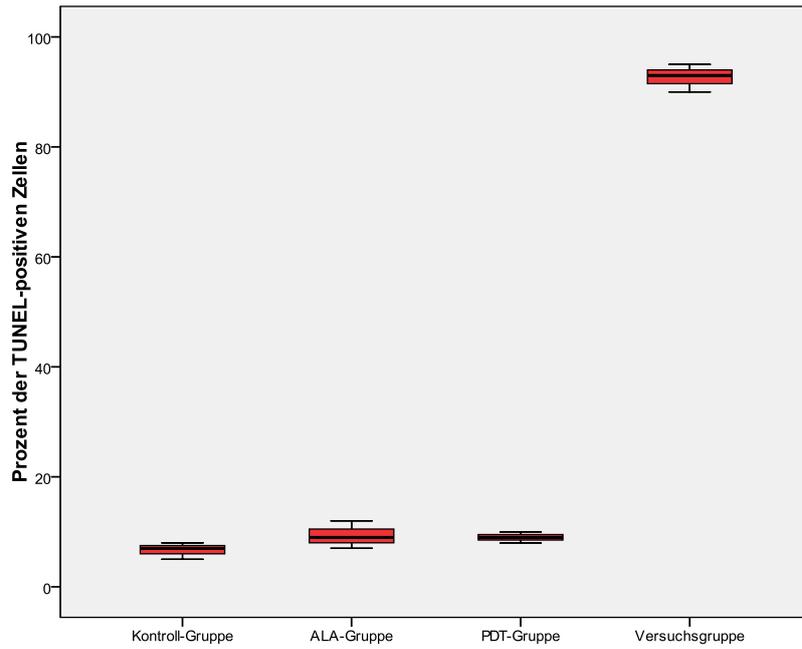


Abbildung 8: Ergebnisse der TUNEL-Färbungen der Zelllinie U373, dargestellt für die einzelnen Gruppen

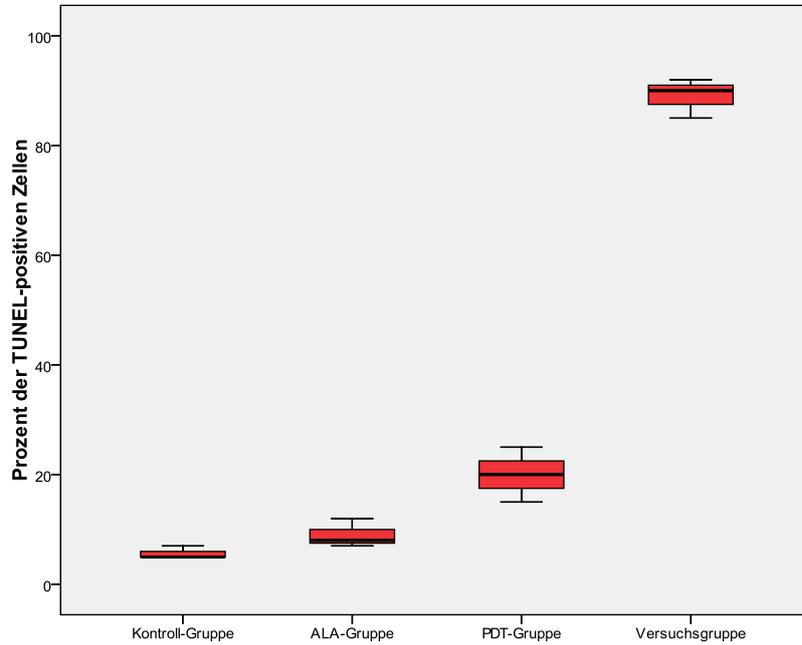


Abbildung 9: Ergebnisse der TUNEL-Färbungen der Zelllinie U87, dargestellt für die einzelnen Gruppen

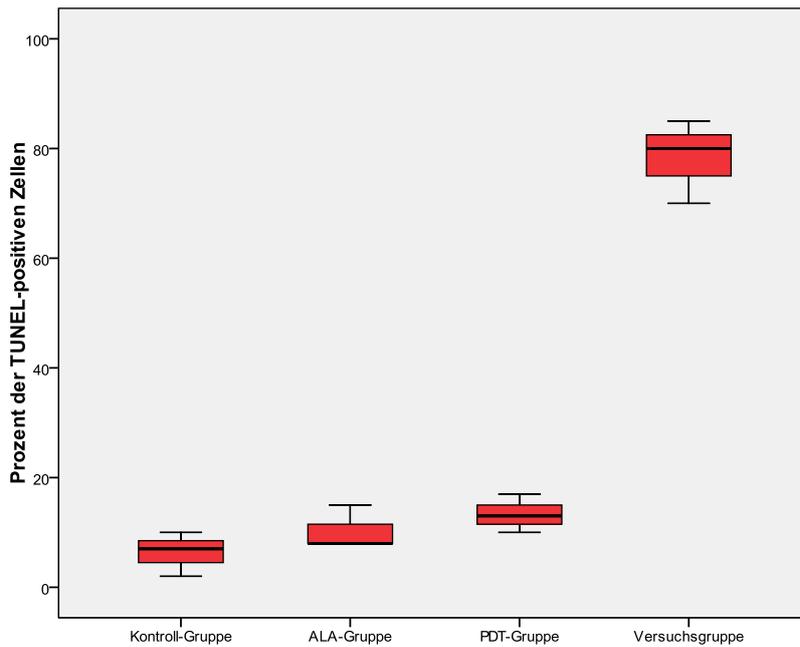


Abbildung 10: Ergebnisse der TUNEL-Färbungen der Zelllinie U251, dargestellt für die einzelnen Gruppen

Für alle drei Zelllinien konnte ein deutlicher Effekt der ALA-PDT auf den Anteil der TUNEL-positiven Zellen nachgewiesen werden. In der Kontroll-Gruppe fand sich ein stabil niedriger Prozentsatz apoptotischer Zellen, in der ALA- bzw. PDT-Gruppe stiegen die Zahlen leicht an. Dies ist möglicherweise ein durch das „Picken“, also das Sortieren der Sphäroide aus der Zellkulturflasche und die damit verbundenen mechanische Beanspruchung verursachter Effekt. Die Zellen der Kontroll-Gruppe werden, da sie keiner weiteren Behandlung unterzogen werden, nicht gepickt. Der in den nativen Sphäroiden gefundene Prozentsatz TUNEL-positiver Zellen scheint einer natürlichen, apoptotischen Population zu entsprechen. Eine weitere Behandlung dieser Frage erfolgt im Teil „Diskussion“.

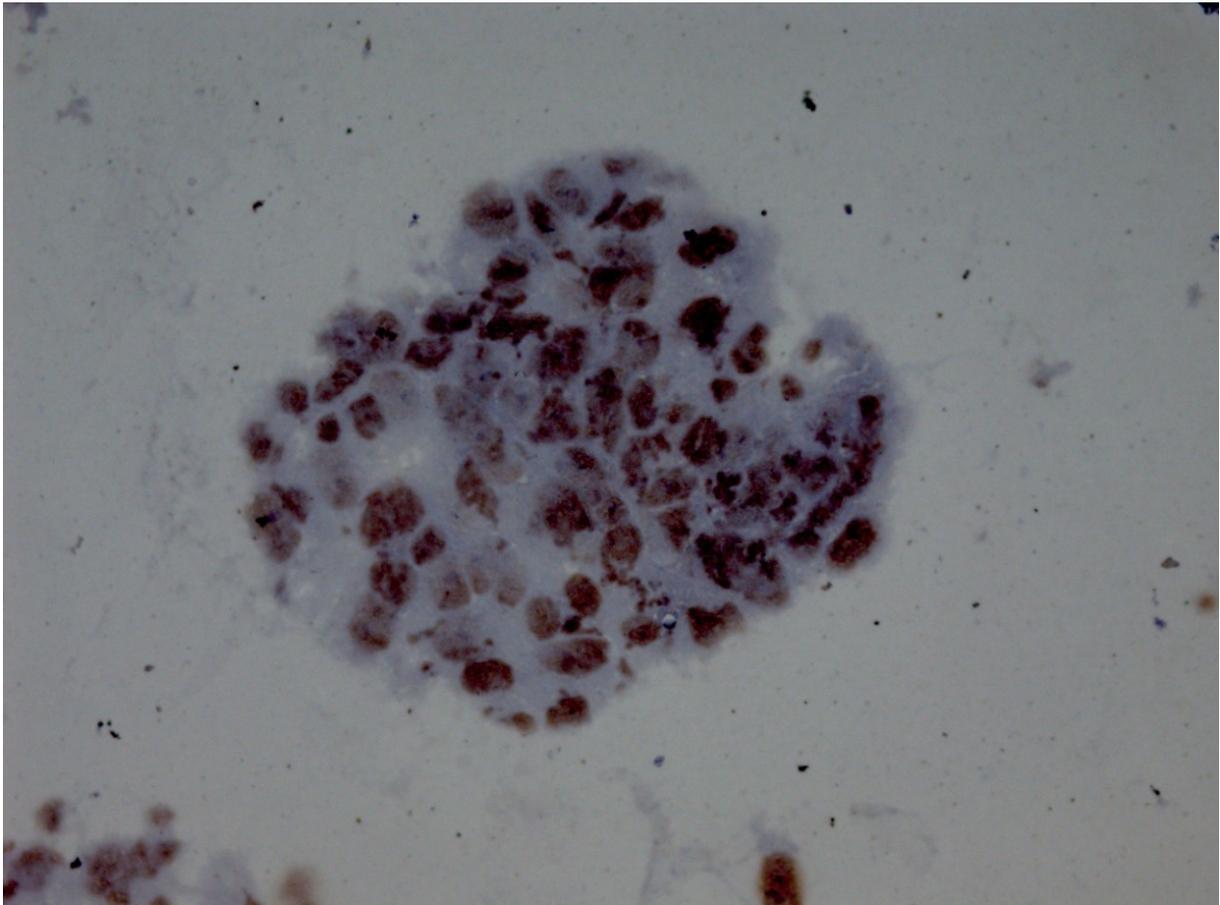


Abbildung 11: U373-Sphäroid der Versuchsgruppe, lichtmikroskopische TUNEL-Färbung, Gegenfärbung mit HE, die Zellkerne färben zu annähernd 100% positiv an, 400fache Vergrößerung (eigene Aufnahme)

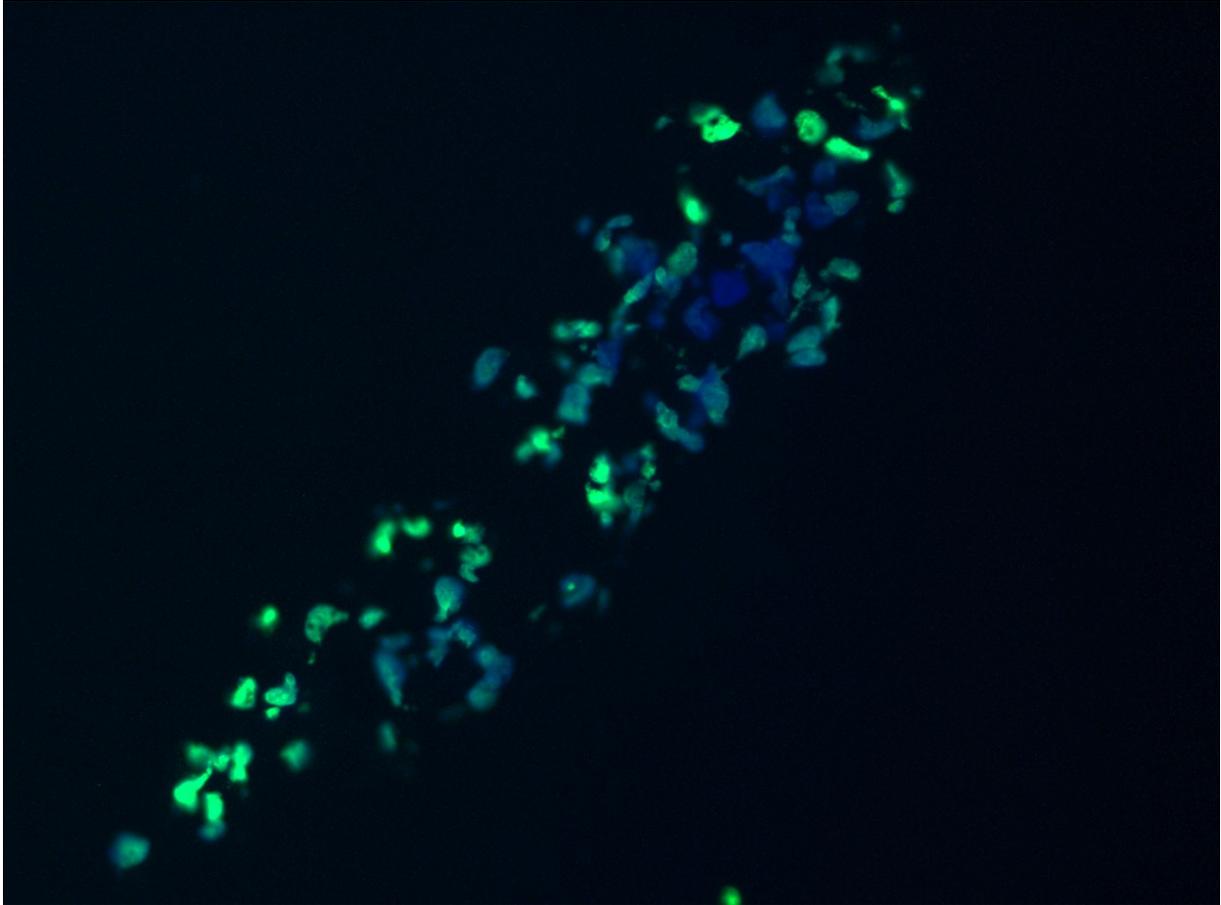


Abbildung 12: U87-Sphäroid der Versuchsgruppe in der Fluoreszenzmikroskopie: Doppelfärbung für DAPI (blau) und TUNEL (grün), Overlayimage, die TUNEL-Färbung projiziert sich über die DAPI-Anfärbung intakter DNA, 400fache Vergrößerung (eigene Aufnahme)

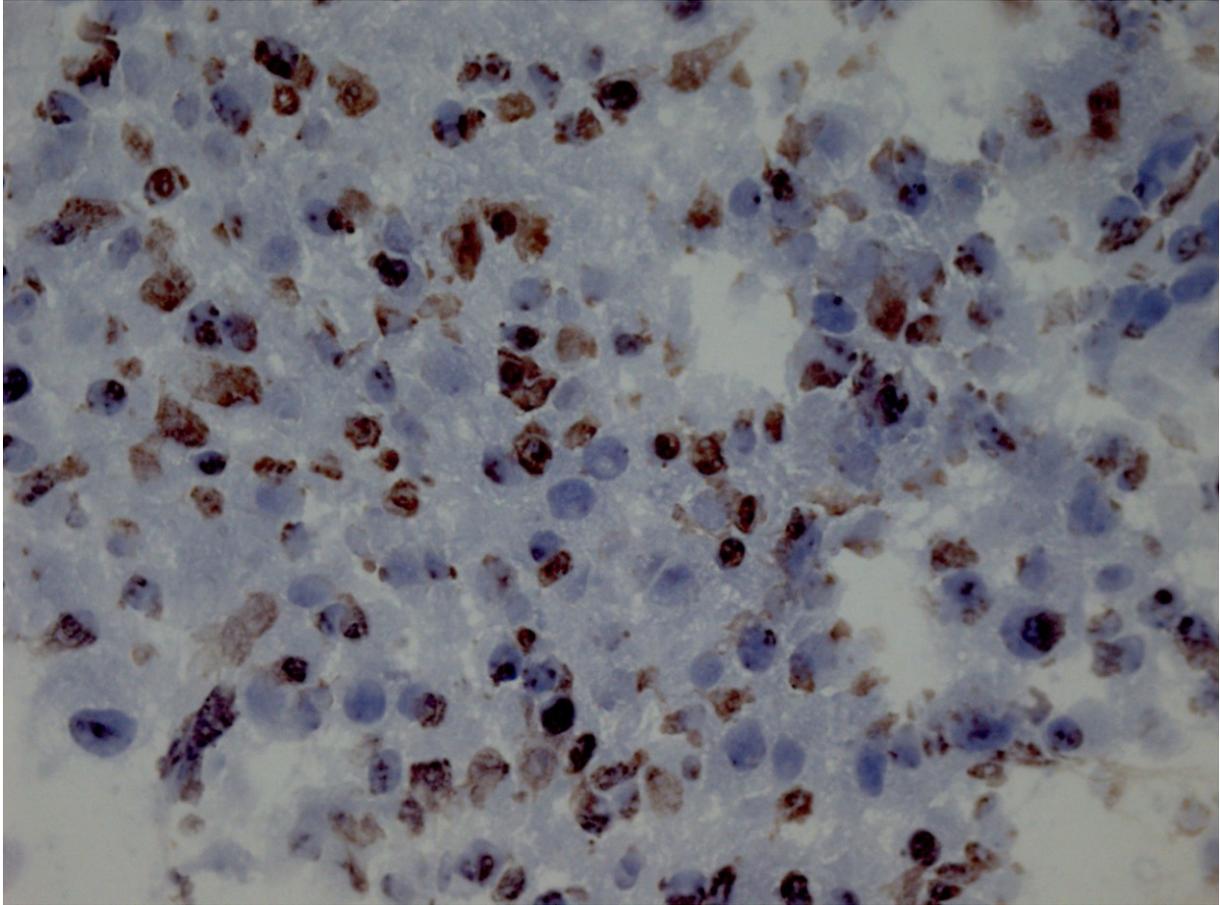


Abbildung 13: U87-Sphäroid der Versuchsgruppe, lichtmikroskopische TUNEL-Färbung, Gegenfärbung mit HE, ca. 90% der Zellkerne färben positiv an, 400fache Vergrößerung (eigene Aufnahme)

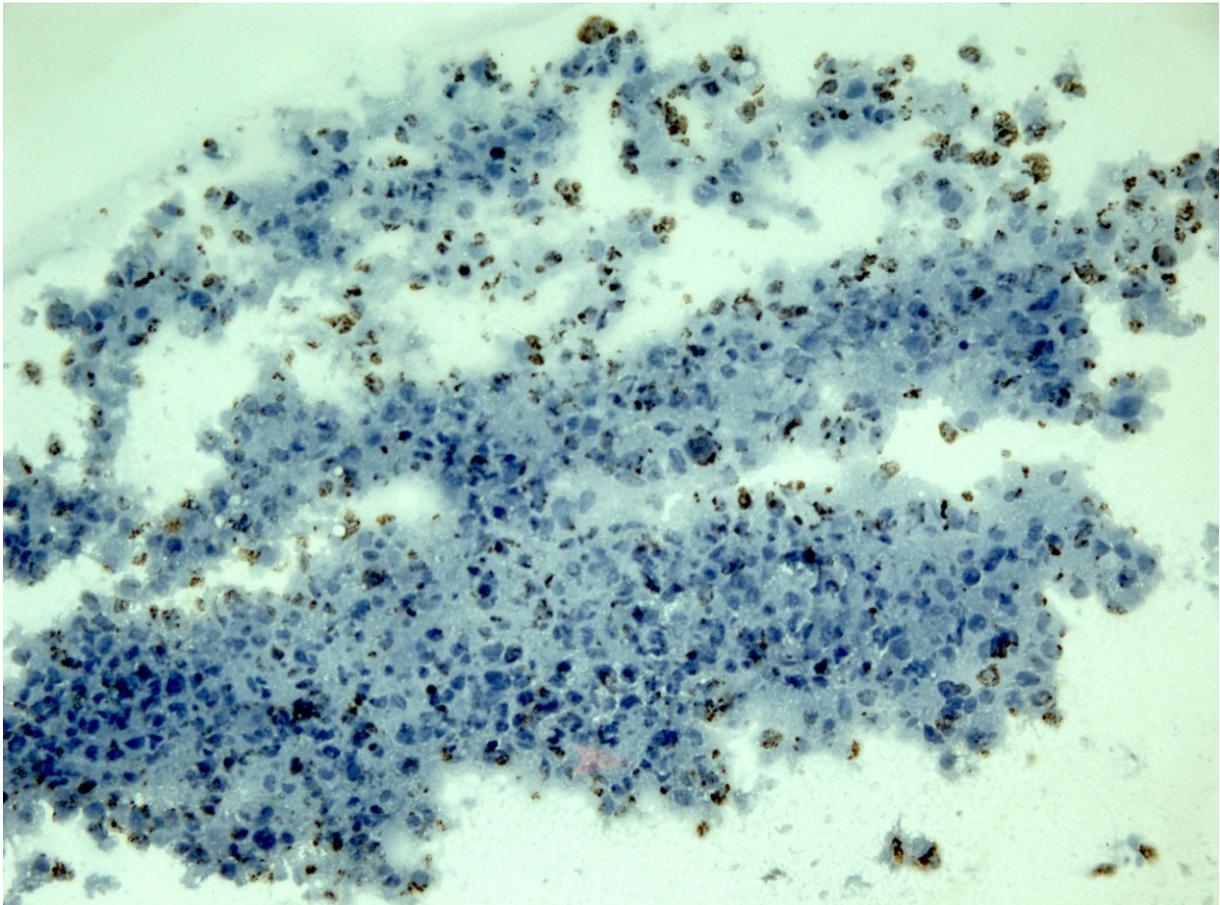


Abbildung 14: Konglomerat von U87-Sphäroiden der PDT-Gruppe, lichtmikroskopische TUNEL-Färbung, Gegenfärbung mit HE, ca. 20% der Zellkerne färben positiv an, 200fache Vergrößerung (eigene Aufnahme)

3.1.4 Ergebnisse der Zelllinien-Färbung für AIF

AIF kommt in allen Zellen als in der Mitochondrienmembran gebundenes Protein vor. Im Rahmen der Aktivierung durch apoptotische Signale transloziert es in den Kern. Dies konnte exemplarisch an Sphäroiden an der Zelllinien U373 und U87 nachgewiesen werden.

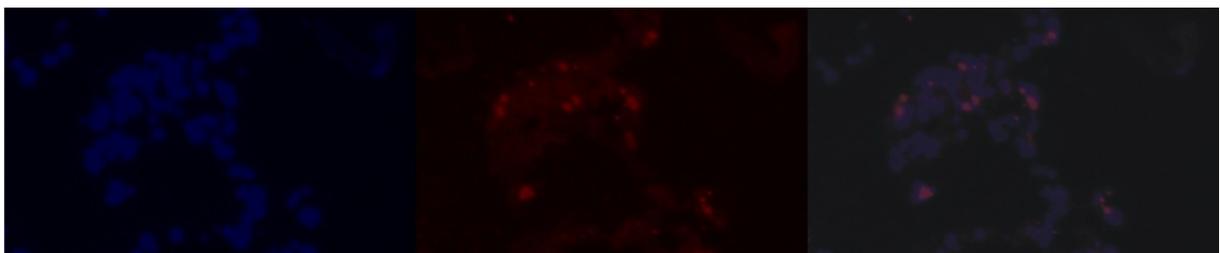


Abbildung 15: U373-Sphäroid der Versuchsgruppe, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, DAPI-Färbung gegen nukleäre DNA (blau, links), AIF-Färbung mit Rhodamin (rot, mitte), Overlayimage rechts mit nukleärer Anreicherung von AIF, 400fache Vergrößerung (eigene Aufnahme)



Abbildung 16: U373-Sphäroid der Kontroll-Gruppe, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, DAPI-Färbung gegen nukleäre DNA (blau, links), AIF-Färbung mit Rhodamin (rot, mitte), Overlayimage rechts, keine nukleäre Anreicherung von AIF, 400fache Vergrößerung (eigene Aufnahme)

3.2 Ergebnisse der Färbungen intraoperative gewonnener Proben

Dem Konzept der Arbeit folgend, wurden an den intraoperativ gewonnenen Proben die gleichen Färbungen durchgeführt wie an den Zelllinien um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Im Gegensatz zu den Zelllinienpräparaten handelte es sich bei den intraoperativen Proben um in Paraffin eingebettetes Material, die Vorbehandlungen differieren daher. Die Proben wurden unmittelbar an die Behandlung entnommen, die Zeit zwischen Bestrahlung und Fixierung der Proben in Formalin betrug 15-30 Minuten und entsprach damit der Zeit zwischen Bestrahlung und Fixierung der Zelllinien, um eine Vergleichbarkeit beider Gruppen zu gewährleisten.

3.2.1 Ergebnisse der Ki-67 Färbungen der intraoperativ gewonnenen Proben

Die Ki-67 Färbungen wurden ebenfalls an den intraoperativ gewonnenen Proben durchgeführt, um den Nachweis zu erbringen, dass es sich um Tumorgewebe handelt. Die erwarteten Ki-67-Expressionen sollten unterhalb des Niveaus normalen, unbestrahlten Tumorgewebes liegen, da die Zellen durch die PDT in ihrer mitotischen Aktivität gestört sein sollten.

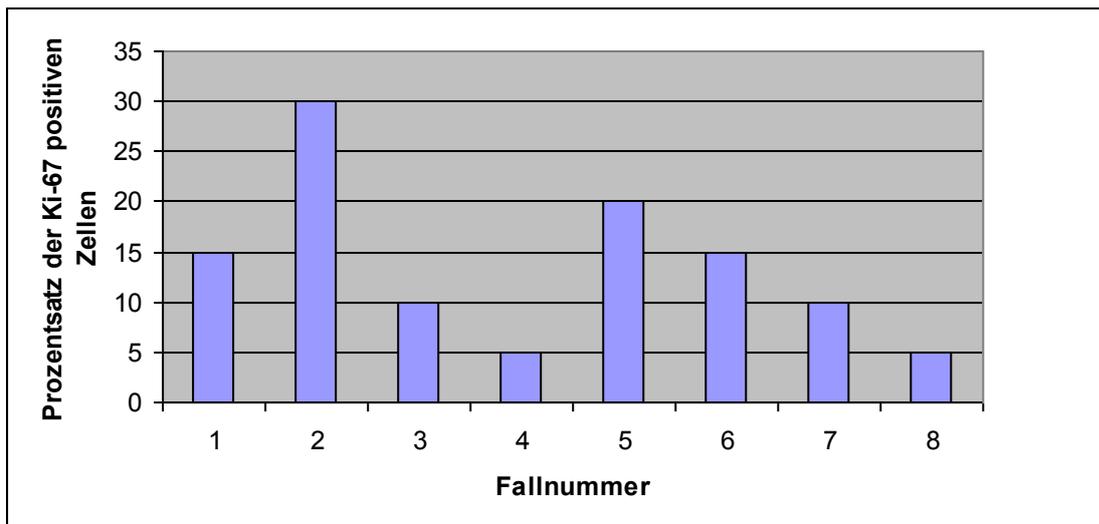


Abbildung 17: Auswertung des Ki-67-Index in intraoperativ gewonnenen Proben, der mediane Proliferationsindex liegt mit 12,5% unter den erwarteten Ergebnissen für nicht PDT-behandelte Tumoren

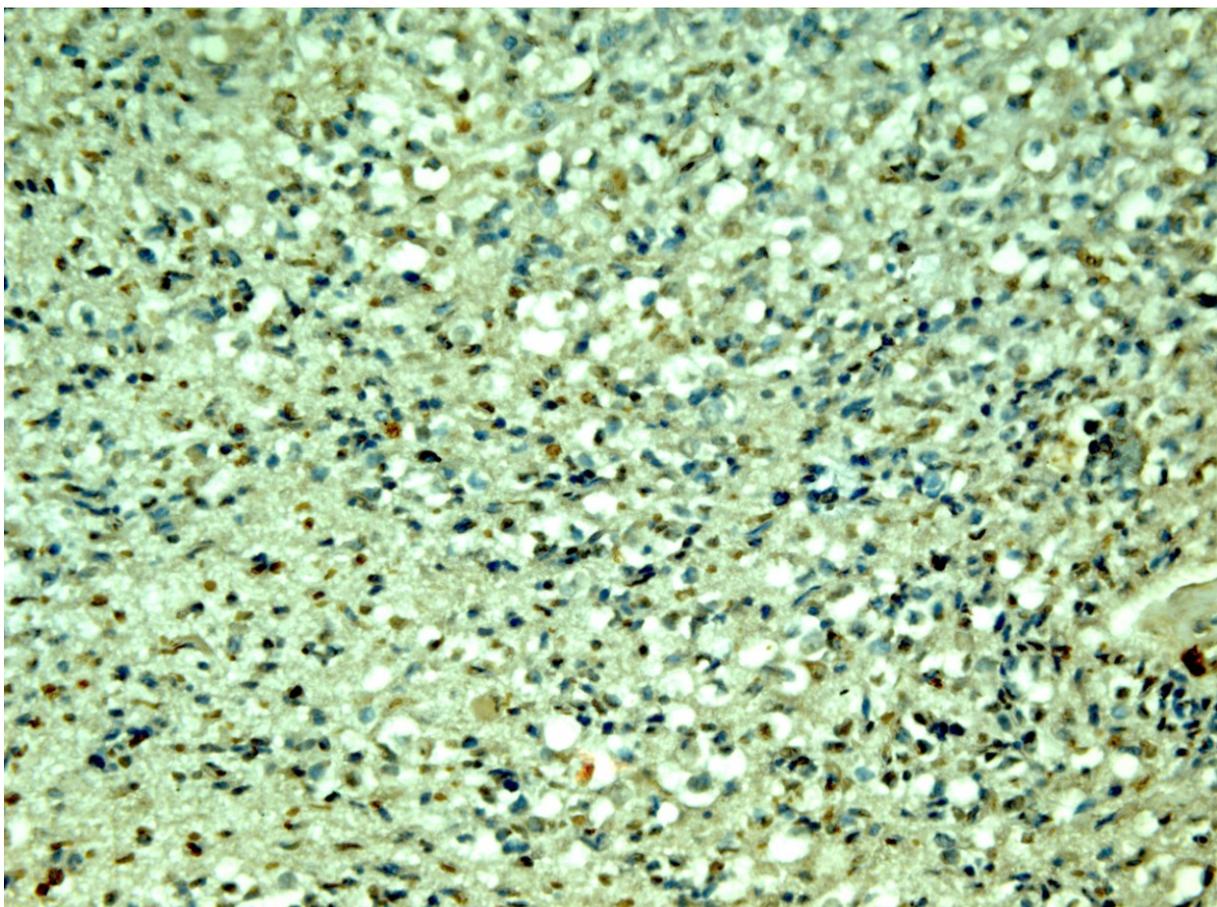


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Ki-67 Färbung, intraoperative Probe Fall 2, Gegenfärbung mit HE, ca. 30% der Zellen färben positiv für den Proliferationsmarker an, 200fache Vergrößerung (eigene Aufnahme)

3.2.2 Ergebnisse der Caspase-3 Färbungen intraoperativ gewonnener Proben

Caspase-3 spielt als Effektorcaspase eine zentrale Rolle in der Caspasen-abhängigen Apoptose-Induktion. Das aktive Enzym wird bei Aktivierung nicht synthetisiert, sondern, überwiegend durch Caspase-8 aus einem Proenzym in den aktiven Heterodimer gespalten.

Die Caspase-3 Expression betrug in allen untersuchten Proben weniger als 7%, in der Mehrzahl der Proben war keine erhöhte Caspase-3 nachweisbar. Dies bestätigt eine vorherige Untersuchung zu diesem Thema (Masami Y. et al., 2008).

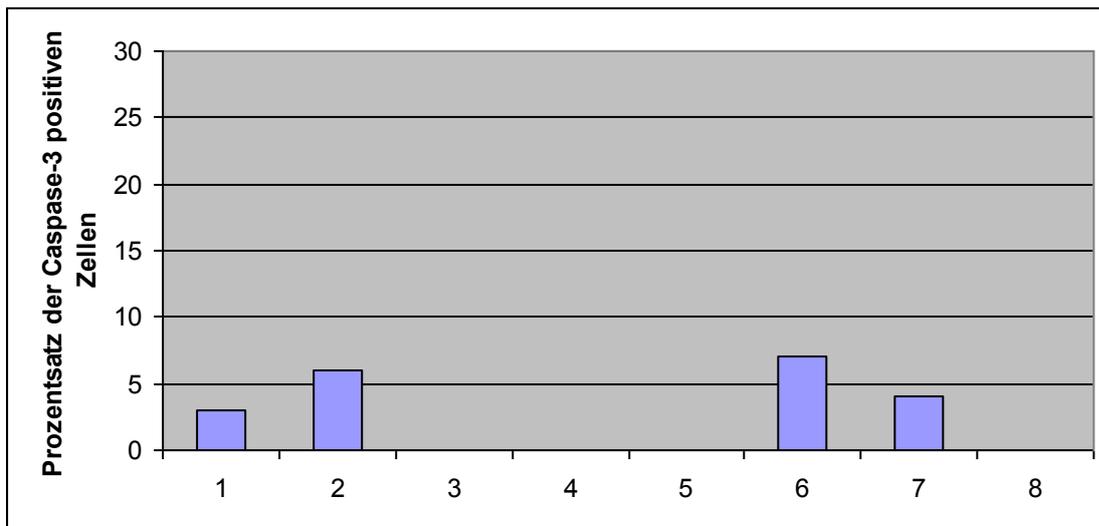


Abbildung 19: Caspase-3 Index der intraoperativ gewonnenen Proben den jeweiligen Fallnummern zugeordnet, (Median: 1,5%).

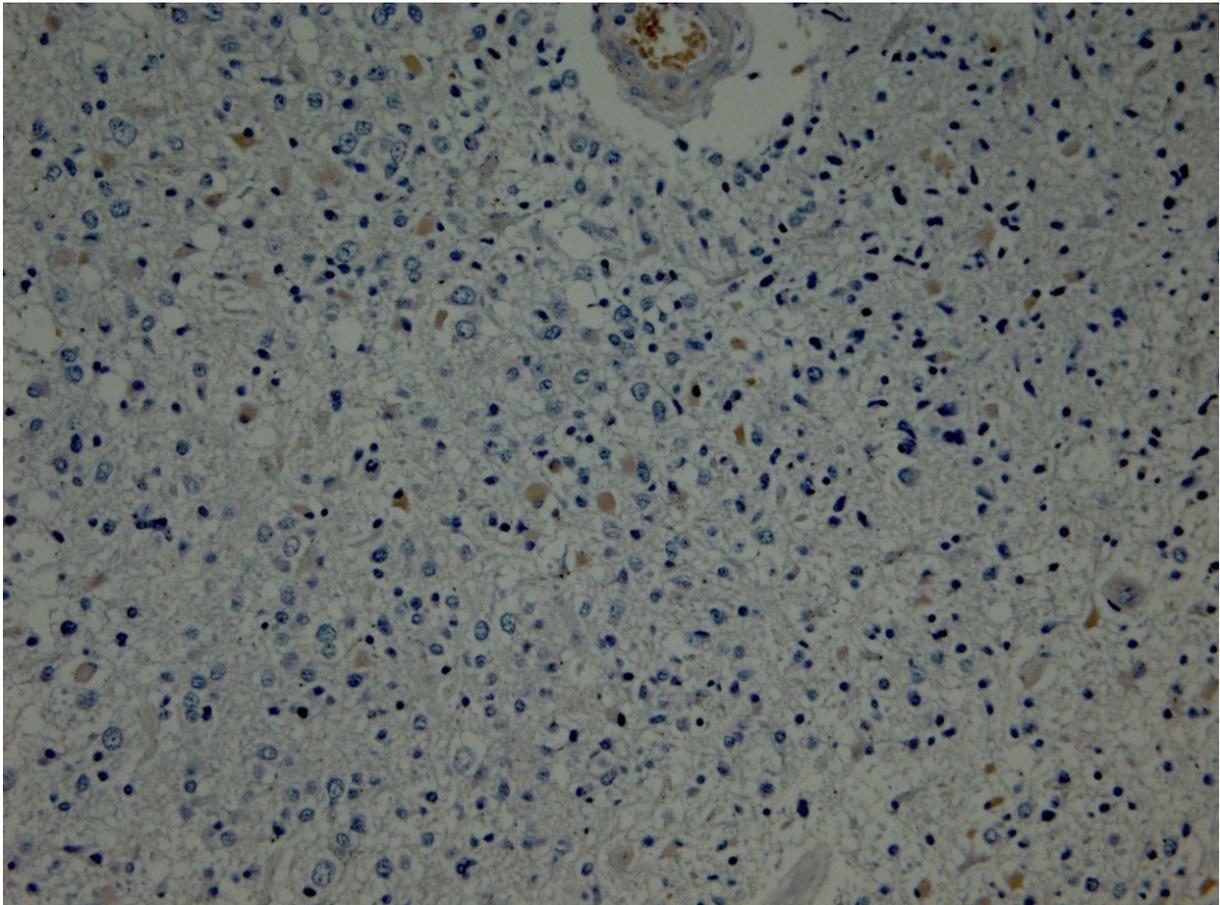


Abbildung 20: Lichtmikroskopische Caspase-3 Färbung der intraoperativen Probe Fall 1, Gegenfärbung mit HE, ca. 3% der Zellen färben positiv für Caspase 3 an, 200fache Vergrößerung (eigene Aufnahme)

3.2.3 Ergebnisse der TUNEL-Färbung intraoperativ gewonnener Proben

Die TUNEL-Färbung der intraoperativ gewonnenen Proben erfolgte nach dem unter Material und Methoden beschriebenen Protokoll, welches dem Protokoll der Herstellerfirma entspricht. Zur Auszählung wurden Bereiche der Schnitte ausgewählt, welche anhand ihres mikroskopischen Aspektes sicher Tumorgewebe zuzuordnen waren. Die Probengröße variierte sehr stark zwischen kleinen, von der Größe her stereotaktischen Proben entsprechenden Präparaten mit einigen hundert Zellen bis zu knapp 0,5x0,5 cm großen Gewebestücken. Die Verarbeitung und Färbung des Materials gestaltete sich, obwohl bis zu fünf Jahre zwischen Probengewinnung und Aufarbeitung lagen, problemlos.

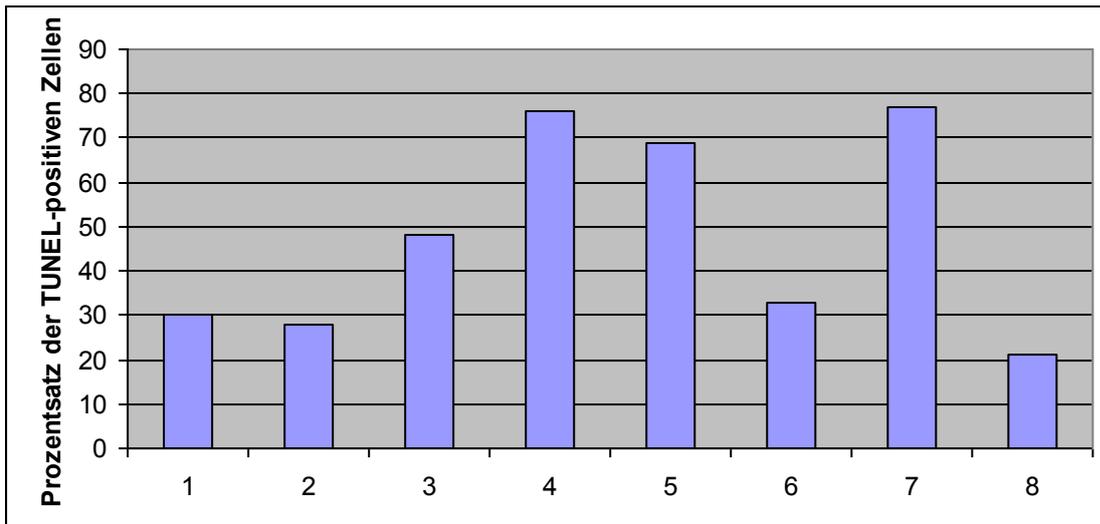


Abbildung 21: Prozentsatz der TUNEL-positiven Zellen in den intraoperativen Proben, den jeweiligen Fallnummern zugeordnet, Median 40,5%.

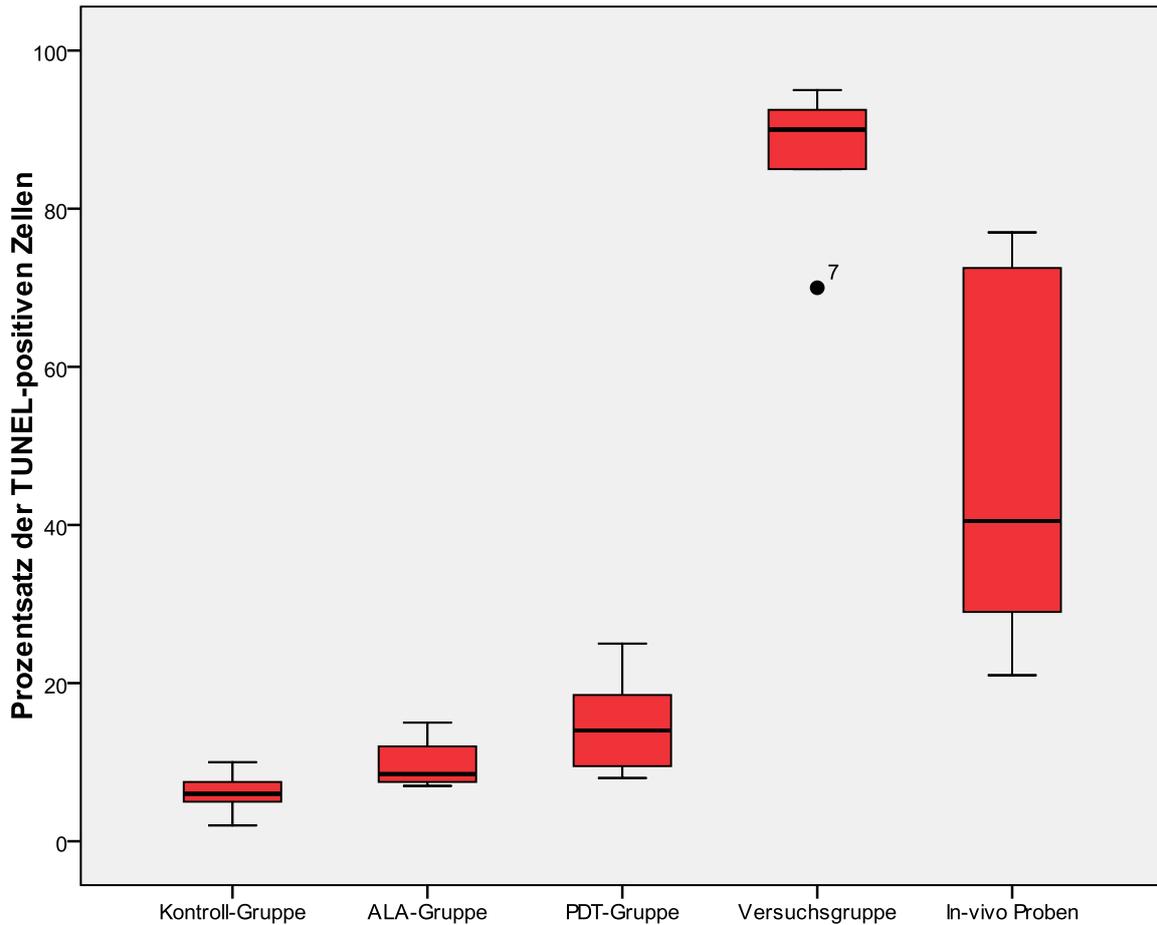


Abbildung 22: Boxplot der TUNEL-Ergebnisse für Zelllinien und in-vivo Proben gemeinsam dargestellt, die Ergebnisse der drei Zelllinien sind in den jeweiligen Gruppen zusammengefasst, der Anstieg der TUNEL-positiven Zellen in den Zelllinien-Versuchen ist im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe mit $p=0,008$ signifikant (Wilcoxon matched pairs-Test)

Es findet sich in allen Proben deutliche apoptotische Aktivität mit bis zu 75% TUNEL-positiven Zellen. Gesundes ZNS-Gewebe in hinreichender Größe zur Vergleichsauswertung des Einflusses der ALA-PDT fand sich in den Proben nicht. Erfolgreiche Negativ und Positiv-Kontrollen zur Dokumentation des korrekten Versuchsaufbaus wurden durchgeführt.

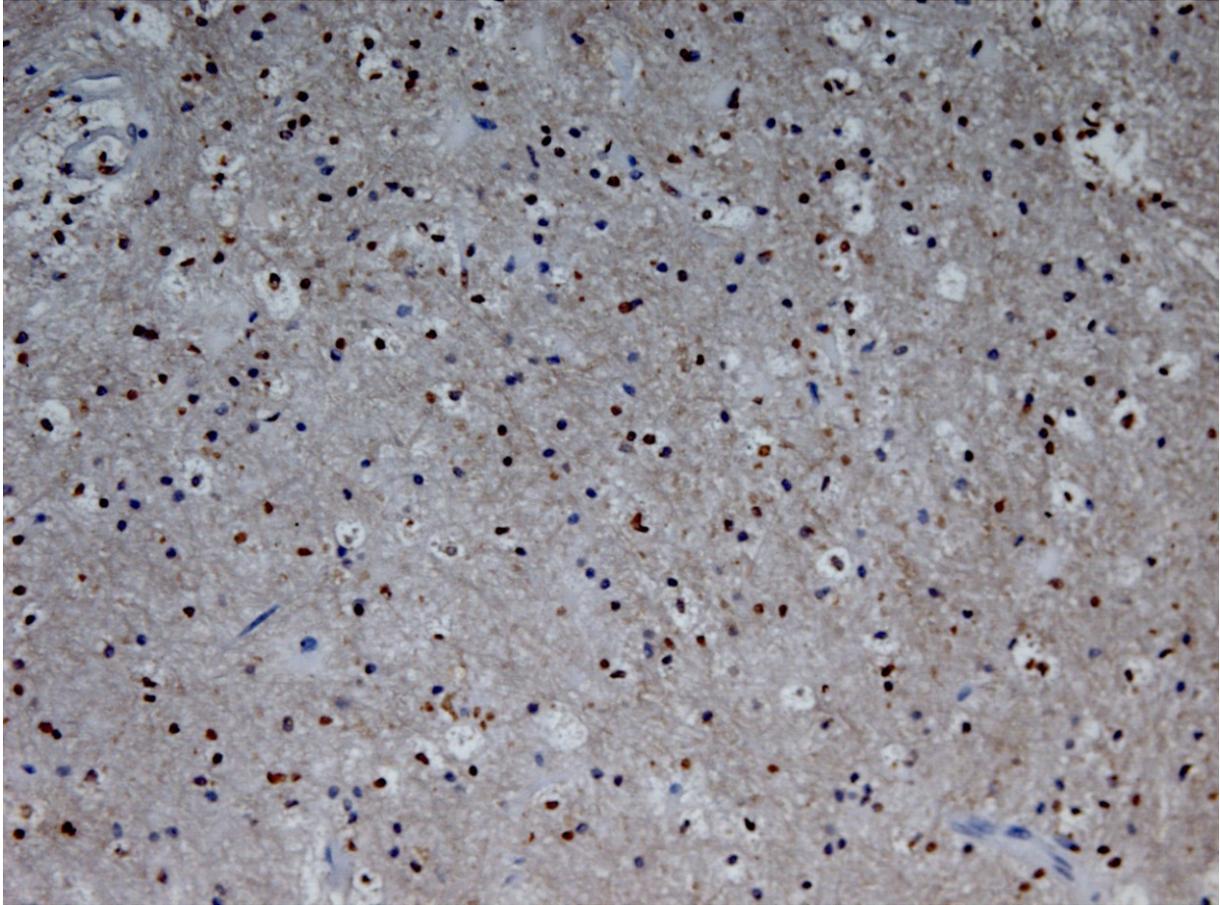


Abbildung 23: TUNEL-Färbung der intraoperativ gewonnenen Probe Fall 3, ca. 50% der Zellkerne färben sich positiv mit der TUNEL-Methode an, 200fache Vergrößerung (eigene Aufnahme)

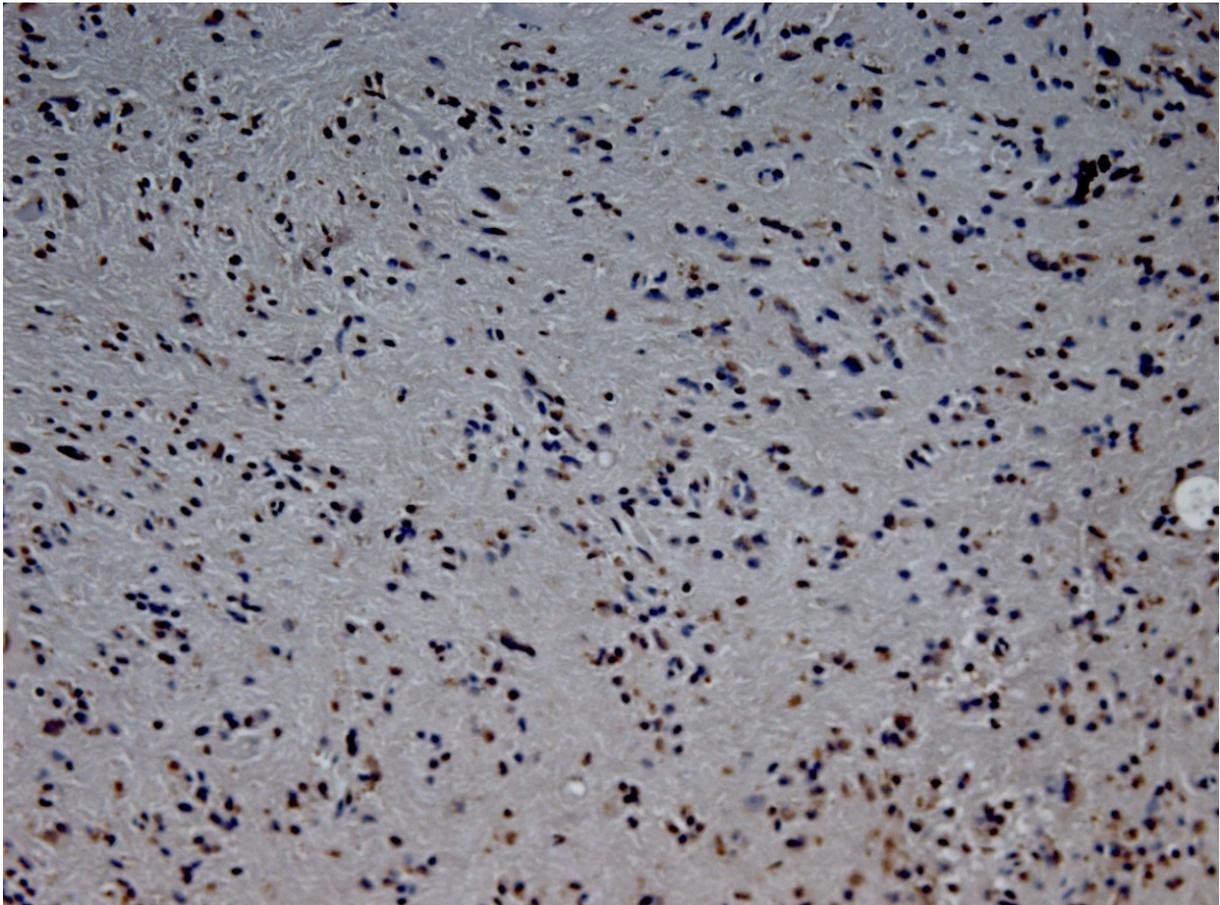


Abbildung 24: TUNEL-Färbung der intraoperativ gewonnenen Probe Fall 7, ca. 70% der Zellkern färben sich positiv mit der TUNEL-Methode an, 200fache Vergrößerung (eigene Aufnahme)

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Aufgrund der ähnlich gefassten Rahmenbedingen wie Bestrahlungsdauer, Wellenlänge des Laserlichtes, Zeit zwischen Bestrahlung und Asservierung der Zellen, Konzentration und Auswahl des Photosensitizers und Abstammung der Zelllinien von malignen Gliomen sind in-vitro und in-vivo Gruppe vergleichbar. Diese Annahme wird durch die ähnlichen Ergebnisse der Ki-67 Expression nochmals unterstützt. Bei beiden Gruppen handelt es sich um rasch proliferierende Tumoren, der Ki-67 Index ist in der Zelllinien-Population erwartungsgemäß höher, da hier nicht die behandelten Zellen sondern die nativen Sphäroide gefärbt wurden und die Zellen unter idealen Kulturbedingungen wachsen konnten.

Die Ergebnisse der Caspase-3 Färbungen zeigen in beiden Gruppen überwiegend negative Ergebnisse mit fehlender oder sehr geringer Aktivität. Die möglichen Gründe hierfür werden ausführlich im Diskussionsteil abgehandelt.

Vergleicht man die Ergebnisse der TUNEL-Färbungen der Zelllinien untereinander wird ein weitestgehend homogenes Verhalten erkennbar. Der Anteil der TUNEL-positiven Zellen kann durch die ALA-PDT signifikant gesteigert werden ($p < 0.001$, t-Test), im Vergleich der ALA- und der PDT-Gruppe mit der Kontroll-Gruppe ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Vergleicht man die zusammengefassten Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen, ergibt sich auch für den Vergleich Kontroll-Gruppe/ALA-Gruppe eine Signifikanz ($p = 0,043$), ebenso für den Vergleich Kontroll-Gruppe/PDT-Gruppe ($p = 0,008$). Zwischen der ALA-Gruppe und der PDT-Gruppe besteht ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p = 0,031$) (Wilcoxon matched pairs-Test).

4 Diskussion

Den Schwerpunkt der Glioblastom-Therapie stellt weiterhin die möglich vollständige Resektion des Tumors dar, der positive Einfluss einer Vollresektion auf das Gesamtüberleben ist nachgewiesen (Pichlmeier et al., 2008). Es findet sich jedoch regelmäßig eine Infiltration von Gliomzellen weit in das umliegende Hirngewebe, daher sind adjuvante Therapiekonzepte notwendig (Teodorczyk et al., 2009). Als adjuvante Standardtherapie wurde in den letzten Jahren die kombinierte Radio-Chemotherapie mit Temozolomid etabliert (Stupp et al., 2005). Ist eine Kompletresektion aufgrund benachbarter eloquenter Areale nicht möglich oder verbietet sich eine Resektion aufgrund der Tumorlokalisation ganz fehlen bisher erfolversprechende Therapiekonzepte (Pereira et al., 2008; Claes et al., 2007).

In diesen Fällen bietet die PDT die Möglichkeit der Nachbestrahlung der Resektionshöhle nach erfolgter Teilresektion. Durch eine stereotaktisch geführte PDT lassen sich solide Tumoranteile an chirurgisch nicht zugänglichen Lokalisationen therapieren.

Die Wirkungsmechanismen der PDT zu ergründen stellt einen wichtigen Baustein für die Etablierung dieser Therapie dar; nicht nur in Hinblick auf die Wirksamkeit, sondern insbesondere für die Sicherheit der Patienten.

4.1 Wirkungsnachweis der ALA-PDT

Vor dem Nachweis des Wirkungsmechanismus steht der Nachweis der Wirksamkeit und, damit verbunden, der Nachweis der Sicherheit der Methode. In den Versuchsaufbau wurden daher, neben der Kontroll-Gruppe ohne weitere Behandlung, die Gruppe der nur mit ALA versetzten und die Gruppe der nur Laser-bestrahlten Sphäroide integriert.

Durch diesen Aufbau sollten alleinige Effekte durch die Inkubation mit ALA bzw. die Laser-Bestrahlung ausgeschlossen und die selektive Wirksamkeit nachgewiesen werden.

In unseren Untersuchungen besteht ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem Anstieg der apoptotischen Zellen zwischen Kontroll- und ALA bzw. Kontroll- und PDT-Gruppe.

Dieser Anstieg ist konstant in allen Zelllinien nachweisbar und am ehesten als Folge der mechanischen Beanspruchung durch das Picken der Zellen zu werten.

Es wurde von Fukami die Frage aufgeworfen, ob die Bestrahlung mit einer relevanten Hitzeentwicklung einhergeht und ein Teil der Apoptosen damit zu erklären ist. Dies ist nicht vollständig von der Hand zu weisen. So konnten Fukami et al. bei ihren Versuchen zur Hyperthermie-Behandlung humaner Gliom-Zelllinie (unter anderem auch U251) nachweisen, dass es bereits bei einer Hitze-Behandlung von 45° und 47°C über eine Stunde zu einer relevanten Apoptose-Induktion mit Translokation von AIF kommt. (Fukami T, et al., 2004).

Da auch in der ALA-Gruppe ein Anstieg der Apoptosen zu beobachten ist, vermuten wir einen zusätzlichen Effekt durch die mechanische Beanspruchung und den zeitweisen Nährstoffentzug der Zellen während der Sortierung und Auszählung.

Ähnliche Effekte wurden von Zelenkov et al. an einem C6-Sphäroid-Modell beobachtet (Zelenkov P, 2007).

Eine physikalische Schädigung mit nekrotischen Zelluntergängen konnte in unseren Versuchen insbesondere im Vergleich der Laser-bestrahlten Zellen mit den nativen Sphäroiden nicht beobachtet werden.

Von der Mitbeteiligung solcher und ähnlicher Effekte abgesehen zeigt sich in unseren Versuchen konstant eine relevante und signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellen in der Versuchsgruppe.

In der Gruppe der in-vivo Proben liegt der medianen TUNEL-Index mit 40,5% weit über dem für unbehandelte humane Glioblastome gegebenen Median von 1% (Kuriyama et al., 2002).

Ein augenscheinlicher Unterschied zwischen dem Ansprechen der anaplastischen Astrozytome und der Glioblastome auf die ALA-PDT fand sich in unserem Kollektiv nicht. Die hohe Streubreite der TUNEL-Indizes der intraoperativen Proben (21-77%) kann neben unterschiedlichem Ansprechen der Tumoren auf die PDT auch die unterschiedliche Entfernung von der Lichtquelle und damit der verbundenen Bestrahlungsintensität herrühren. Eine generelle Aussage über das Ausmaß der Apoptose-Induktion durch die in-vivo PDT kann daher nicht getroffen werden.

4.2 Wie wirkt die ALA-PDT in der Zelle

Grundlegendes Prinzip der Photosensitizer ist die Aufnahme von Lichtenergie, der Photosensitizer geht in den Singulett-Zustand über und kann die aufgenommene Energie in Form von Licht als Fluoreszenz wieder abgeben oder in Form einer photooxidativen Reaktion, überwiegend vom Typ II über einen Zwischenschritt (Triplet-Zustand) auf molekularen Sauerstoff übertragen (Plaetzer K et al., 2003). Der Sauerstoff tritt daraufhin aus seinem normalen Triplet-Zustand in den Singulett-Zustand ($^1\text{O}_2$) über, in dieser Form ist er hoch reaktiv. (Dougherty TH et al., 1992, Landthaler M et al., 1993). Bevorzugter Reaktionspartner in Form einer Oxidation sind Amino- und Fettsäuren, was gerade Zell- und Organellmembranen und intrazelluläre Proteine sehr anfällig für die Schädigungen macht.

Daher wurde lange vermutet, dass in einer primären Schädigung der Zellmembran mit folgender Nekrose der Wirkungsmechanismus der PDT zu suchen sei. Die für Apoptose typischen Veränderungen der Zellmembranen mit Ausstülpungen und Vesikelbildung, sowie die „Aufblähung“ (blebbing) der Organellen wurden dabei als primäre Membranschädigungen fehlinterpretiert (Pass HI et al., 1993).

Kessel et al. konnten bereits 1998 zeigen, dass unterschiedliche Photosensitizer in unterschiedlichen Zellkompartimenten konzentrieren und ein rascher Zelltod nur bei den Photosensitizern zu beobachten ist, welche sich in den Mitochondrien anreichern (Kessel D et al., 1998).

In ihren Untersuchungen zum Einfluss der PDT mit HAL, einem chemisch eng verwandten Hexylester des ALA bei humanen Lymphom-Zellen konnten Furre et al. 2006 zeigen, das Protoporphyrin-IX, welches auch Endprodukt des ALA-Stoffwechsels ist, überwiegend in den Mitochondrien akkumuliert, da die Synthese von Protoporphyrin-IX in den Mitochondrien stattfindet (Uberriegler K P et al., 1993).

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit der ROS geben Peng et al. eine Diffusionsreichweite dieser Moleküle von weniger als 20 nm (ein Mitochondrium ist 2-4µm lang und 1µm hoch) an, der Schaden der durch diese Substanzen entsteht, liegt damit in unmittelbarer Nähe ihrer Quelle (Peng Q et al., 1996).

Neuere Untersuchungen zu diesem Thema legen den Schluss nahe, dass es aufgrund der Akkumulation von ROS zu einem Zusammenbruch der mitochondrialen Atmungskette und in Folge zu einer Öffnung der mitochondrialen Membran als Ausgangspunkt der Apoptose kommt. Eine direkte Schädigung der mitochondrialen Membran durch die PDT scheint nicht wesentlich beteiligt zu sein, da selektiv Poren der Mitochondrienmembran geöffnet werden. So kommt es zunächst zu einer Freisetzung von AIF aus der äußeren Membran, bevor intraorganelle Proteine wie Cytochrome c freigesetzt werden (Susin et al., 1998, Gottlieb, 2000, Green et al., 2000)

Unsere Ergebnisse belegen, dass sowohl in allen drei untersuchten Zelllinien, als auch in den intraoperativ gewonnenen Proben Apoptose und nicht Nekrose für den Zelluntergang nach der ALA-PDT verantwortlich ist. Die fehlende adäquate Aktivierung der Caspasen-Kaskade und die Freisetzung von AIF legen den Schluss nahe, dass die Mitochondrien den primären Wirkungsort der PDT darstellen.

4.3 Der Faktor Zeit

Furre et al. konnten 2006 in ihrer Arbeit zum Einfluss der PDT in Lymphom-Zellen nachweisen, dass es bereits 15 Minuten nach der PDT zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials mit begleiteter Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien kommt. Gleichzeitig kam es zu einer Freisetzung von AIF aus der äußeren Mitochondrienmembran, nach einer Stunde lies sich kein AIF mehr in den Mitochondrien nachweisen, nach zwei Stunden war die maximale nukleäre Anreicherung von AIF erreicht. Zwar zeigte sich auch ein Anstieg der Konzentration an aktivierter Caspase-3 und -9, aber erst zu späteren Zeitpunkten. Bei Blockung der Caspasen-Aktivität fand die Apoptose in unverändertem Ausmaß und Geschwindigkeit statt (Furre et al., 2006). Die Autoren schlussfolgerten, das es zwar zu einer Aktivierung der Caspasen im Rahmen der ALA-PDT kommt, diese aber der Apoptose durch AIF verspätet folgt und für den Ablauf nicht notwendig ist.

Unsere Versuchsreihen unterstreichen diese Ergebnisse. Der rasche Eintritt einer massiven Apoptose, sowohl in den Zelllinien als auch in den intraoperativ gewonnenen Proben, deutet darauf hin, dass eine Caspasen-unabhängige Apoptose über den mitochondrialen pathway stattfindet.

4.4 Die Rolle der Caspasen

Die interessanteste Untersuchung zu diesem Zusammenhang wurde wiederum von Furre et al. über die Bedeutung der Caspasen bei der PDT von Lymphom-Zellen durchgeführt. Die Zellansätze wurden mit einem bekannten Caspase-Hemmstoff (z-VAD.fmk) behandelt und in zwei Versuchsgruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurde mit einer PDT zugeführt, die andere wurde mit Camptothecin, einem bekannten Induktor Caspasen-abhängiger Apoptose behandelt. Es resultierte keine Apoptose-Induktion in der zweiten Gruppe, während die Zellen der PDT-Gruppe in gleichem Ausmaß apoptotisch wurden, wie nicht mit z-VAD.fmk behandelte. Die Autoren schließen hieraus das Caspasen im Rahmen der PDT zwar aktiviert werden, für den Ablauf der Apoptose aber nicht notwendig sind (Furre et al., 2006).

Kang et al. konnten an der humane Gliomzelllinie A172 zeigen, das nach Behandlung der Zellen mit Ciglitazone, einem Peroxisomen Proliferation-activated Receptor Agonisten (PPAR), welcher zur Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies innerhalb der Zellen führt und damit die Wirkungsweise der PDT auf chemischem Weg simuliert, ebenfalls eine Caspasen-unabhängige Apoptose über Aktivierung von AIF eintritt (Kang D W et al., 2008).

Dieses Bild der Caspasen unabhängigen Apoptose wird durch zahlreiche weitere Arbeiten gestützt (Inoue H, et al., 2007, Lilge L, et al., 2000), und spiegelt sich auch in unseren Ergebnissen wider.

5 Thesen

Während die physikalischen Grundlagen der PDT hinreichend geklärt sind, bleiben viele Fragen bezüglich der genauen biologischen Wirkung dieser Therapieform weiterhin ungeklärt.

Es konnte in dieser Arbeit an den drei humanen Gliom-Zelllinien U87, U251 und U373 nachgewiesen werden, dass durch die ALA-PDT Apoptose induziert wird. Eine relevante Apoptose-Induktion findet nur durch die Laser-Bestrahlung der Zellen nach vorangegangener ALA-Applikation statt.

Der Apoptose-Induktion in den Gliom-Zellen zeigt sich hierbei Caspasen-unabhängig, ursächlich ist der mitochondriale Weg der Apoptose mit Aktivierung von AIF.

Es konnte der Beweis erbracht werden, dass die ALA-PDT in vivo Apoptose in humanen Glioblastomen induziert.

6 Literaturverzeichnis

Allison R R, Sibata C, PDT for cancers of the head and neck., Photodiagnosis Photodyn Ther., 6(1):1-2, March 2009

Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou J C, Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria, Biochem. J 345: pp. 271-278, 2000

Böcker, Denk, Heitz, „Pathologie“, pp. 313-317, Urban & Fischer, 2. Auflage 2000

Boujrad H, et al., AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. Cell Cycle, 6(21), p. 2612, 2007

Cande C, et al., Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? J Cell Sci., pp. 4727-4734, 2002

Claes A, Idema A J, Wesseling P, Diffuse glioma growth: a guerilla war, Acta Neuropathol (2007) 114:, pp. 443–458, 2007

Croston G, Opposing roles of AIF in Apoptosis and Cell Survival, single chart, biocarta, 2009

Dandy W, Removal of the right hemisphere for certain tumors with hemiplegia: preliminary report. J Am Med Assoc 90, pp. 823–825, 1928

Daugas E, Susin S, Zamzami, N, Ferri, K ,Mitochondro-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis, The FASEB Journal Vol. 14, pp. 729-739, 2000

Dougherty T H, Marcus S L: Photodynamic therapy. Eur J Cancer; 28A, pp. 1734–1742, 1992

Fisher B J, et al., Ki-67: a prognostic factor for low-grade glioma? Int J Radiat Oncol Biol Phys, 52(4), pp. 996-1001, 2002.

Fukami T, Nakasu S, Baba K, Nakajima M, Matsuda M, Hyperthermia induces translocation of apoptosis-inducing factor and apoptosis in human glioma cell lines, *Journal of Neuro-Oncology* 70, pp. 319-331, 2004

Furre I E, Moller M, Shahzidi S, Nesland J, Peng Q, Involvement of both Caspase-dependent and –independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells, *Apoptosis* 11, pp. 2031-2042, 2006

Granville D J, Cassidy B A, Ruehlmann D O, Choy J C, Mitochondrial Release of Apoptosis-Inducing Factor and Cytochrome c During Smooth Muscle Cell Apoptosis, *American Journal of Pathology*, Vol 159, No. 1, 2001

Ganten D, Ruckpaul K, *Molekular- und Zellbiologische Grundlagen*, pp. 314-315, 1. Auflage, Springer-Verlag 1997

Green D R, Reed J C, Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, pp. 1309–1312, 1998

Gottlieb R A, Mitochondria: execution central. *FEBS Letters* 482, pp. 6–12, 2000

Hengartner M, The biochemistry of apoptosis, *Nature*, Vol. 407, pp. 770-776, 2000

Inoue H, Kajimoto Y, Shibata M, Miyoshi N, Ogawa N, Miyatake S, Otsuki Y, Kuroiwa T, Massive apoptotic cell death from human glioma cells via a mitochondrial pathway following 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy, *J Neurooncology* 83, pp. 223-231, 2007

Jin C, Reed J C, Yeast and apoptosis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, pp. 453-459, 2002

Kessel D, Luo Y, Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis, *J Photochem Photobiol B. Feb;42(2)*, pp. 89-95, 1998

Klein J A, Longo-Guess C M, Rossmann M P, The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*, 419, pp. 367–74, 2002

Kang D W, Choi C H, Park J, Kim Y K, Ciglitazone Induces Caspase-Independent Apoptosis through Down-Regulation of XIAP and Survivin in Human Glioma Cells, *Neurochemical Research* 33, pp. 551-561, 2008

Krammer P H, CD95's deadly mission in the immune system, *Nature*, Vol. 407, pp. 789-795, 2000

Kuriyama H, Lamborn K R, O'Fallon J R, Iturria N, Sebo T, Schaefer P. L., Scheithauer B W, Prognostic significance of an apoptotic index and apoptosis/proliferation ratio for patients with high-grade astrocytomas, *Neuro-Oncology*, pp. 179-186, July 2002

Lorenzo H K, et al., Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 6(6): pp. 516-24, 1999

Lilge L, Portnoy M, Wilson B C, Apoptosis induced in vivo by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumor tissue, *British Journal of Cancer* 83, pp. 1110-1117, 2000

Landthaler M, Rück A, Szeimies R M, Photodynamische Therapie von Tumoren der Haut. *Hautarzt* 44: pp. 69-74, 1993

Löffler G, Petrides P, *Biochemie und Pathobiochemie*, pp. 208-210, 6. Auflage, Springer-Verlag 1997

Mate M J, Ortiz-Lombardia M, Boitel B, The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat Struct Biol.* 9, pp. 442-6, 2002

Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E, In situ apoptotic cell labelling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochemical Cytochemistry* 44(9), pp. 959-68, 1996

Ohgaki H, Kleihues P, Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas., *J Neuropathol Exp Neurol.*;64, pp. 479-489, June 2005

Otera H, et al., Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J*, 24, pp. 1375-1386, 2005

Pannewitz R, Etablierung einer Methode zum Nachweis der Wirksamkeit der Photodynamischen Therapie nach Gabe von 5-Aminolävulinsäure beim Glioblastom, Promotionsschrift Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, noch nicht veröffentlicht, pp. 12-20, 2009

Pass H I, Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Nat Cancer Inst* 85, pp. 443–456, 1993

Peng Q, Moan J, Nesland J M, Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultra- structural features after photodynamic therapy. *Ultrastruct Pathol*. 20, pp. 109–129, 1996

Pereira L, Oliveira K, L' Abbate G, Sugai R, Ferreira J, da Motta L, Outcome of fully awake craniotomy for lesions near the eloquent cortex: analysis of a prospective surgical series of 79 supratentorial primary brain tumors with long follow-up, *Acta Neurochir*. 151, pp. 1215-1230, 2008

Pichlmeier U, Bink A, Schackert G, Stummer W, The ALA Glioma Study Group, Resection and survival in glioblastoma multiforme: An RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients; *Neuro Oncol* 10, pp. 1025-1034, 2008

Plaetzer K, Kiesslich T, Verwagner T, Krammer B, The modes of cell death induced by PDT – an overview, *Med. Laser Application* 18, pp. 7-19, 2003

Porter, A G and Urbano A G, Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *Bioessays* 28, pp. 834-843, 2006

Qi H, Chen H Z, and Jin Z J, Caspase 3 gene expression and $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis underlying desipramine-induced C6 glioma cell apoptosis. *Acta Pharmacol Sin*, 23, pp. 803-807, 2002

- Rick K, Sroka R, Stepp H, Kriegmair M, Huber RM, Jacob K, Baumgartner R, Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood. *J Photochem Photobiol B* 40, pp. 313-319, 1997
- Sahin A A, et al., Tumor proliferative fraction in solid malignant neoplasms. A comparative study of Ki-67 immunostaining and flow cytometric determinations. *Am J Clin Pathol*, 96, p. 512, 1991
- Sarkar C, Jain A, Suri V, Current concepts in the pathology and genetics of gliomas., *Indian Journal of Cancer*, Vol. 46, Iss. 2, p. 108, 2009
- Seigneurin D, Guillaud P, Ki-67 antigen, a cell cycle and tumor growth marker. *Pathol Biol (Paris)*, 39, p. 1020, 1991
- Sibata C H, et al., Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opin Pharmacother*, 2, pp. 917-927, 2001
- Strauss G, et al., 4-hydroperoxy-cyclophosphamide mediates caspase-independent T-cell apoptosis involving oxidative stress-induced nuclear relocation of mitochondrial apoptogenic factors AIF and EndoG. *Cell Death Differ.*, 15, pp. 332-343, 2008
- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler O D, Zanella F, Reulen H J; ALA-Glioma Study Group , Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial, *Lancet Oncol.* 7, pp. 392-401, 2006
- Stummer W, Novotny A, Stepp H, Goetz C, Bise K, Reulen HJ, Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients, *J Neurosurg.* 93, pp. 1003-1013, 2000
- Stupp R, Mason W P, van den Bent M J, Weller M, Fisher B, Taphoorn M J, Belanger K, Brandes A A, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer R C, Ludwin S K, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross J G, Eisenhauer E, Mirimano V, Radiotherapy plus

concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, pp. 987–996, 2005

Susin S A, Zamzami N, Kroemer G, Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta*, 1366, pp. 151–165, 1998

Teodorczyk M, Martin-Villalba A, Sensing invasion: Cell surface receptors driving spreading of glioblastoma, *Journal of Cellular Physiology* 222, p. 1-10, Jan 2010

Uberriegler K P, Banieghbal E, Krammer B, Subcellular damage kinetics within co-cultivated WI38 and VA13-transformed WI38 human fibroblasts following 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX formation. *Photochem Photobiol* 62, pp. 1052–1057, 1995

Widlak, P, The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis, *Acta Biochimica Polonica*, Vol 47, pp. 1037-1044, 2000

Willey A H, Kerr J F, Currie A R, Cell death: the significance of apoptosis, *Int. Rev. Cytol.* 68, pp. 251-306, 1980

Yoshino M, Hiroyuki B Y, Narita T, Iwasaki Y, Mechanism of Cell Damage in C6 Glioma Cells following 5-Aminolevulinic Acid-mediated Photodynamic Therapie. 83, 167-173, May 2008

Zelenkov P, Baumgartner R, Bise K, Heide M, Meier R, Stocker S, Sroka R, Goldbrunner R, Stummer W, Acute morphological sequelae of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the C6 spheroid model, *J Neurooncol* 82, pp. 49-60, 2007

7 Dank

An erster Stelle möchte ich mich bei den Patienten bedanken, die durch die nicht selbstverständliche Zustimmung zur Probenentnahme die Entstehung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben. Ich hoffe, dass wir ihren Erwartungen und Hoffnungen gerecht geworden sind.

Mein Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. W. Stummer und Herrn Professor Dr. J. Vesper für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas und ihre ständige Ansprechbarkeit. Ohne die fachliche Beratung, den Ideenreichtum, die stete Förderung und die anregenden Diskussionen wäre diese Arbeit nie entstanden.

Ich danke dem Leiter der Neurochirurgischen Klinik der Universität Düsseldorf, Herrn Professor Dr. H. J. Steiger für die kompromisslose Unterstützung und das große Interesse, welches er dieser Arbeit hat zuteil kommen lassen.

Frau B. Senger, leitende MTA des Neurochirurgischen Labors danke ich für zahlreiche Hilfestellungen während der Versuche.

Den Mitarbeiterin des Institutes für Transplantationsmedizin, der Arbeitsgruppe unter Leitung von PD Dr. rer. nat. R. Sorg danke ich für die Hilfe bei der Anfertigung der Gefrierschnitte und Anzucht der Zellen. Mein besonderer Dank gilt hier Frau Dipl. biol. C. Peters.

Meinen Eltern, Frau Ursula Slotty und Dr. Martin Slotty danke ich für die liebevolle Erziehung und die unerschöpfliche Unterstützung in allen Unternehmungen.

Zuletzt gilt mein Dank natürlich meiner geliebten Verlobten Christin für ihre Geduld, Ungeduld und Nachsicht.

8 Abschließende Worte und Widmung

Als junger Student, gerade nach Abschluss des Physikums und auf der Suche nach einer Promotionsmöglichkeit, wurde ich vor die Entscheidung gestellt, mich für einen seltenen Multi-Drug-Transporter der Niere oder die Zellzyklusregulation der cerebralen Melanom-Metastasen zu begeistern. Die Entscheidung zugunsten des klinisch relevanteren Projektes war rasch gefallen.

So lernte ich eine reizende, brillante Frau in den mittleren Dreißigern kennen, welche sich, unter anderem, durch die Etablierung einer computerisierten Methode zur Messung des Ploidie-Status in der internationalen zytopathologischen Gemeinschaft einen Namen gemacht hatte.

Unter ihrer Anleitung lernte ich rasch Grundzüge der methodischen Forschung.

Die Begeisterung, die Fallstricke und die Unwägbarkeiten der experimentellen Forschung konnte sie mit Leichtigkeit vermitteln. Eine derartige Anleitung ist, denke ich, nur Wenigen vergönnt.

Nach Abschluss des extensiven, experimentellen Teils der Promotion wechselte sie von der cytopathologischen Abteilung der Universität Göttingen an das pathologische Institut in Wilhelmshaven und leitete dort die molekulargenetische Abteilung.

Dort verstarb Frau PD Dr. Dr. Monika Korabiowska im Alter von 40 Jahren aus ungeklärter Ursache, plötzlich, ohne Anzeichen einer Erkrankung.

Ich widme diese Arbeit

Frau PD Dr. med. Dr. dent. Monika Korabiowska (* 13.11.1966- † 09.12.2006),

die mich für die Freuden der experimentellen Forschung entflammt hat und deren Herzlichkeit ich vermisse.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

NAME: Philipp Jörg Slotty
ADRESSE: Bürgerstrasse 18
40219 Düsseldorf
Telefon: 0170/4122321
GEBURTSDATUM UND ORT: 22.5.1978, Hamburg
ELTERN: Ursula Maria Slotty, Kinderkrankenschwester
Dr. med. Martin Gottlieb Slotty, Facharzt für Innere Medizin
GESCHWISTER: Kristina Angela Slotty (34), Studienrätin
Dr. Janina Barbara Slotty (33), Ärztin
Katharina Maria Slotty (29), Grundschullehrerin
KONFESSION: römisch-katholisch
FAMILIENSTAND: ledig
STAATSANGEHÖRIGKEIT: deutsch

Universitäts-Ausbildung

Seit 3/2007 Assistenzarzt für Neurochirurgie an der Neurochirurgischen
Klinik der Universität Düsseldorf unter Prof. Dr. H.-J. Steiger
11/06 Drittes Staatsexamen am Evangelischen Krankenhaus
Oldenburg
11/05-11/06 Praktisches Jahr im Evangelischen Krankenhaus Oldenburg mit
dem Wahlfach Neurochirurgie
08/05 Zweites Staatsexamen
07/04-09/04 Famulatur in der Internistischen Praxis von Dr. Klaus Kahlich,
Soest
03/04-04/04 Famulatur in der Abteilung für Neurologie des Kantonsspital
Aarau in Aarau, Schweiz
10/03 Beginn des experimentellen Teils der Dissertation
08/03-09/03 Famulatur in der Abteilung für Herz-Thorax-Chirurgie der
Universitätsklinik Göttingen (Dipl. phys. Prof. Dr. Schöndube)

04/03	Erstes Staatsexamen
04/02	ärztliche Vorprüfung
seit 04/00	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Georg-August Universität in Göttingen

SCHULAUSSBILDUNG UND WEHRDIENST

11/99-Studiumbeginn	Besuch eines Lehrganges für Rettungshelfer des Deutschen Roten Kreuzes in Münster, eigenverantwortliche Nachtdienste im Schlaflabor des Marien-Krankenhauses Soest
8/98-9/99	Zivildienst in der Pflege auf einer Internistischen Station des Marien-Krankenhauses Soest
06/98	Abschluss des Gymnasium mit dem Abitur in den Hauptfächern Chemie, Englisch, Pädagogik und Philosophie
08/89-06/98	Besuch des Aldegrever-Gymnasium in Soest
08/85-06/89	Besuch der St.Bruno Grundschule in Soest

Die δ -Aminolaevulinsäure gestützte photodynamische Therapie humaner Gliome in-vitro und in-vivo

Abstract

Die vorliegende Arbeit dient der Ergründung der funktionellen Mechanismen der δ -Aminolaevulinsäure gestützten photodynamischen Therapie (ALA-PDT) humaner Gliome.

Diese Technik wurde aus der ALA-Fluoreszenz gestützten Resektion humaner Gliome abgeleitet und macht sich die Absorption von mittels Laserlicht der Wellenlänge 653 nm zugeführter Energie in mit ALA vorbehandelten Gliomzellen zunutze.

In Voruntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass diese Behandlung zu Zelluntergängen führt, der genaue Wirkungsmechanismus blieb bisher weitestgehend ungeklärt.

Der Versuchsaufbau teilt sich in zwei Aspekte, in einer ersten Versuchsserie wurde anhand von Zelllinienversuchen mit den zu Sphäroiden gezüchteten humanen Gliomzelllinien U87, U271 und U373 die selektive Effektivität der Behandlung gegenüber Kontrollgruppen untersucht. Es zeigte sich in allen untersuchten Zelllinien, dass eine effektive Zellschädigung nur in mit ALA-inkubierten und anschließend mit Laser bestrahlten Zellpopulationen auftrat. Der Anteil der mitotisch aktiven Zellen wurde über eine Ki-67 Färbung bestimmt.

In einer zweiten Versuchsserie wurde der zelluläre Wirkungsmechanismus der Behandlung untersucht. Es konnte durch Färbung der Zelllinienpräparate mittels TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) nachgewiesen werden, dass apoptotische Vorgänge für die Zellschädigung ursächlich sind. Dies konnte zusätzlich zu den Zelllinienpräparaten auch an postoperativ in-vivo gewonnenen Proben acht humaner Gliome gezeigt werden.

Zur weiteren Klärung des Wirkungsmechanismus wurden Caspase-3 sowie Apoptose-inducing factor (AIF) Färbungen mit dem Resultat durchgeführt, dass eine Caspasen-unabhängige Apoptose Induktion über den mitochondrialen pathway für die Zellschädigung im Rahmen der ALA-PDT ursächlich ist.

Prof. Dr. J. Vesper