



Immunogenes Potential der 5-Aminolävulinsäure- basierten Photodynamischen Therapie beim Glioblastom

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Corinna Peters

aus Mönchengladbach

Düsseldorf, Mai 2011

aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ)
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

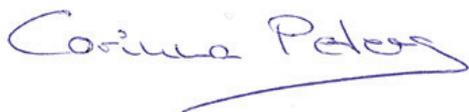
Referent: PD Dr. Rüdiger Sorg
Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2011

Erklärung

Die hier vorgelegte Inauguraldissertation habe ich eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Die Inauguraldissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch in keiner anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den 06.05.2011

A handwritten signature in blue ink that reads "Corinna Peters". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.

(Corinna Peters)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Glioblastom | 1 |
| 1.1.1 Pathologie | 2 |
| 1.1.2 Tumorgenetik | 3 |
| 1.1.3 Diagnose des Glioblastoms | 4 |
| 1.1.4 Therapie des Glioblastoms | 5 |
| 1.1.5 Prognose | 6 |
| 1.2 Matrix-Metalloproteinasen als Initiatoren der Tumorzellinvasion | 6 |
| 1.3 Das Sphäroid-Modell | 8 |
| 1.4 Photodynamische Therapie | 8 |
| 1.4.1 Das Prinzip der Photodynamischen Therapie | 9 |
| 1.4.2 Mechanismen der PDT | 11 |
| 1.5 Hitzeschockproteine (HSP) | 12 |
| 1.5.1 HSP70 | 14 |
| 1.5.2 HSP70 und das Immunsystem | 15 |
| 1.6 Das Immunsystem | 16 |
| 1.6.1 Die angeborene Immunität | 17 |
| 1.6.2 Die erworbene/adaptive Immunität | 18 |
| 1.7 Dendritische Zellen (DC) | 19 |
| 1.7.1 Antigenaufnahme durch unreife Dendritische Zellen | 20 |
| 1.7.2 Ausreifung Dendritischer Zellen | 20 |
| 1.7.3 Die Antigenpräsentation und der HLA-Komplex | 21 |
| 1.8 T-Zellen | 22 |

| | | |
|--------|--|----|
| 1.8.1 | Induktion einer T-Zellantwort | 23 |
| 1.9 | Zielsetzung | 24 |
| 2 | Material und Methoden | 25 |
| 2.1 | Verbrauchsmaterialien und Einwegartikel | 25 |
| 2.2 | Reagenzien und Kits | 26 |
| 2.3 | Antikörper für die Durchflusszytometrie und Zell-Isolierung | 28 |
| 2.4 | Geräte | 29 |
| 2.5 | Software | 30 |
| 2.6 | Kultivierung der Glioblastomzelllinien | 31 |
| 2.6.1 | Passagieren der Zellen | 32 |
| 2.6.2 | Kryokonservierung der kultivierten Zellen | 32 |
| 2.6.3 | Zellzahlbestimmung | 32 |
| 2.7 | Herstellung von agarbeschichteten Zellkulturflaschen | 33 |
| 2.8 | Generierung von Tumorsphäroiden | 33 |
| 2.9 | 5-Aminolävulinsäure-basierende Photodynamische Therapie (PDT) von Tumorsphäroiden | 34 |
| 2.10 | Tumorsphäroid-Migrationsassay | 35 |
| 2.11 | Migrationsassay für unreife Dendritische Zellen | 35 |
| 2.12 | Phalloidin-Färbung des Aktin-Zytoskelettes | 35 |
| 2.13 | Isolierung mononukleärer Zellen | 36 |
| 2.13.1 | Immunmagnetische Isolierung der CD14+ Monozyten aus mononukleären Zellen (MNC) | 37 |
| 2.13.2 | Isolierung von T-Zellen aus mononukleären Zellen | 37 |
| 2.14 | <i>In vitro</i> Kultivierung und Ausreifung Dendritischer Zellen | 38 |
| 2.14.1 | Co-Kultivierung von Tumorsphäroiden mit Dendritischen Zellen | 38 |
| 2.14.2 | HSP70 Blockierung | 38 |
| 2.15 | Durchflusszytometrie | 39 |
| 2.15.1 | Prinzip der Durchflusszytometrie | 39 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.15.2 | Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenmolekülen und Durchflusszytometrische Analyse | 40 |
| 2.16 | Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse | 41 |
| 2.17 | Pinozytoseaktivität unreifer Dendritischer Zellen | 41 |
| 2.18 | CFDA-SE-Färbung von Tumorsphäroiden | 42 |
| 2.19 | Allostimulatorische Aktivität Dendritischer Zellen | 42 |
| 2.20 | MTT-Assay | 43 |
| 2.21 | Nachweis hochreaktive Sauerstoffspezies (ROS) durch H ₂ DCF-DA | 43 |
| 2.22 | Apoptosenachweis durch Annexin V-FITC | 44 |
| 2.23 | Zytokinnachweis mittels Multiplex-Analyse mit fluoreszenten Bead-Arrays | 44 |
| 2.24 | Zyklusversuche Sphäroide | 45 |
| 2.25 | Molekularbiologische Methoden..... | 46 |
| 2.25.1 | RNA-Isolation aus Tumorsphäroiden | 46 |
| 2.25.2 | Herstellung von cDNA durch reverse Transkription..... | 46 |
| 2.25.3 | RT-PCR | 47 |
| 2.25.4 | Agarosegelelektrophorese | 50 |
| 2.26 | Statistik | 51 |
| 3 | Ergebnisse | 52 |
| 3.1 | Generierung von Glioblastom-Sphäroiden aus Monolayer-Kulturen..... | 52 |
| 3.2 | Reduktion der Zellproliferationsrate durch ALA/PDT-Behandlung von Glioblastomzellen... 53 | |
| 3.3 | Inhibierung des migratorischen Verhaltens von Glioblastomzellen nach ALA/PDT-Behandlung | 54 |
| 3.3.1 | Morphologische Veränderungen infolge der ALA/PDT-Behandlung | 59 |
| 3.3.2 | ALA/PDT-vermittelte Modifikation der Cadherin-Expression in Gliomsphäroiden | 62 |
| 3.3.3 | Induktion einer Zytoskelett-Neuorganisation nach ALA/PDT-Behandlung in Gliomsphäroiden..... | 65 |
| 3.3.4 | Expression von Matrix Metalloproteinasen in Glioblastomzellen | 66 |
| 3.3.5 | Integrine | 68 |
| 3.4 | Das immunogene Potential der Photodynamischen Therapie | 71 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.4.1 | ROS-Bildung durch ALA/PDT-Behandlung..... | 71 |
| 3.4.2 | Induktion zellschädigender Prozesse durch ALA/PDT in Gliomzellen..... | 73 |
| 3.4.3 | Ausreifung Dendritischer Zellen..... | 74 |
| 3.4.4 | ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide induzieren die Migration von unreifen Dendritischen Zellen | 76 |
| 3.4.5 | Chemokinsekernierung als Folge einer ALA/PDT-Behandlung von Gliomsphäroiden ... | 77 |
| 3.4.6 | Aufnahme von Tumormaterial durch unreife Dendritische Zellen | 78 |
| 3.4.7 | Einfluss von Glioblastom-Sphäroiden auf die Ausreifung unreifer Dendritischer Zellen | 82 |
| 3.4.8 | T-Zell-stimulatorische Aktivität der Dendritischen Zellen nach Co-Kultur mit Gliomsphäroiden..... | 89 |
| 3.5 | HSP70 als potentes Danger-Signal? | 91 |
| 3.5.1 | Reduzierte Antigenaufnahme nach HSP70-Blockierung..... | 93 |
| 3.5.2 | Inhibierung der DC-Ausreifung durch HSP70-Blockierung..... | 94 |
| 3.5.3 | HSP70-Blockierung hemmt die Induktion der co-stimulatorischen Moleküle auf Dendritischen Zellen | 95 |
| 4 | Diskussion | 98 |
| 4.1 | Einfluss der ALA/PDT-Behandlung auf das Migrationsverhalten von Gliomsphäroiden | 98 |
| 4.1.1 | Matrix Metalloproteine..... | 98 |
| 4.1.2 | Morphologische Veränderungen nach ALA/PDT-Behandlung..... | 99 |
| 4.1.3 | EMT im Kontext invasiver Prozesse..... | 100 |
| 4.1.4 | Unverändertes Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen nach Photodynamischer Therapie der Glioblastomzellen..... | 101 |
| 4.2 | Immunogenes Potential der ALA/PDT | 101 |
| 4.2.1 | Beteiligung des adaptiven Immunsystems..... | 102 |
| 4.2.2 | Induktion der Migration von Dendritischen Zellen und der Antigenaufnahme infolge einer ALA/PDT | 103 |
| 4.2.3 | ALA/PDT-behandelte Gliomzellen induzieren die Ausreifung Dendritischer Zellen | 104 |
| 4.2.4 | Zelltod infolge einer Photodynamischen Therapie | 105 |
| 4.3 | Induktion von Danger-Signalen als Konsequenz einer ALA/PDT | 106 |

| | | |
|-----|-----------------------------------|-----|
| 4.4 | Gehirn als Immunfreie Zone? | 108 |
| 5 | Zusammenfassung | 110 |
| 6 | Summary | 111 |
| | Danksagung | 112 |
| | Lebenslauf | 114 |
| | Abbildungsverzeichnis..... | 116 |
| | Literaturverzeichnis..... | 120 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| $^1\text{O}_2$ | Singulett-Sauerstoff |
| A. dest | Aqua destillatum |
| Abb. | Abbildung |
| ALA | 5-Aminolävulinsäure |
| ALA/PDT | Aminolävulinsäure-vermittelte PDT |
| APC | Antigenpräsentierende Zelle |
| AIF | <i>apoptosis-inducing-factor</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BrdU | Bromdesoxyuridin |
| CCR | <i>Chemokine Receptor</i> |
| CD | <i>Cluster of Differentiation</i> |
| CFDA-SE | <i>Carboxyfluorescein-diacetate-succinimidylester</i> |
| CT | Computertomographie |
| CTL | Zytotoxischer T-Lymphozyt |
| DAMPs | <i>Damage-associated molecular pattern</i> |
| DC | Dendritische Zelle(n) |
| DMEM | <i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyriboneukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| ECM | Extrazellulär-Matrix |
| EDTA | Ethylendiamintetra-Essigsäure |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FSC | <i>Forward Scatter</i> |

| | |
|------------|--|
| GB | <i>Glioblastoma</i> |
| GM-CSF | <i>Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor</i> |
| HBSS | <i>Hanks Balanced Salt Solution</i> |
| HLA | Humane Leukozytenantigene |
| HPD | Hämatoporphyrin-Derivat |
| HSA | Humanes Serumalbumin |
| HSF | Hitzeschockfaktor |
| HSP | Hitzeschockprotein(e) |
| ICAM | Intrazelluläre(s) Adhäsionsmolekül(e) |
| IL | Interleukin |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LTS | Lipoteichonsäure |
| MACS | magnetisch-aktivierte Zellsortierung |
| MAP-Kinase | Mitogen-aktivierte Proteinkinasefamilie |
| MET | Mesenchymale-Epitheliale Transition |
| MFI | Mittlere Fluoreszenzintensität |
| MNC | Mononukleäre Zelle(n) |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| OD | Optische Dichte |
| PAMPs | <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PBST | PBS + Tween 20 |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PDT | Photodynamische Therapie |
| PE | Phycoerythrin |
| PFA | Paraformaldehyd |

| | |
|-----------------------|--|
| PI | Propidiumiodid |
| PPIX | Protoporphyrin IX |
| PS | Phosphatidylserin |
| RIP1 | <i>Receptor interacting protein1 kinase</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | hochreaktive Sauerstoffspezies |
| RT | Raumtemperatur |
| SEM | Standardfehler |
| SSC | <i>Side Scatter</i> |
| TAP | ATP-abhängige Transportproteine |
| TCR | T-Zell-Rezeptor-Komplex |
| TCM | T-Gedächtniszelle |
| TEM | T-Effektor-Gedächtniszelle |
| T _H -Zelle | T-Helfer-Zelle |
| TIMP | <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i> |
| TLR | <i>Toll-Like-Receptor</i> |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| UKD | Universitätsklinikum Düsseldorf |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |

1 Einleitung

„Diffuses Wachstum von Gliomen: ein Guerilla-Krieg“ - so titelte im Jahr 2007 eine Publikation und beschrieb damit vortrefflich die charakteristischen Eigenheiten eines Glioblastoms und der damit einhergehenden Problematik erfolgreich therapeutische Maßnahmen gegen diese Tumorentität zu entwickeln [1].

Trotz moderner Therapiekonzepte beträgt das mittlere Überleben der Patienten mit einem Glioblastom lediglich 14,6 Monate [2]. Verständlich sind daher die Bemühungen zahlreicher Forschergruppen, die biologischen Zusammenhänge eines Glioblastoms aufzuklären und anhand der gewonnenen Erkenntnisse neue therapeutische Konzepte zu entwickeln.

Die intensive Forschungsaktivität umfasst neben operativen Ansätzen auch pharmakologische, radiotherapeutische sowie immunologische Verfahren.

1.1 Das Glioblastom

Der Begriff „Gliom“ umfasst alle Tumoren, die glialen Ursprungs sind und repräsentiert die häufigsten primären Tumore des Gehirns. Das Glioblastom (GB) zählt zu diesen Tumoren des zentralen Nervensystems und stellt somit die aggressivste Form innerhalb dieser Gruppe dar. Der prozentuale Anteil des Glioblastoms an den Gliomen liegt bei ca. 70%. Jährlich erkranken ca. 2000-3000 Menschen in Deutschland an einem GB. Das Hauptmanifestationsalter dieser Erkrankung liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr [3]. Diese hochmaligne Tumorentität wird anhand der WHO-Gradierung als äußerst bösartiger Tumor klassifiziert (WHO-Grad IV) [4]. Weiterhin zählen Astrozytome, oligodendrogliale Tumoren sowie Mischformen mit astrozytären und oligodendroglialen Anteilen zu den Gliomen.

Tabelle 1 zeigt eine stark vereinfachte Einteilung dieser Neoplasien, einschließlich ihrer WHO-Gradierung.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Gliome (Auszug) aus: Behin et al. [5]

| Tumor | WHO-Grad |
|---|--------------|
| Tumoren des Neuroepithelialen Gewebes: | |
| Astrozytäre Tumoren: | |
| Pilozytisches Astrozytom | WHO-Grad I |
| Diffuses Astrozytom | WHO-Grad II |
| Anaplastisches Astrozytom | WHO-Grad III |
| Glioblastoma | WHO-Grad IV |
| Oligodendrogliale Tumoren: | |
| Oligodendrogliom | WHO-Grad II |
| Anaplastisches Oligodendrogliom | WHO-Grad III |
| Mischgliome: | |
| Oligoastrozytom | WHO-Grad II |
| Anaplastisches Oligoastrozytom | WHO-Grad III |

Man differenziert primäre, das heißt *de novo* entstandene sowie sekundäre GB, die aus entdifferenzierten, niedriggradigen Gliomen hervor gegangen sind. Sekundäre GB betreffen häufig jüngere Patienten innerhalb der 4. Lebensdekade, stellen jedoch mit etwa 5 % den geringeren Teil der auftretenden Läsionen dar [3].

1.1.1 Pathologie

Ein Glioblastom erweist sich im Hinblick auf unterschiedliche Aspekte als ein sehr komplexer Tumor. Bereits bei der makroskopischen Betrachtung eines GB zeigt sich ein unruhiges Bild aus Nekrosen, soliden Tumorbereichen sowie zahlreichen Einblutungen. Auch in der Histologie setzt sich diese Vielgestaltigkeit fort. So finden sich mehrkernige Tumorriesen zellen, kleinzellige Anteile, glomerulusähnliche Endothelzellproliferate, aber auch Tumorzellen mit atypischen Mitosen, Nekrosen sowie fokale Einblutungen nebeneinander [6].

Ein Glioblastom zeichnet sich desweiteren durch sein diffus infiltrierendes Wachstum aus. Biopsien verdeutlichen, dass Tumoreinzellen sowie Zellverbände in angrenzendes, gesundes Gehirngewebe einwandern können.

Der Hauptlokalisationsort eines Glioblastoms ist die Großhirnhemisphäre. Prinzipiell können alle Hirnlappen, aber auch das *Corpus Callosum*, eine quer verlaufende Faserverbindung zwischen den beiden Großhirnhemisphären, betroffen sein, von dem eine Ausbreitung des Tumors durch Migration entlang der zerebralen Faserbahnen sowie Gefäße auf die andere Hemisphäre erfolgen kann. So entsteht das charakteristische Bild eines Schmetterling-Glioms.

1.1.2 Tumorgenetik

Zahlreiche genetische und epigenetische Veränderungen konnten für das GB identifiziert werden, so dass auch hier von einer Komplexität des Tumors gesprochen werden kann. Diese Veränderungen unterscheiden sich oftmals in primären und sekundären Glioblastomen. Charakteristisch für primäre Glioblastome sind Störungen des EGFR/PTEN-Signaltransduktionsweges. Das *pten*-Gen (*phosphatase and tensin homology gene*) codiert die Phosphatase PTEN, die die Hydrolyse verschiedener Phosphorsäureester katalysiert und eine zentrale Rolle in der Zellmigration sowie der Invasion einnimmt. Im Gegensatz hierzu weisen sekundäre Glioblastome sowie Gliome des WHO-Grades II und III verstärkt Aberrationen innerhalb des TP53-Signaltransduktionsweges auf.

Beiden Gruppen gemein ist die häufigste genetische Veränderung, die sich in einem Verlust der Heterozygotie mit einer Deletion innerhalb des Chromosoms 10 manifestiert – dort liegt beispielsweise auch das *pten*-Gen. Diese Veränderung ist in 60 – 80% aller Fälle verifizierbar [7].

Abbildung 1.1 fasst die häufigsten genetischen Veränderungen bei Gliomen zusammen.

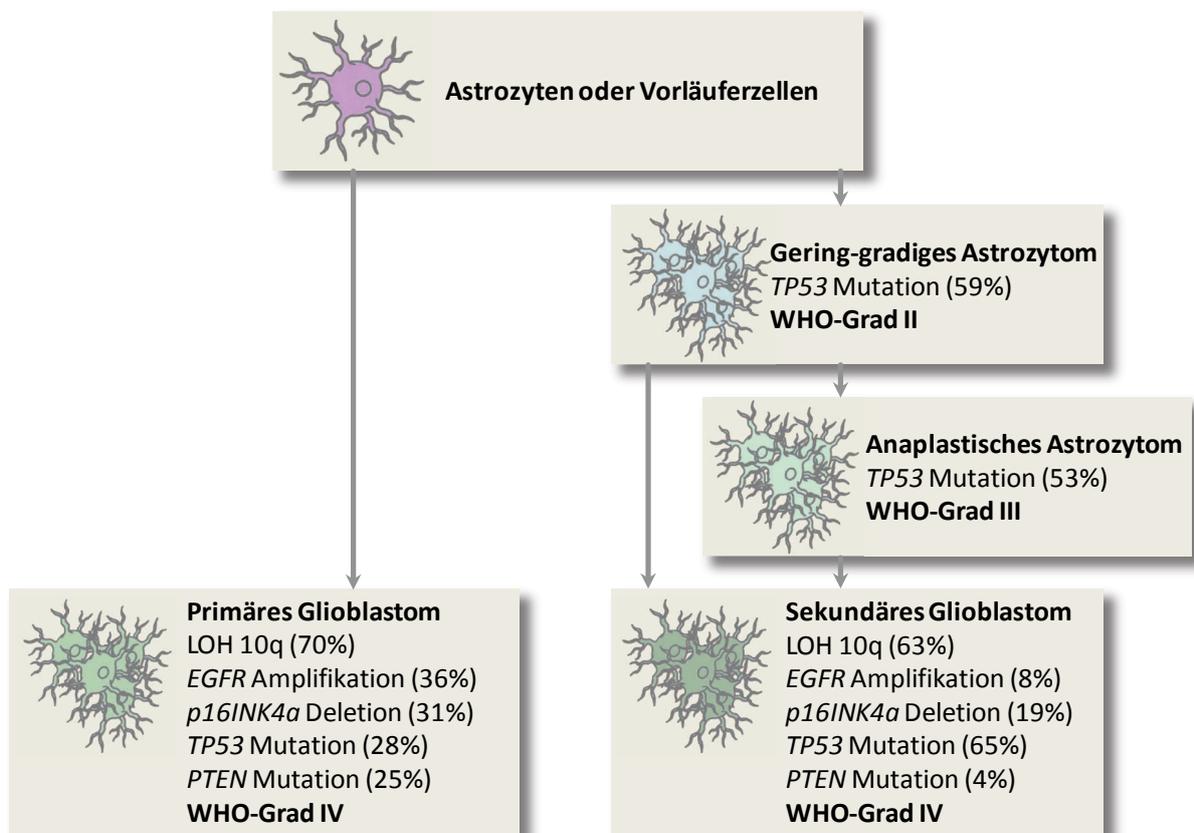


Abbildung 1.1: Genetische Veränderungen in malignen Gliomen (modifiziert nach Ohgaki et al. 2007 [7]).

1.1.3 Diagnose des Glioblastoms

Patienten mit einem Glioblastom zeigen oftmals eine große Bandbreite klinischer Symptome, einschließlich Kopfschmerzen, Krampfanfällen, fokalen neurologischen Defiziten bis hin zu vollständigem Gedächtnisverlust oder Persönlichkeitsveränderungen. Das Ausmaß dieser Symptome variiert von Patient zu Patient. Krampfanfälle treten häufiger bei Patienten auf, deren Neoplasie kortikal lokalisiert ist und langsam wächst. Kopfschmerzen, als Indikator eines steigenden intrakraniellen Druckes, treten häufig in den frühen Morgenstunden auf, können aber oftmals vom Patienten nicht von einem harmlosen Spannungskopfschmerz unterschieden werden. In besonders ausgeprägten Fällen kommt es zu Übelkeit und Erbrechen [3, 5]. Das Auftreten dieses „Erst-Symptomes“ kann bei 50% der Patienten mit Hirntumoren verzeichnet werden.

Für die Diagnostik eines Glioblastoms stehen neben sorgfältiger Anamnese und klinischer Präsentation insbesondere bildgebende Verfahren wie Magnetresonanztomographie (MRT) oder die weniger sensitive Computertomographie (CT) zur Verfügung.

MRT mit oder ohne Gadolinium als Kontrastmittel entspricht momentan dem Goldstandard der Diagnosestellung [8]. Mit dieser Methode können neben der Lokalisation, auch die Größe sowie der Grad der Flüssigkeitseinlagerung (Ödem) am besten ermittelt werden. Hierdurch wird eine erste Einstufung der Neoplasie ermöglicht [5]. Im MRT zeigt das Glioblastom in der Kontrastmittelaufnahme seine charakteristische ringförmige oder girlandenartige Ausbreitung mit einer zentralen Nekrose sowie peritumorale Ödeme, als Zeichen einer gestörten Blut-Hirn-Schranke (vgl. Abbildung 1.2) [9].

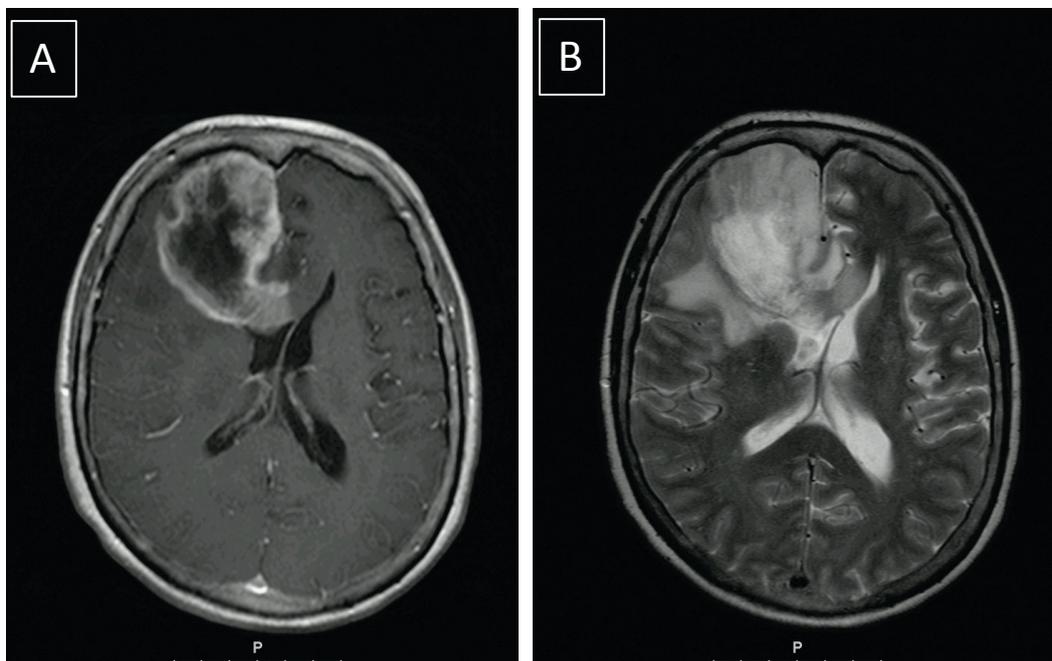


Abbildung 1.2: MRT eines Glioblastom-Patienten. Bild A zeigt eine T1-gewichtete MRT Sequenz nach Gadolinium-Gabe eines rechts frontalen, raumfordernden Glioblastoms. Klassische ringförmige Kontrastmittelaufnahme mit zentraler Aussparung und unscharfer Begrenzung. Bild B zeigt die T2-gewichtete MRT Sequenz, welche das perifokale Ödem, als Ausdruck einer lokalen Blut-Hirn-Schranken Störung, darstellt. (Die Bilder wurden von der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt.)

1.1.4 Therapie des Glioblastoms

Maligne Astrozytome zählen derzeit zu den unheilbaren Neoplasien mit einer deutlichen Reduktion der Überlebenszeit. Daher liegt gegenwärtig ein Fokus der Therapiekonzepte auf der Verbesserung der neurologischen Defizite und vor allem auf der Erhöhung der Lebenserwartung bei bestmöglicher Lebensqualität [5].

Die Standardtherapie eines neu diagnostizierten Glioms besteht derzeit aus einer möglichst radikalen Resektion des Tumorgewebes sowie einer adjuvanten Strahlen- und Chemotherapie. Eine Kombination von Strahlentherapie und einer alkylierenden Chemotherapie mit Temozolomid hat sich im Vergleich zu einer reinen Strahlentherapie als effektiver erwiesen und erhöht das mediane Überleben der Patienten von 12,1 auf 14,6 Monate [2].

Vollständige Resektionen des Tumors erweisen sich jedoch aufgrund des diffusen Wachstums sowie des infiltrativen Charakters eines Glioblastoms als äußerst schwierig, insbesondere da eine „großzügige“ Entfernung von Gewebe im Gehirn nicht möglich ist, ohne neurologische Defizite zu verursachen. Durch eine Optimierung der neurochirurgischen Operationsverfahren durch MRT-gestützte Neuronavigation, funktionelle MRT und intraoperative MRT konnten jedoch verbesserte Resektions-Ergebnisse erzielt werden [10].

Vor allem die Fluoreszenz-gestützte Resektion mit Aminolävulinsäure (ALA) erleichtert die vollständige Resektion (vgl. Abbildung 1.3). Hierbei wird den Patienten vor der Resektion ALA oral verabreicht, das zu Protoporphyrin IX (PPIX) verstoffwechselt wird, welches sich in den Tumorzellen anreichert, und aufgrund seiner Fluoreszenz bei 400 nm die intraoperative Identifizierung des Tumors erlaubt. 65 % der Patienten zeigten in einer Studie im Vergleich zu 36 % der Patienten in der Kontrollgruppe eine vollständige Resektion der Neoplasie, basierend auf einem nach der Resektion durchgeführten MRT [11]. Dadurch verlängerte sich das progressionsfreie Überleben der Patienten nach 6 Monaten von 21,1 % (Kontrollgruppe) auf 41 %.

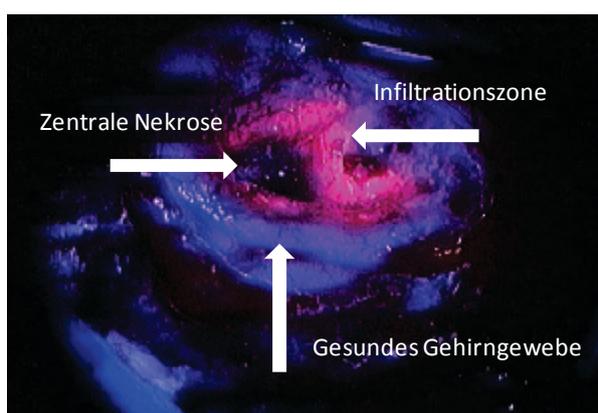


Abbildung 1.3: Fluoreszenzgestützte Resektion eines Glioblastoms. (Das Bild wurde von der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt.)

Als äußerst problematisch bei der Behandlung eines Glioblastoms erweist sich jedoch der invasive Charakter der Neoplasie, der bislang eine effektive und vor allem dauerhafte Beseitigung jeglichen Tumorgewebes unmöglich machte. Zum Zeitpunkt einer Diagnose erfolgte in den meisten Fällen be-

reits eine Infiltration der Tumorzellen in umliegendes Gehirngewebe, so dass mehr als 80 % der Patienten in einem Umkreis von 2-3 cm um die ursprüngliche Läsion herum ein Tumorrezidiv entwickeln [5]. Diese infiltrierenden Tumorzellen können auch mit den besten Resektionstechniken nicht entfernt werden und sind außerdem durch die MRT nicht detektierbar. Deshalb muss sich an die Resektion immer eine weitere Therapie, gegenwärtig die Kombination aus Strahlentherapie und Temozolomid-Chemotherapie anschließen. Derzeit liegt die Rate der Patienten, die ab Diagnosestellung mehr als 3 Jahre überleben trotz dieser multi-modalen Therapie unter 5 % [12]. Eine effektive Therapie für ein Tumorrezidiv existiert derzeit nicht. Aktuelle Leitlinien besagen, dass individuelle Entscheidungen zu wiederholter Resektion, erneuter Chemotherapie oder Teilnahme an experimentellen Therapiestudien erfolgen sollten [13].

1.1.5 Prognose

Trotz moderner Medizin und ständig optimierter Therapiekonzepte, ist die Prognose eines Glioblastoms nach wie vor äußerst schlecht. Zwar konnte das mediane Überleben der Patienten von 6 Monaten in den 60er bzw. 70er Jahren [14] auf 14,6 Monate heutzutage gesteigert werden, ein durchschlagender Erfolg blieb jedoch bislang aus [2]. Die 2-Jahresüberlebensrate der Patienten liegt bei 27,2 % und nach drei Jahren haben nahezu alle Patienten ein Rezidiv entwickelt. Das mediane Überleben nach Rezidivierung liegt bei 6,2 Monaten [2, 15].

1.2 Matrix-Metalloproteinasen als Initiatoren der Tumorzellinvasion

Eine Invasion von Gliomzellen in angrenzendes gesundes Gehirngewebe stellt eines der größten Probleme bei der Behandlung von Gliompatienten dar.

Die Degradierung der Extrazellulär-Matrix (ECM) ist elementarer Bestandteil zahlreicher Prozesse unter physiologischen Bedingungen, einschließlich Morphogenese oder Gewebereparatur. Bei der Tumorzell-Invasion in gesundes Gewebe ist sie ein essentieller Schritt. Eine Gruppe proteolytischer Enzyme, die sogenannten Matrix Metalloproteinasen, ist daran beteiligt.

Sie stellen die größte Gruppe der ECM-degradierenden Enzyme dar, die befähigt sind, sämtliche proteinhaltigen Bestandteile der ECM abzubauen. Die Zink-abhängigen Enzyme werden als inaktive Zymogene synthetisiert, die erst nach Abspaltung eines Peptides in das aktive Enzym umgewandelt werden. Die Aktivierung fast aller MMPs erfolgt extrazellulär und wird durch Proteinasen, einschließlich anderer MMPs und Serinproteasen, vermittelt [16, 17]. Gegenwärtig sind 23 MMPs bekannt, von denen zahlreiche in Glioblastomen exprimiert werden. Tabelle 2 zeigt das MMP-Expressionsmuster in verschiedenen humanen Glioblastomzelllinien.

Tabelle 2: Expressionsmuster der Matrix Metalloproteinasen in humanen Glioblastomen (+: exprimiert; -: nicht exprimiert; +/-: nur in einigen Studien exprimiert (modifiziert nach Hagemann et al. [18])

| MMP | U251 | U87 | U373 |
|--------|------|-----|------|
| MMP-1 | + | +/- | + |
| MMP-2 | + | + | + |
| MMP-3 | + | +/- | +/- |
| MMP-7 | + | +/- | + |
| MMP-8 | +/- | - | - |
| MMP-9 | +/- | +/- | +/- |
| MMP-10 | + | - | + |
| MMP-11 | +/- | - | +/- |
| MMP-12 | +/- | + | - |
| MMP-13 | + | + | + |
| MMP-14 | + | +/- | +/- |
| MMP-15 | + | +/- | +/- |
| MMP-16 | +/- | + | - |
| MMP-17 | + | + | + |
| MMP-19 | + | + | + |
| MMP-20 | - | - | - |
| MMP-21 | - | - | - |
| MMP-23 | + | + | + |
| MMP-24 | + | + | + |
| MMP-25 | - | - | - |
| MMP-26 | +/- | - | - |
| MMP-27 | +/- | - | - |
| MMP-28 | + | - | + |

Die Aktivität der Matrix Metalloproteinasen wird durch die sogenannten TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) strengstens reguliert. Gegenwärtig sind vier Mitglieder dieser Gruppe bekannt (TIMP1 -TIMP4). Ein Ungleichgewicht zwischen aktivierten MMPs und den dazugehörigen Inhibitoren begünstigt den Invasions-Prozess [19, 20].

MMPs regulieren die Tumorzell-Invasion durch Interaktionen mit zahlreichen ECM-Komponenten, einschließlich Wachstumsfaktoren und Zell-Adhäsionsmolekülen. Daher spielen Integrine eine weitere wichtige Rolle innerhalb des Invasionsgeschehens. Integrine sind Glykoproteine und fungieren als Transmembranproteine, die den Zellen Kontakt untereinander sowie mit der Extrazellulär-Matrix ermöglichen. Zu ihren Interaktionspartnern zählen unter anderem Fibronectin, Kollagen und Laminin. Die Zell-Matrix-Adhäsion wird maßgeblich durch diese Moleküle moduliert [21].

1.3 Das Sphäroid-Modell

Bei dem Tumor-Sphäroid-Modell handelt es sich um ein *in vitro* Tumormodell, das sich durch eine dreidimensional wachsende, multizelluläre Zellanhäufung auszeichnet.

Bereits 1970 wurde dieses Modell durch Sutherland et al. etabliert und stetig optimiert. Seitdem gewinnt es zunehmend an Bedeutung [22-24].

Die Anwendungsmöglichkeiten dieses Systems erweisen sich als äußerst vielfältig. Das Sphäroid-Modell gibt unter anderem Aufschluss über Zell-Zell-Interaktionen [25] sowie über die zelluläre Antwort auf zahlreiche therapeutische Anwendungen, einschließlich Radiotherapie, PDT, Antikörperbasierter Immuntherapie, Chemotherapie etc. [26-35].

Tumorsphäroide verhalten sich bezüglich ihres histologischen Aufbaus analog zu soliden Mikrotumoren *in vivo* und zeigen eine vergleichbare Extrazelluläre Matrix [36]. Ferner verfügen Sphäroide über ausgeprägte interzelluläre Kontakte und tumorähnlichen Wachstumseigenschaften [37]. Die histologische Einteilung erfolgt in drei Zonen. Die periphere Zone zeichnet sich durch proliferierende Zellen aus, die mittlere Schicht beinhaltet schwach proliferierende oder ruhende Zellen (im G_0 -Arrest stagnierende Zellen). Im Zentrum befindet sich die nekrotische Zone [29].

Die konzentrische Anordnung heterogene Zellpopulationen in Sphäroiden sowie das Auftreten eines pathophysiologischen Gradienten gleichen der Situation in Mikrometastasen, vaskulären Tumoren oder interkapillären Tumorregionen [24, 37].

Dieses dreidimensionale Sphäroid-Modell gleicht folglich histomorphologisch, funktionell und physiologisch soliden Tumoren *in vivo* und stellt daher ein geeigneteres Modell für Analysen von Tumoren *in vitro* dar, als Monolayer-Kulturen der entsprechenden Tumorzellen.

1.4 Photodynamische Therapie

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Konzept der Aminolävulinsäure-basierten Photodynamischen Therapie (ALA/PDT-Behandlung) und ihrem immunogenen Potential. Die ALA/PDT wird am Universitätsklinikum Düsseldorf bereits als experimentelle Therapie eingesetzt. Sie könnte einen wichtigen Fortschritt in der Entwicklung neuer Therapieoptionen für Glioblastom-Patienten bedeuten.

Die Photodynamische Therapie (PDT) ist eine minimal-invasive therapeutische Maßnahme, die zur Behandlung von Neoplasien sowie vaskulären Krankheiten eingesetzt werden kann [38].

Die Geschichte der PDT erstreckt sich über einen langen Zeitraum (vgl. Abbildung 1.4) und begann im späten 19. Jahrhundert, als Oscar Raab entdeckte, dass eine Kombination von Licht und bestimmten Chemikalien Zelltod induzieren kann [39].

1960 initiierten Richard Lipson und Edward Baldes durch die Entdeckung einer selektiven Akkumulation eines Hämatoporphyrin-Derivates (HPD) innerhalb eines Tumors die moderne Ära der PDT [40].

Ein entscheidender Durchbruch gelang im Jahr 1975, als Thomas Dougherty berichtete, dass durch die Kombination von tumor-spezifischer HPD-Akkumulation und Bestrahlung mit rotem Licht eine vollständige Beseitigung eines Mammatumors in Mäusen gelang [41].

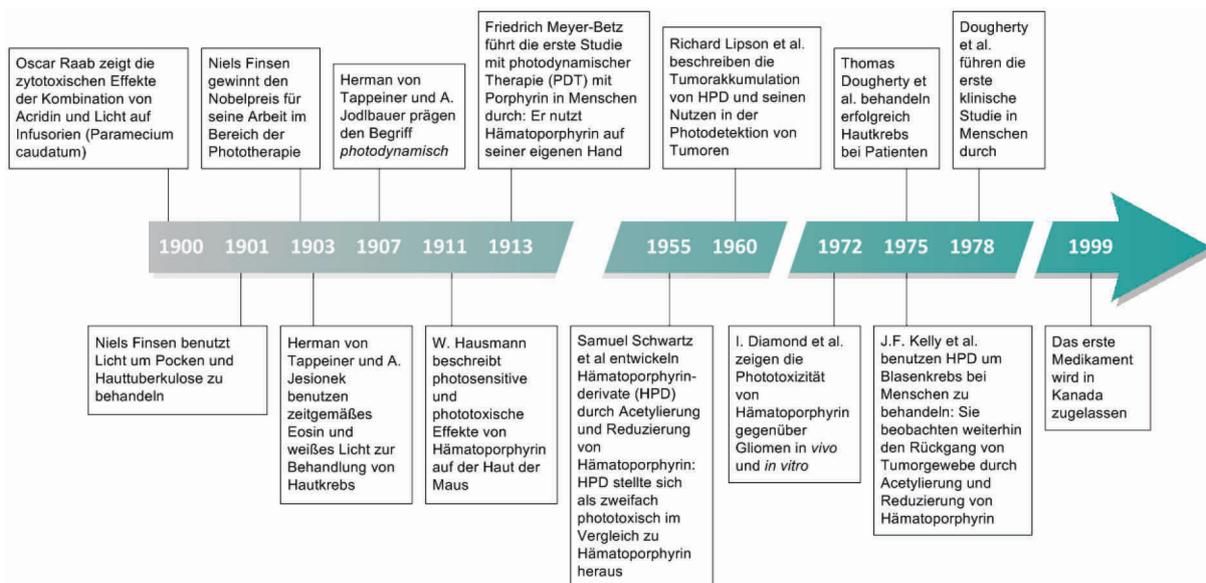


Abbildung 1.4: Die Geschichte der Photodynamischen Therapie (aus Dolmans et al. [42]).

1.4.1 Das Prinzip der Photodynamischen Therapie

Das Prinzip der Photodynamischen Therapie basiert auf drei elementaren Schritten: Zunächst erfolgt die topikale oder systemische Applikation eines Photosensitizers, der sich möglichst selektiv in malignen Geweben anreichert. In einem zweiten Schritt wird der Photosensitizer durch Licht einer spezifischen Wellenlänge aktiviert, wodurch eine photochemische Reaktion induziert wird. Durch Emission und Absorption von Photonen geht ein Elektron des Photosensitizers durch die Laserlicht-Aktivierung in einen energetisch höheren Singulett-Zustand (S_1) über. Intrazellulärer niederenergetischer Sauerstoff (O_2) wird durch das angeregte PPIX-Molekül durch Energieaustausch in den S_1 -Zustand versetzt, so dass ein hochreaktiver Singulett-Sauerstoff (1O_2) oder andere hochreaktive Sauerstoffspezies (ROS) generiert werden. Das Photosensitizer-Molekül geht wieder in seinen Grundzustand S_0 über. Dieser hochreaktive Sauerstoff ist äußerst kurzlebig ($<0,04 \mu s$) und kann umliegende Moleküle in einem Wirkungsradius von $<0,02 \mu m$ durch die Induktion des direkten Zelltods über Apoptose sowie Nekrose schädigen. Dadurch geht er wieder in seinen Grundzustand S_0 über [43]

Die Wellenlänge des Lichtes, die gewöhnlich während der PDT genutzt wird, liegt im roten oder infraroten Bereich elektromagnetischer Wellen. Für den klinischen Einsatz hat sich eine Wellenlänge von 500 - 635 nm in Abhängigkeit des jeweiligen Photosensitizers als optimal erwiesen [44].

Im Jahre 1999 wurde das erste Medikament für eine Photodynamische Therapie in Kanada zugelassen [42]. Heutzutage gibt es eine Bandbreite verschiedener Photosensitizer, von denen lange Zeit Photofrin oder Hämatorporphyrin-Derivate auch für die Behandlung maligner Gliome in der Klinik eingesetzt wurden [45]. Bei Photofrin handelt es sich um ein abgewandeltes Gemisch aus Monomeren, Dimeren und Oligomeren aus veresterten und veretherten Hämatorporphyrinen. Diese Substanz deckt ein großes Spektrum klinischer Anwendungen ab, weist aber auch deutliche Nebenwirkungen

auf. Photofrin erweist sich als nicht sehr selektiv für Tumorgewebe. Orenstein et al. konnten zeigen, dass sich die Aufnahme für Photofrin in malignem Gewebe von Mäusen mit C26-Kolonkarzinom nur unwesentlich von gesundem Gewebe unterscheidet [46].

Als großer Kritikpunkt ist aber in erster Linie die langanhaltende Photosensitivität der Patienten zu erachten. Patienten, die mit Photofrin behandelt wurden, müssen 4-6 Wochen Sonnenlicht meiden, was mit einem deutlichen Verlust an Lebensqualität einhergeht. Aufgrund dieser Punkte wurden verträglichere Photosensitizer entwickelt.

Einen Vertreter der Photosensitizer zweiter Generation stellt die 5-Aminolävulinsäure (ALA) dar. Bei dieser Substanz handelt es sich nicht um einen Photosensitizer, sondern um eine Vorstufe des eigentlichen Photosensitizers Protoporphyrin IX (PPIX), der im Häm-Synthese-Weg in den Mitochondrien aus ALA gebildet wird [47].

ALA wird üblicherweise über Protoporphyrin IX unter Beteiligung des Enzyms Ferrochelatase zu Häm metabolisiert. In Tumorzellen findet dieser Umbau aufgrund eines Ferrochelatase mangels jedoch nicht vollständig statt. Protoporphyrin IX akkumuliert hierdurch in den Tumorzellen [48]. Nach Akkumulation in den Mitochondrien der Tumorzellen, aktiviert eine Bestrahlung mit rotem Licht der Wellenlänge 625 – 635 nm die zuvor beschriebene photochemische Reaktion sowie die damit einhergehenden Zellschädigung durch apoptotische oder nekrotische Prozesse [43, 49-52]. Durch die differentielle Akkumulation von Protoporphyrin IX, hoch in Tumorzellen und niedrig in Normalgewebe, bleibt gesundes Gewebe normalerweise von der Zellschädigung verschont (vgl. Abbildung 1.5).

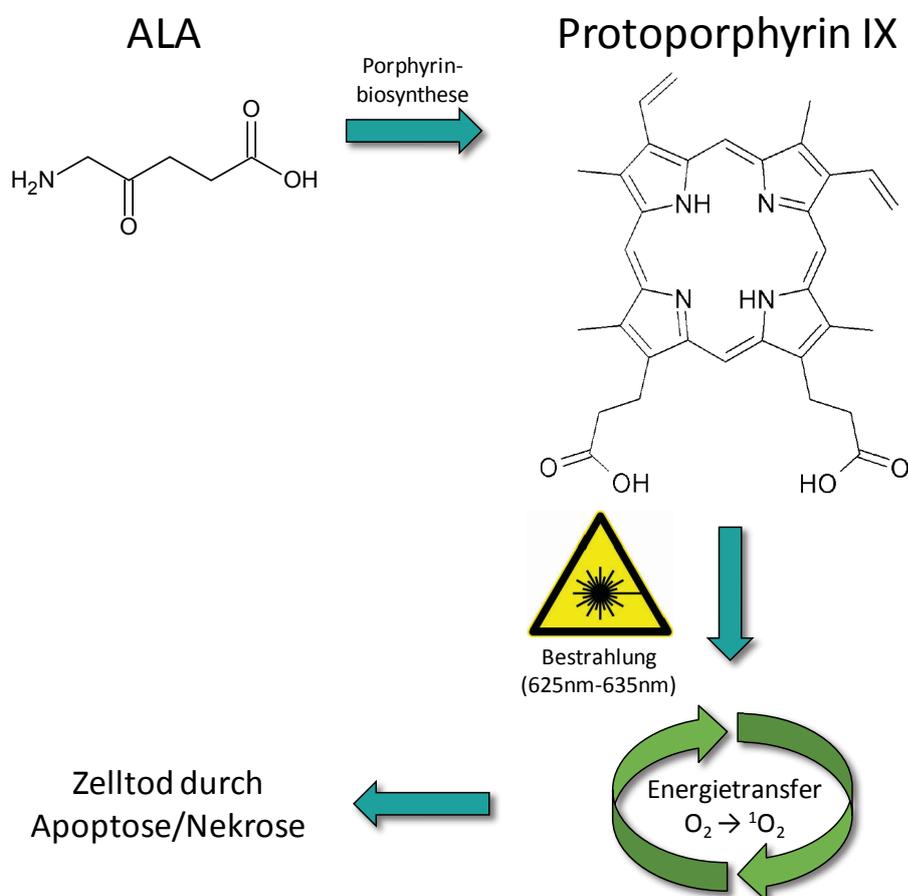


Abbildung 1.5: Prinzip der Photodynamischen Therapie.

Ein Heilversuch im Jahre 2008 verdeutlichte, dass durch eine interstitielle Photodynamische Therapie mit 5-Aminolävulinsäure ein Langzeitüberleben von Patienten, auch mit Gliomen, erreicht werden kann. Eine 31-jährige Patientin mit einem nicht-operablen Rezidiv eines Glioblastoms wurde einer stereotaktischen ALA/PDT-Behandlung unterzogen, wobei nach ALA-Applikation vier Laserdioden für die Bestrahlung in den Tumor eingeführt wurden. Bereits 24 h nach dieser Behandlung zeigte sich im MRT eine deutliche Reduktion des Tumolvolumens. 57 Monate nach dieser Behandlung des Rezidivs und etwa 75 Monate nach der initialen Diagnosestellung des Glioblastoms ist die Patientin noch immer Rezidiv-frei [53].

1.4.2 Mechanismen der PDT

1.4.2.1 Zytotoxische Prozesse

Die Photodynamische Therapie zeichnet sich durch die Induktion zahlreicher anti-tumoraler Effekte aus. Diese beinhalten unter anderem die direkte Schädigung der Tumorzellen, aber auch die Schädigung der Tumor-zugehörigen Blutgefäße. Die direkte Schädigung der Zellen erfolgt über Apoptose, Nekrose sowie Autophagie, wobei die Apoptose den hauptsächlichen PDT-vermittelten Zelltod *in vivo* darzustellen scheint. Die Induktion von Apoptose nach PDT-Behandlung kann durch die Aktivierung zweier Signalkaskaden, die als extrinsischer bzw. Todesrezeptor-vermittelter oder intrinsischer bzw. mitochondrialer Weg bekannt sind, charakterisiert werden [54-56]. Die Beteiligung der Todesrezeptor-vermittelten Signale scheint durch die Freisetzung von Zytokinen durch die PDT-geschädigte Tumorzelle zu erfolgen [54]. Darüber hinaus ist bekannt, dass durch eine Photodynamische Therapie auch der mitochondriale Weg der Apoptose eingeschaltet werden kann. Dieser wird durch eine direkte Schädigung der Mitochondrien-assoziierten Proteine [57] und einer darauffolgenden Ausschüttung von Caspase-Aktivatoren, wie Cytochrom-C oder *apoptosis-inducing-factor* (AIF) initiiert. Caspasen, die als Effektorcaspasen zelleigene Proteine, z.B. Aktin, spalten können, aber auch zur Aktivierung einer Nuklease befähigt sind, die durch Spaltung der nukleären DNA charakterisiert ist, nehmen eine zentrale Rolle in der Apoptose-Maschinerie ein [54]. Die molekularen Mechanismen der Nekrose sind schwer fassbar: RIP1-Aktivierung (*receptor interacting protein 1 kinase*), mitochondriale ROS-Produktion, lysosomale Schäden sowie intrazellulärer Ca^{2+} -Überschuss zählen jedoch zu den molekularen Ereignissen, die eng mit nekrotischem Zelltod assoziiert sind [58]. Besonders durch eine ROS-Generierung in den Tumorzellen infolge einer PDT-Behandlung und einer damit einhergehenden Caspase-Inhibierung könnte die Induktion der nekrotischen Prozesse begünstigt werden [54].

Das Überleben eines Tumors ist unter anderem von seiner Nährstoffversorgung über Blutgefäße abhängig. Dort setzt ein weiterer Wirkmechanismus der Photodynamischen Therapie an. Durch eine PDT-Behandlung kann ein mikrovaskulärer Kollaps induziert werden, der letztendlich zu Hypoxie oder Anoxie innerhalb des Tumors führen kann [59-61]. Prä-klinische *in vivo* Studien zeigten, dass eine PDT-Behandlung in einer bi-phasischen vaskulären Antwort resultiert: der sofortigen Ausbildung einer Vasokonstriktion, d.h. einer Gefäßverengung, gefolgt von einer zeitversetzten Bildung eines Thrombus. Durch diesen kommt es letztendlich zu dem, für den Tumor schädlichen, mikrovaskulären Kollaps [62].

1.4.2.2 Immunologische Komponente der Photodynamischen Therapie

Ungeachtet der Tatsache, dass der, durch die ALA/PDT-Behandlung gebildete Singulett-Sauerstoff eine direkte zytotoxische Komponente besitzt, muss aufgrund der geringen Eindringtiefe der niederenergetischen Laserbestrahlung von weiteren wirksamen Komponenten einer ALA/PDT-Behandlung ausgegangen werden [53]. Neben den direkten Effekten der PDT rückt somit auch ihr immunogenes Potential immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. Zwar werden etwa 90% aller Tumorzellen durch PDT letal geschädigt, jedoch ist dieses nicht ausreichend, um eine Rezidivbildung zu verhindern. Im Widerspruch dazu stehen jedoch die Beobachtungen, dass die Photodynamische Therapie eine vollständige und vor allem dauerhafte anti-tumorale Antwort induzieren kann, und auch ein Rückgang nicht-bestrahlter Tumorareale nach PDT beobachtet werden konnte, so dass weitere indirekte anti-tumorale Mechanismen neben der direkten Toxizität involviert zu sein scheinen. Vergleiche von Wildtyp und immundefizienten Mäusen zeigten, dass eine vollständige anti-tumorale Antwort nur in immunkompetenten Mäusen induziert wird, was als Indiz für eine maßgebliche Beteiligung des Immunsystems gewertet wurde [63].

Es konnte weiter gezeigt werden, dass PDT-induzierte Veränderungen innerhalb des Tumormikromilieus an immunologischen Aktivierungsprozessen angeborener Immunzellen beteiligt sind. Schneller Sauerstoffverbrauch kombiniert mit der Zerstörung der Tumorblutgefäße induziert Hypoxie innerhalb der bestrahlten Tumoren [64], wodurch es zu einer Aktivierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF) kommt. Dieser Faktor reguliert unter anderem die Sekretion zahlreicher inflammatorischer Mediatoren, wie TNF- α , IL-1, IL-2 und Stickstoffmonoxid (NO) sowie die Expression der Toll-like-Rezeptoren in myeloischen Zellen [65, 66]. Auch anhand von Maus-Modellen konnte gezeigt werden, dass eine PDT-Behandlung die Expression der Zytokine Interleukin-1 β und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), d.h. die Induktion von pro-inflammatorischen, immunstimulierenden Faktoren induzieren kann [67-69].

Ein weiteres Indiz für eine immunstimulierende Aktivität nach einer PDT-Behandlung findet sich in der Hochregulierung von Stressproteinen, zu denen unter anderem die Hitzeschockproteine (HSP) zählen [70, 71].

1.5 Hitzeschockproteine (HSP)

Die Schädigung einer Zelle kann zwei konträre Reaktionen induzieren: Apoptose, durch die die geschädigte Zellen zur Vermeidung einer Entzündung entfernt werden, oder protektive Mechanismen, die das Überleben der Zellen sichern sollen [72].

DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) sind essentielle Moleküle, die unter normalen Bedingungen innerhalb der Zelle lokalisiert sind und die als Antwort auf eine Schädigung durch physikalischen oder chemischen Stress eine Translokation auf die Zelloberfläche erfahren [73].

Eine Gruppe dieser Moleküle sind die sogenannten Hitzeschockproteine (HSP). Ihren Namen verdanken diese Proteine ihrer spezifischen Expression nach Hitzeschock, durch die sie erstmalig entdeckt wurden [74]. HSPs sind eine Familie hochkonservierter Chaperone, die maßgeblich dazu beitragen, dass Zellen Stressbedingungen bewältigen können. Zu den häufigsten HSP-assoziierten Stressfaktoren zählen Hitze, zytotoxische Substanzen und UV-Bestrahlung, aber auch Veränderungen der Proteinstruktur sowie des zellulären Metabolismus [75].

Funktionell nehmen Hitzeschockproteine eine zentrale Rolle sowohl in der Qualitätskontrolle neu synthetisierter, als auch Stress-modifizierter Proteine ein. Als molekulare Chaperone unterstützen sie

andere Proteine bei der Faltung bzw. der Erhaltung ihrer Sekundärstruktur. HSPs können zelluläre Proteine im Rahmen einer zellulären Stresssituation vor Denaturierung beschützen, fehlgefaltete Proteine korrigieren und den Abbau funktionsunfähiger Proteine beschleunigen. Innerhalb eukaryotischer Zellen können Hitzeschockproteine in verschiedenen Kompartimenten wie Nukleus, Mitochondrien, Zytoplasma, Lysosomen, Endoplasmatisches Retikulum, aber auch in der Zellmembran lokalisiert sein oder dorthin transloziert werden [76-79].

Die Klassifikation der HSPs erfolgt generell in sieben Klassen: Die erste Klasse beinhaltet die klassischen molekularen Chaperone. Die zweite Klasse wird von Komponenten des proteolytischen Systems repräsentiert, die dazu beitragen, fehlgefaltete Proteine aus den Zellen zu entfernen. Vertreter der dritten Klasse sind RNA- bzw. DNA-modifizierende Enzyme, die Stress-induzierte Schäden beheben können [80]. Metabolische Enzyme gehören zur vierten Klasse der HSP. Regulatorische Proteine wie Transkriptionsfaktoren oder Kinasen sind Repräsentanten einer weiteren HSP-Klasse. Proteine, die essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Strukturen oder für die Entgiftung der Zelle sowie Membran-Modulierung sind, werden in die verbliebenen beiden Gruppen eingeteilt [81]. Tabelle 3 gibt einen kurzen Überblick auf die unterschiedlichen HSP-Klassen.

Tabelle 3: Klassen der HSP (aus Richter et al. [81])

| HSP-Klasse | Vertreter |
|------------|---|
| I | Molekulare Chaperone |
| II | Komponenten des proteolytischen Systems |
| III | RNA-/ DNA- modifizierende Enzyme |
| IV | Metabolische Enzyme |
| V | Regulatorische Proteine |
| VI | Zellstrukturproteine |
| VII | Membran-modulierende Proteine |

Ferner werden die Hitzeschockproteine anhand ihrer Größe in hochmolekulare, ATP-abhängige sowie kleine, ATP-unabhängige HSPs eingeteilt. Bekannt sind die Familien der HSP100, HSP90, HSP70 und HSP60 sowie HSP27 und α B-Crystallin [75].

1.5.1 HSP70

Eine herausragende Stellung unter den HSPs nimmt die HSP70-Familie ein. Die Mitglieder dieser Gruppe werden in nahezu allen Organismen exprimiert. Sie können in allen zellulären Kompartimenten lokalisiert sein und finden sich darüber hinaus ebenfalls im extrazellulären Raum [82]. Die Vertreter dieser Familie sind hoch konservierte Chaperone, die zum einen konstitutiv vorliegen, zum anderen aber auch als Konsequenz auf Stresseinwirkung exprimiert werden [83]. Unter physiologischen Bedingungen sind sie in der *de novo* Faltung von Proteinen involviert, verhindern unter Stresskonditionen aber die Anhäufung denaturierter Proteine und können sogar fehlgefaltete Proteine „korrigieren“ [84].

Sogenannte Hitzeschockfaktoren (*heat shock factors*, HSFs) sind für eine effektive Expression von HSP70 verantwortlich. Hierbei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die mit Hitzeschockelementen in der Promoterregion der DNA interagieren. HSF1 ist der am besten charakterisierte Hitzeschockfaktor und bezeichnend für eine schnelle Antwort auf Stressfaktoren wie Hitze oder Chemikalien [85]. Unter physiologischen Bedingungen liegt HSF1 als Monomer im Zytoplasma vor. Durch Stimulation einer MAP-Kinase (*Mitogen-aktivierte Proteinkinasefamilie*) werden Phosphorylierungs- sowie Trimerisierungsprozesse induziert. Nach Translokation des neu gebildeten HSF1-Komplexes in den Zellkern erfolgt die Aktivierung der Hitzeschockgene durch Bindung des Komplexes an die Promotorregion [86].

Zusätzlich wird die Aktivität des translatierten HSP70 von sogenannten Co-Faktoren reguliert. Neben der bekanntesten Gruppe, den HSP40, spielen weitere Partnermoleküle eine essentielle Rolle, beispielsweise in der Proteindegradierung. Während Partnermoleküle wie BAG-1 und CHIP eine Degradierung der Proteine induzieren, stimuliert eine Bindung der Moleküle Hip und Hop eine Proteinfaltung.

Neben den ursprünglich beschriebenen Funktionen als zentraler Faktor bei der Faltung und Degradierung von Proteinen sind die Aufgaben der HSP70 vielfältig. So finden sie als essentielle Partnermoleküle beim Proteintransport vom Zytosol in die Mitochondrien Verwendung [87] und sind unter anderem an der Regulation des Zellzyklus beteiligt [88].

Eine Kernaufgabe stellt jedoch der Schutz bzw. die Reparatur einer geschädigten Zelle nach Stresswirkung dar. Die Beteiligung von HSP70 im Rahmen apoptotischer Prozesse ist vielfältig und betrifft neben verschiedenen Apoptose-Kaskaden auch unterschiedliche Angriffspunkte innerhalb der apoptotischen Signalwege [89, 90] (vgl. Abbildung 1.6). Eine anti-apoptotische Wirksamkeit von HSP70 ist bekannt und wurde in der Tumorummunologie näher charakterisiert [91, 92]. Apoptotische Prozesse als Konsequenz von Stresseinwirkungen oder exogenen Faktoren wie Tumornekrosefaktor-alpha können von HSP70 inhibiert werden.

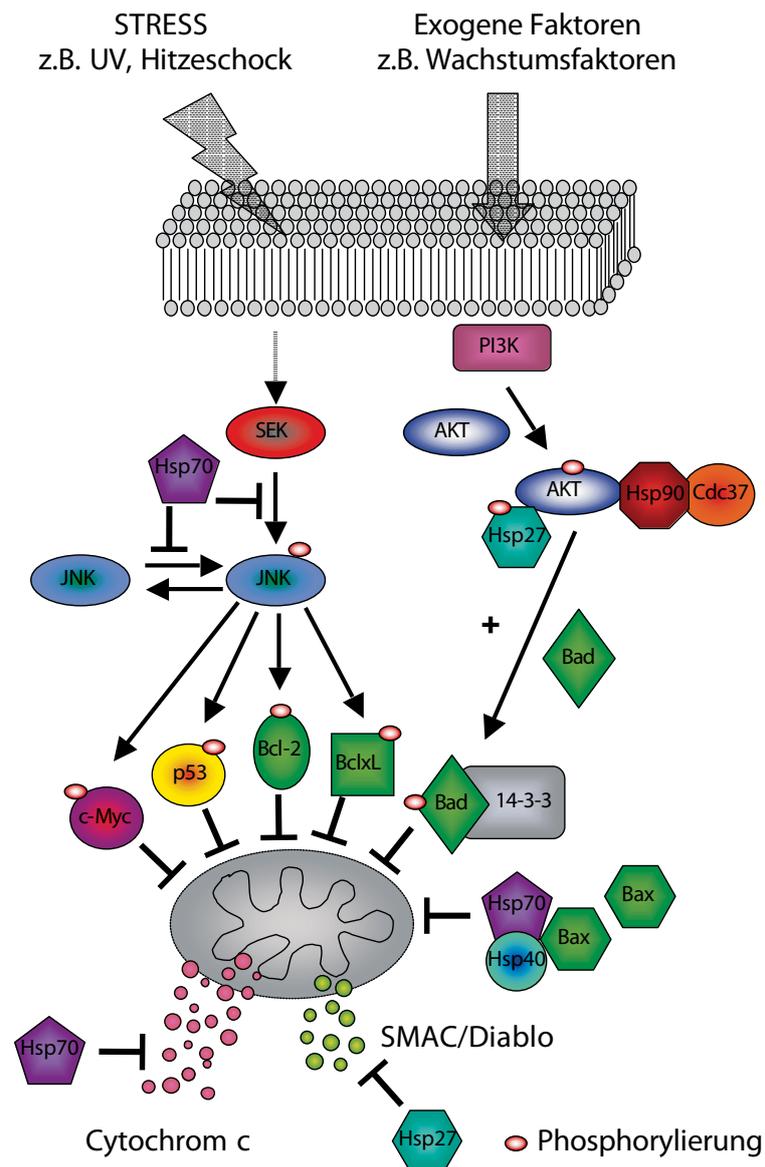


Abbildung 1.6: Anti-apoptotische Wirkung von HSP70 (Abbildung aus Helen Beere [72]).

1.5.2 HSP70 und das Immunsystem

Darüber hinaus kann HSP70 funktionell auch als immunstimulierendes Molekül fungieren, sofern es auf der Zellmembran lokalisiert vorliegt oder in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Es kann als potenter Aktivator der angeborenen Immunität agieren, indem extrazellulär lokalisiertes HSP70 die Expression pro-inflammatorischer Zytokine durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) über HSP70-spezifische Rezeptoren initiiert. Beschrieben sind unter anderem die Rezeptoren Lipopolysaccharidrezeptor CD14 [93], Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) [94] und der α 2-Makroglobulinrezeptor CD91 [95], und die Synthese der Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-12 durch APC, so dass eine Immunantwort eingeleitet werden kann.

Darüber hinaus initiieren Pathogen-stämmige HSP-Proteine die Ausreifung Antigen-präsentierender Zellen, nachweisbar durch eine Hochregulation der HLA-Klasse I- und -II-Moleküle und der co-

stimulatorischen Signale CD40, CD80 und CD86 sowie eine Migration der reifen DC und eine anschließende Stimulation einer T-Zell-Antwort [96-98].

Eine interessante Rolle spielen HSPs, und insbesondere HSP70, auch im Zusammenhang mit der Photodynamischen Therapie. Für unterschiedliche Tumorentitäten, darunter Kolonkarzinom (C-26), Fibrosarkom (RIF-1) und Plattenepithelkarzinom (SCCVII), konnte gezeigt werden, dass eine PDT-Behandlung die Expression von HSP70 induziert [70, 71, 99, 100]. Wie eingangs bereits beschrieben, kann HSP70 funktionell als immunstimulierendes Molekül fungieren, wenn es auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Heutzutage ist es bekannt, dass durch eine PDT-Behandlung die Expression von HSP70 auch auf der Tumorzelloberfläche induziert werden kann, so dass die Opsonierung dieser Zellen begünstigt wird [70, 100, 101]. Damit kann eine Erkennung der Tumorzellen durch immunreaktive Zellen gewährleistet werden und HSP70 erweist sich als potenter stimulatorischer Effektor im Rahmen einer anti-tumoralen Immunantwort nach Photodynamischer Therapie.

1.6 Das Immunsystem

Der menschliche Körper ist durch eine Vielzahl verschiedener Effektorzellen und Moleküle in der Lage, sich vor Pathogenen in Form von Bakterien, Pilzen, Viren, Parasiten oder schädlichen Substanzen (z.B. Toxinen) zu schützen. Diese Zellen und Moleküle bilden zusammen das Immunsystem. Im Rahmen dieses komplexen Systems agieren sie auf unterschiedliche Weise miteinander, um den Schutz des Körpers zu gewährleisten. Klassischer Weise differenziert man die angeborene und die adaptive Immunität. Sowohl die angeborene, als auch die adaptive Immunantwort basieren auf Aktivitäten der Leukozyten (weiße Blutzellen), welche ihren zellulären Ursprung in den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks haben [102].

Charakteristisch für die angeborene Immunität sind eine allgemeinspezifische Erkennung generell vorkommender konservierter Pathogenstrukturen sowie eine sofortige Reaktion bei einem Kontakt mit einem Antigen.

Erweisen sich die Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität als nicht effektiv genug, um die Pathogene zu beseitigen, so erfolgt die Aktivierung der adaptiven Immunabwehr. Kennzeichnende Charakteristika der adaptiven Immunität sind eine hohe Feinspezifität und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses als Konsequenz eines Erstkontaktes mit einem Pathogen, wodurch bei erneutem Kontakt mit diesem Pathogen effektiver und schneller eine spezifische Immunreaktion ermöglicht wird [102, 103]. Tabelle 4 verschafft einen kurzen Überblick über die wichtigsten Merkmale der angeborenen und adaptiven Immunität.

Tabelle 4: Angeborene und adaptive Immunität (modifiziert nach Janeway et al. [103]; LPS: Lipopolysaccharid, LTS: Lipoteichonsäure)

| | Angeborene Immunität | Adaptive Immunität |
|-----------------------|--|--|
| Rezeptor | Fixiert im Genom, Umverteilung nicht notwendig | Kodiert in Gen-Segmenten, Umverteilung erforderlich |
| Verteilung | Nicht-Klonal | Klonal |
| Erkennung über | Konservierte molekulare Muster (LPS, LTS, Glykane) | Details molekularer Strukturen (Proteine, Peptide, etc.) |
| Reaktionszeit | Sofortige Aktivierung der Effektorzellen | Verzögerte Aktivierung der Effektorzellen |

1.6.1 Die angeborene Immunität

Nach dem Eindringen eines Mikroorganismus über Haut oder Schleimhäute, welche bereits eine erste mechanische, chemische und mikrobiologische Barriere für eindringende Pathogene darstellen, verhindern die angeborenen Abwehrmechanismen zumeist die Entstehung einer Infektion. Phagozyten (Makrophagen), die in den meisten Geweben lokalisiert sind, erkennen die Pathogene und beseitigen diese durch Phagozytose.

Die angeborene Immunität basiert auf der Erkennung sogenannter „Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) über zahlreiche Pattern-Recognition-Rezeptoren, die auf Zelloberflächen oder in intrazellulären Kompartimenten exprimiert werden [104]. Bei diesen Mustern handelt es sich um konservierte Strukturen, welche vielen Pathogenen gemeinsam sind und eine Unterscheidung zwischen Pathogen und körpereigenen Zellen ermöglichen. Lipopolysaccharide, als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien sowie Lipoteichonsäure von grampositiven Bakterien können als Beispiele für PAMPs angeführt werden. Zahlreiche Rezeptoren, wie der Lipopolysaccharid-Rezeptor (CD14), Makrophagen-Mannose-Rezeptor, Scavenger-Rezeptoren und Toll-like-Rezeptoren erkennen diese Pathogenstrukturen und leiten die Eliminierung der so identifizierten Pathogene durch Phagozytose, gefolgt vom Abbau im Phagosom ein [103].

Zusätzlich sezernieren die aktivierten Makrophagen Zytokine und Chemokine (unter anderem Tumornekrose-Faktor alpha (TNF- α), IL-1, IL-6, IL-8), wodurch ein pro-inflammatorisches Mikromilieu entsteht, durch das weitere Makrophagen, aber auch Granulozyten, eine weitere Population phagozytischer Leukozyten, anhand des gebildeten Chemokingradienten zum Infektionsort gelockt werden können. Darüber hinaus stellt dieses immunstimulatorische Milieu zusammen mit den Pathogenen und deren PAMPs einen Teil des sogenannten Danger-Signals dar, welches die adaptive Immunantwort initiiert [105, 106].

1.6.2 Die erworbene/adaptive Immunität

Da sich die angeborene Immunität durch eine Erkennung generell vorkommender, konservierter Pathogenstrukturen durch unveränderliche Rezeptoren auszeichnet, haben zahlreiche Pathogene Mechanismen entwickelt, um dieser Abwehr zu entgehen.

Im Gegensatz dazu verfügt die erworbene oder adaptive Immunität über ein enormes Repertoire klonal exprimierter Antigenrezeptoren durch die nahezu jedes Antigen identifiziert werden kann. Die Effektorzellen der erworbenen Immunität sind Lymphozyten, zu denen B-Zellen und T-Zellen zählen. Diese Zellen sind Träger dieser Antigenrezeptoren. Die Vielfalt an Rezeptoren entsteht durch zufällige Kombination variabler Gensegmente im Rahmen eines als somatische Rekombination bezeichneten Prozesses während der Lymphopoese, d.h. während der Entwicklung reifer Lymphozyten aus hämatopoetischen Stammzellen.

Die adaptive Immunität lässt sich grundlegend in die humorale und zelluläre/zellvermittelte Immunität einteilen, die sich durch unterschiedliche Effektormechanismen auszeichnen. T-Lymphozyten stellen die Effektorzellen der zellulären Immunität dar. Der humorale Arm wird durch Immunglobuline, welche durch B-Zellen bzw. aus B-Zellen hervorgegangenen Plasmazellen sezerniert werden, repräsentiert. Grundsätzlich liegen T- und B-Zellen als ruhende Zellen vor. Jede Zelle trägt dabei auf ihrer Oberfläche Antigenrezeptoren einer Spezifität. Nach Kontakt des Körpers mit einem Pathogen können in der sogenannten Initiationsphase der Immunantwort ruhende T-Zellen durch Dendritische Zellen sowie B-Zellen durch T-Helfer-Effektorzellen, entsprechend ihrer Antigen-Spezifität, aktiviert werden. Hierdurch kommt es zu einer klonalen Vermehrung und Differenzierung der antigenspezifischen Zellen zu Effektorzellen. Die Effektorzellen vermitteln dann die zielgerichtete Immunreaktion gegen das Pathogen. Die Effektorzellen der humoralen Antwort sind die Plasmazellen, die antigenspezifische Immunglobuline als Effektormoleküle sezernieren. T-Effektorzellen, d.h. die Träger der zellulären Immunantwort, differenziert man klassischerweise in zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), die zur Lyse von Zielzellen befähigt sind, und T_{Helfer}-Zellen, die sich durch eine regulatorische Funktion für die zelluläre, aber auch die humorale Immunantwort auszeichnen. Die Bildung der Effektorzellen nimmt etwa vier bis fünf Tage in Anspruch, wodurch sich die verzögerte Verfügbarkeit der adaptiven Immunantwort erklären lässt [102].

Ein weiteres Charakteristikum der adaptiven Immunität ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses als Konsequenz eines Erstkontaktes mit einem Pathogen, wodurch bei erneutem Kontakt mit diesem Pathogen eine effektivere und schnellere spezifische Abwehr ermöglicht wird. Einige der aktivierten antigenspezifischen B- und T-Zellen bleiben auch nach Abklingen der Infektion im Körper erhalten und generieren das immunologische Gedächtnis. Durch die nun höhere Frequenz, der für das Pathogen spezifischen Effektorzellen sowie einer vereinfachten Aktivierbarkeit der Gedächtniszellen im Vergleich zu den naiven Zellen, kommt es im Falle einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen zu einer wesentlich schnelleren und effektiveren Immunantwort gegen das Pathogen [107, 108].

1.7 Dendritische Zellen (DC)

Dendritische Zellen stellen im Rahmen des Immunsystems eine bedeutende Zellpopulation dar. Im Jahre 1868 erfolgte erstmalig durch Paul Langerhans eine histomorphologische Identifizierung Dendritischer Zellen in der Epidermis, die nach ihrem Entdecker als Langerhans-Zellen benannt wurden. Doch erst 100 Jahre später gelang es Steinman und Kollegen diese Zellpopulation funktionell als Antigenpräsentierende Zellen zu charakterisieren [109].

Besonders der Entdeckung verschiedener Techniken zur Generierung Dendritischer Zellen *in vitro* in den 90er Jahren ist es jedoch zu verdanken, dass die biologischen und molekularen Besonderheiten dieser seltenen Zellen immer weiter entschlüsselt werden können [110, 111].

Ihren Namen verdanken die Dendritischen Zellen ihrer Morphologie, die sich durch typische, unregelmäßige, lange, dünne zytoplasmatische Ausläufer auszeichnet, den Dendriten, die den Dendriten der Neuronen ähneln. Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Immunantwort, da sie als hochpotente Antigenpräsentierende Zellen die einzigen antigenpräsentierenden Zellen darstellen, die die Fähigkeit besitzen eine naive T-Zell-Antwort zu initiieren. Somit nehmen sie die Stellung des entscheidenden funktionellen Bindegliedes zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort ein. Neben der eigentlichen Initiation der Antwort sind sie auch für ihre Polarisierung, d.h. den sich entwickelnden Effektormechanismen der Immunantwort entscheidend. Darüber hinaus sind Dendritische Zellen in der Lage, T-Gedächtniszellen zu aktivieren, eine Funktion, die aber auch von anderen APC ausgeführt werden kann [112]. Neben ihrer Rolle bei der Entstehung von Immunität nehmen sie außerdem eine zentrale Stellung in der Aufrechterhaltung von Toleranz ein. Im Thymus sind sie während der Entwicklung der T-Zellen an der negativen Selektion, einem Mechanismus, der zum Ausschalten autoreaktiver T-Zellen führt, beteiligt. Aber auch während der Initiationsphase einer Antwort sind Dendritische Zellen daran beteiligt, dass autoreaktive T-Zellen nicht aktiviert werden [113].

Ursprünglich war man der Auffassung, Dendritische Zellen seien myeloischen Ursprungs. Stand der heutigen Forschung ist es jedoch, dass DC sowohl aus der myeloischen (myeloische oder konventionelle DC) als auch aus der lymphozytären (plasmazytoide DC) Entwicklungsreihe hervorgehen können [114, 115].

Plasmazytoide Dendritische Zellen finden sich unter anderem im Thymus sowie den sekundären lymphatischen Organen. Sie sind für die negative Selektion entscheidend, spielen aber auch eine Rolle bei der Abwehr viraler Infektionen.

Zu den myeloischen Dendritischen Zellen gehören unter anderem die dermalen Dendritischen Zellen, die Langerhans-Zellen der Epidermis und die interstitiellen DC, die in nahezu allen Geweben nachgewiesen werden können [116, 117]. Sie zeichnen sich durch eine enge Verwandtschaft mit Monozyten aus, die als Vorstufe von DC angesehen werden können.

1.7.1 Antigenaufnahme durch unreife Dendritische Zellen

Dendritische Zellen können als unreife und reife Dendritische Zellen im Körper vorliegen, welche sich funktionell voneinander unterscheiden.

Unreife Dendritische Zellen sind gewebsständige Zellen, die sich durch kontinuierliche und effiziente Antigenaufnahme auszeichnen. Dazu haben diese Zellen ein großes Repertoire unterschiedlicher Mechanismen, mit denen sie ihrer Aufgabe gerecht werden, und Pathogene und tote Zellen sowie andere Antigene zunächst erkennen und aufnehmen und sie dann für eine Immunpräsentation prozessieren.

Kleine Partikel sowie Mikroorganismen können phagozytiert werden. Antigene, die in gelöster Form vorliegen werden über Makropinozytose aufgenommen. Die Aufnahme größerer Antigene erfolgt des Weiteren über die Rezeptor-vermittelte Endozytose via C-Typ-Lektin-Rezeptoren, z.B. über den Mannose-Rezeptor oder DEC-205.

Unreife DC exprimieren zahlreiche Chemokin-Rezeptoren, unter anderem CCR1, CCR2, CCR5 und CCR6, wodurch sie entlang eines Chemokingradienten zu Infektionsorten migrieren können, wo die entsprechenden Liganden gebildet werden [118, 119]. Ferner exprimieren sie zahlreiche Toll-like-Rezeptoren (TLR), mit deren Hilfe ein breites Pathogenspektrum erkannt wird. Einige Toll-like-Rezeptoren, wie z.B. TLR4 als Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS) oder TLR2 als Rezeptor für Lipoteichonsäure sind Plasmamembran-ständig, wohingegen andere in den endosomalen Kompartimenten lokalisiert sind (TLR7, TLR8, TLR9 zur Identifizierung von Nukleinsäuren) [120]. Zusätzlich agieren Nod-ähnliche Rezeptoren als zytosolische Sensoren für bakterielle Produkte [121].

Die Gesamtheit von Signalen, unter anderem die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1, IL-6 oder TNF- α am Infektionsort sowie TLR-Signale, die das Vorkommen pathogener Strukturen anzeigen, oder die Expression von Stressproteinen auf Körperzellen sowie die Gegenwart toter Zellen, als Indikatoren für pathologische Veränderungen innerhalb des Körpers, generieren ein sogenanntes Danger-Signal, durch das letztendlich determiniert wird, ob eine Ausreifung der DC initiiert wird [105, 106].

1.7.2 Ausreifung Dendritischer Zellen

Die Ausreifung Dendritischer Zellen ist durch zahlreiche Veränderungen und Umstrukturierungen geprägt. Im Rahmen des Ausreifungsprozesses kommt es zunächst zu einer Herunterregulation der Phagozytose, die mit der Einstellung der Antigen-Aufnahme einhergeht.

Der Verlust der zum Infektionsort-leitenden Chemokin-Rezeptoren ist ein weiteres Kennzeichen reifer Dendritischer Zellen. Des Weiteren wird das hochorganisierte subkortikale Aktin-Zytoskelett depolymerisiert. Fokale Adhäsionsstrukturen gehen dabei verloren.

Es erfolgt eine Hochregulation der Chemokin-Rezeptoren CCR4 und CCR7, welche für die Migration der Dendritischen Zellen aus dem peripheren Gewebe in die Lymphknoten elementar sind [118, 119].

Von zentraler Bedeutung ist außerdem die Fähigkeit der reifen Dendritischen Zelle zur Antigenpräsentation und der damit einhergehenden Aktivierung von vornehmlich naiven T-Zellen, der Ausgangspopulation adaptiver Immunität. Reife DC zeichnen sich durch eine große Dichte an HLA-Klasse I- und II-Molekülen auf ihrer Oberfläche aus [122]. Parallel exprimieren sie die co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie weiterer Adhäsions- und akzessorischer Moleküle (ICAM-1, ICAM-3, CD58, CD83).

Als weitere Konsequenz der Danger-Signale am Infektionsort sezernieren reife DC Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, TNF- α und Interferone [123] oder exprimieren auf ihrer Oberfläche akzessorische Moleküle wie OX40L, die die Differenzierung der aktivierten antigenspezifischen T-Zellen zu einem bestimmten T-Zell-Effektortyp steuern.

1.7.3 Die Antigenpräsentation und der HLA-Komplex

Nur durch die Wechselwirkung einer reifen Dendritischen Zelle, die ein Antigen im Kontext sogenannter HLA-Moleküle präsentiert, mit einer naiven Antigen-spezifischen T-Zelle, kann eine T-Zell-vermittelte Immunantwort initiiert werden. Daher müssen in den DC die aufgenommenen Antigene (Proteinen) zu Peptiden prozessiert werden, um diese dann über HLA-Moleküle auf der Oberfläche präsentieren zu können.

HLA-Moleküle können zwei unterschiedlichen Klassen zugeordnet werden: HLA-Klasse I sowie Klasse II, die auf unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden. Die kodierenden Gene für die humanen HLA-I- und -II-Proteine sind auf dem Chromosom 6p im *Human Leukocyte Antigen-Complex* (HLA) lokalisiert. HLA-A, -B und -C repräsentieren die klassischen HLA-Klasse I-Gene, wohingegen HLA-DP, -DQ und -DR Vertreter der HLA-Klasse II sind.

HLA-Klasse I-Moleküle sind auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Bei diesem Molekül handelt es sich um ein Dimer aus einer polymorphen α -Kette, an die das antigene Peptid gebunden wird, und einem invariablen β 2-Mikroglobulin, welches die Struktur der α -Kette stabilisiert. Das gebundene Peptid, ursprünglich ein Protein endogenen Ursprungs, wurde zuvor im Rahmen zytosolischer Prozesse im Proteasom generiert. Nur DC können Peptide exogenen Ursprungs, d.h. aufgenommene Antigene, über HLA-Klasse I präsentieren, ein Prozess, der als Kreuzpräsentation bezeichnet wird. Im Anschluss an die Peptid-Generierung erfolgen eine ATP-abhängige Translokation mittels TAP-Molekülen (*transporter associated with antigen presentation*) vom Zytosol in das endoplasmatische Retikulum und die Beladung eines dort synthetisierten HLA-Klasse I Moleküls. Der so entstandene Komplex wird nun mittels Vesikel über den Golgi-Komplex an die Zelloberfläche transportiert, wo sie von spezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt werden können [124-126].

HLA-Klasse II Moleküle dienen der Präsentation extrazellulärer Antigene, bestehen aus einer α - und einer β -Kette und werden exklusiv auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. Durch Pinozytose, Phagozytose und rezeptorvermittelte Endozytose werden Proteine exogenen Ursprungs im Lysosom abgebaut. Im endoplasmatischen Retikulum wird währenddessen das HLA-Klasse II Molekül synthetisiert und im Anschluss über den Golgi-Apparat in Vesikeln zu den Endosomen/Lysosomen transpor-

tiert, in denen sich die degradierten Proteine (Peptide) befinden. Nach Beladung des HLA-Klasse II Moleküls mit einem Peptid, erfolgt die Translokation auf die Zellmembran, wo der Komplex von spezifischen T_H-Zellen (CD4⁺) erkannt werden kann [127].

1.8 T-Zellen

T-Zellen entwickeln sich im Rahmen der T-Lymphopoese aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und wandern zur Ausreifung in den Thymus, einem primären lymphatischen Organ, ein.

Im Thymus durchlaufen sie verschiedene Entwicklungsstufen, die sich durch spezifische Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen unterscheiden lassen.

Frühe Thymozyten, die noch keinen CD3-T-Zell-Rezeptor-Komplex ausgebildet haben, exprimieren weder CD4- noch CD8-Rezeptoren, die Co-Rezeptoren des T-Zell-Rezeptors, auf ihrer Oberfläche. Im Verlauf der weiteren Entwicklung erfolgen die Umlagerungsprozesse des T-Zell-Rezeptors und es entstehen sogenannte Doppel-positive Thymozyten (CD4⁺/CD8⁺). Die Zellen unterliegen der positiven Selektion [102].

Durch die positive Selektion wird sichergestellt, dass T-Zellen eine niedrige Affinität für körpereigene HLA-Proteine besitzen, da nur hierdurch eine Funktionalität der Zellen gewährleistet ist. Im Anschluss haben die positiv selektierten Thymozyten auch einen der beiden Co-Rezeptoren, CD4 oder CD8, verloren und liegen nun als einfach positive Thymozyten vor. Die nun einsetzende negative Selektion ist ein Prozess, in dem T-Zellen eliminiert werden, welche reaktiv gegenüber Komplexen aus HLA-Proteinen und körpereigenen Peptiden sind. Sie werden durch Apoptose deletiert. Nur 2-5 % der Thymozyten, die im Thymus gebildet werden, verlassen nach positiver und negativer Selektion als reife naive oder zytotoxische T-Zelle den Thymus. Alle anderen werden durch apoptotische Prozesse als Konsequenz der Selektion eliminiert [128].

Nach Abschluss der thymischen Entwicklung können die T-Zellen anhand ihrer Co-Rezeptoren in zwei Klassen mit unterschiedlichen Funktionen, den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, untergliedert werden. CD4⁺ T_{Helfer}-Zellen erkennen über HLA-Klasse II präsentierte Peptide und haben regulatorische Funktion. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen erkennen über HLA-Klasse I präsentierte Peptide und können so erkannte Zellen lysieren.

Die Aktivierung anderer Effektorzellen, u.a. Antigen-spezifischer B-Zellen, ist die primäre Funktion der CD4⁺ T_{Helfer}-Zellen. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL) induzieren dagegen nach Aktivierung und Differenzierung zu Effektorzellen Apoptose, zum einen durch Fas-Liganden, zum anderen mittels zytoplasmatischer, lytischer Granula, mit Granzym B und Perforin, die freigesetzt werden, wenn sie ihr Peptid auf einer anderen Zelle erkennen [129].

T-Zellen, die nach ihrer Entstehung noch nie Antigenkontakt hatten, bezeichnet man als naive T-Zellen. Sie können durch Expression einer Isoform des Panleukozytenantigens CD45 (CD45RA) identifiziert werden. Innerhalb weniger Tage nach Antigenkontakt werden durch klonale Expansion zahlreiche Effektorzellen ausgebildet, die über den Blutkreislauf in die Peripherie sowie die unterschiedlichen Gewebe gelangen [130, 131].

1.8.1 Induktion einer T-Zellantwort

Aktiviert, ausgereifte Dendritische Zellen können nach erfolgreicher Antigenaufnahme und –prozessierung die jeweiligen Antigene in Form von Peptiden naiven T-Zellen präsentieren. Makrophagen und B-Zellen sind neben DC zur Antigenpräsentation befähigt, jedoch vermögen ausschließlich DC die Induktion einer Primärantwort naiver T-Zellen zu stimulieren [116, 132, 133]. Im Lymphknoten kommt es zunächst zu einer Ausbildung der sogenannten immunologischen Synapse zwischen DC und naiver T-Zelle (vgl. dazu Abbildung 1.7). Als Folge zahlreicher Signale, die über diese Synapse übertragen werden, erfolgt die Aktivierung der entsprechenden Peptid-spezifischen T-Zellen, was in deren Proliferation sowie Differenzierung zu Effektorzellen resultiert.

Über Adhäsionsmoleküle wie Integrine und Selektine wird die erste HLA-unabhängige Interaktion zwischen DC und naiver T-Zelle initiiert [134]. Dendritische Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54) und ICAM-2 (CD102), die eine Bindung an die T-Zellen über LFA-1, einem Heterodimer aus CD11a und CD18, ermöglichen. Weitere Wechselwirkungen erfolgen über LFA-3 (CD58) und DC-SIGN, die mit CD2 bzw. ICAM-3 (CD50) interagieren. Nach Erkennung eines spezifischen Peptid-HLA-Liganden, löst der T-Zell-Rezeptor der naiven T-Zelle ein Signal aus, das eine Konformationsänderung von LFA-1, mit einhergehender Stabilisierung der Synapse induziert.

Zusätzlich bedarf es noch weiterer Signale, um die Aktivierung der T-Zellen zu initiieren. Eine zentrale Rolle spielt das co-stimulatorische Signal, welches durch die Interaktion zwischen CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf Dendritischen Zellen und dem T-Zell-Molekül CD28 generiert wird. Dieses Signal wird als essentiell betrachtet, da dessen Ausbleiben Apoptose oder Anergie der T-Zelle induziert [135, 136]. Eine Hochregulierung der Expression der Moleküle CD80 und CD86 auf Dendritischen Zellen erfolgt nach Bindung des DC-Moleküls CD40 an den entsprechenden CD40-Liganden (CD154) auf der T-Zelle [137].

Schließlich bedarf es zur vollständigen Aktivierung der naiven T-Zelle eines dritten Signals in Form von Zytokinen oder Oberflächenmolekülen, die von Dendritischen Zellen, aber auch anderen Immunzellen, entweder am Ort der Aktivierung oder der Effektorfunktion sezerniert werden. Diese polarisierenden Signale determinieren die Entwicklung der jeweiligen T_{Helfer} -Effektorzelltypen ($T_{\text{H}1}$, $T_{\text{H}2}$, $T_{\text{H}3}$, $T_{\text{H}9}$, $T_{\text{H}17}$, T_{reg} , etc.) und damit die Ausrichtung der Immunantwort (z.B. humoral vs. zellulär) [138]. IL-12 sowie IFN- α und IFN- γ initiieren beispielsweise eine Differenzierung der $CD4^+$ T-Zellen in $T_{\text{H}1}$ -Zellen, IL-4, OX40L oder *Jagged* hingegen eine Differenzierung zu $T_{\text{H}2}$ -Zellen [139-142].

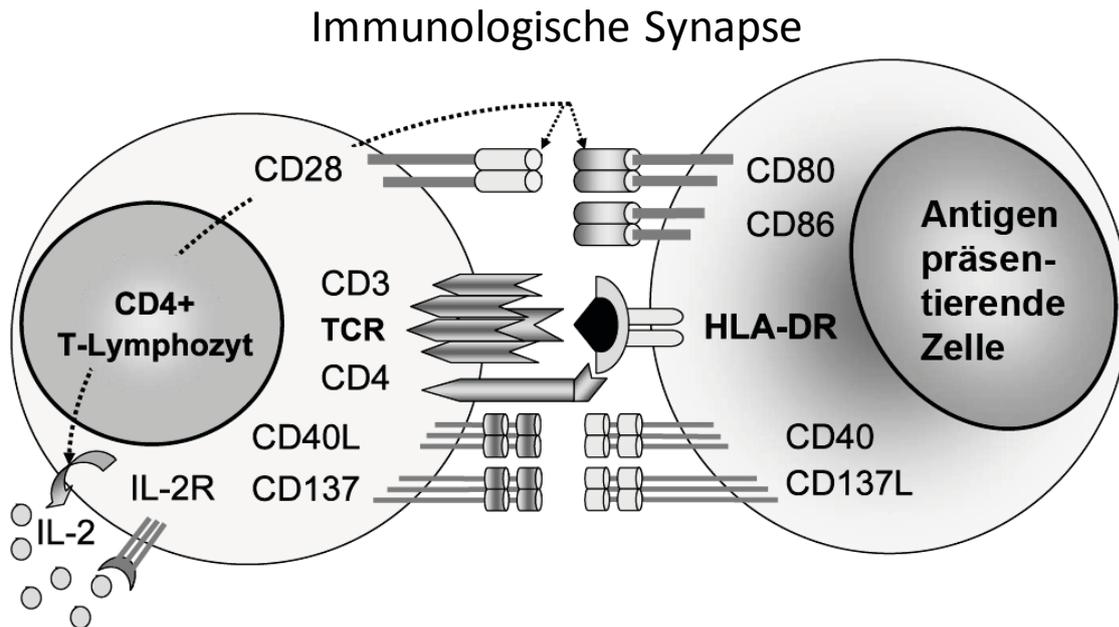


Abbildung 1.7: Immunologische Synapse (modifiziert nach C. Hardt [143]).

1.9 Zielsetzung

Neben einer direkten phototoxischen Schädigung der Tumorzellen besitzt die Photodynamische Therapie vermutlich noch weitere Wirkmechanismen. Die Induktion anti-tumoraler Immunität, d.h. der Ausbildung zytotoxischer Effektor-T-Zellen, welche die Tumorzellen abtöten können wird hierbei eine maßgebliche Rolle zugesprochen.

Hierfür müsste durch die ALA/PDT und die durch sie gesetzte Schädigung der Tumorzellen ein pro-inflammatorisches Mikromilieu geschaffen werden, das chemoattraktiv für unreife Dendritische Zellen ist, wodurch diese zu den geschädigten Tumorzellen migrieren und zur Antigenaufnahme stimuliert werden. Ferner müsste die ALA/PDT ein Danger-Signal generieren, das zur Ausreifung der Dendritischen Zellen führt. Nur dann würden diese in die nahegelegenen Lymphknoten migrieren und dort eine T-Zell-Antwort stimulieren können, die den Tumor beseitigen könnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb anhand des dreidimensionalen Gliomsphäroid-Modells untersucht werden, ob eine ALA/PDT-Behandlung diese afferente Phase einer anti-tumoralen Immunantwort, d.h. die Attraktion von DC, Antigenaufnahme durch DC und Ausreifung der unreifen DC, stimulieren kann.

Gegebenenfalls sollte dann in einem weiteren Schritt die Identifikation, der für diese Effekte verantwortlichen Moleküle erfolgen. Darüber hinaus sollte auch geprüft werden, ob die ALA/PDT die Migration und Invasivität der Gliomzellen beeinflusst, um weitere Wirkmechanismen zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien und Einwegartikel

| Material | Hersteller | Firmensitz |
|--|-----------------|-------------------|
| 6-Well-Platten | Greiner BioOne | Frickenhausen |
| 24-Well-Platten | Greiner BioOne | Frickenhausen |
| 96-Well-Platten | Greiner BioOne | Frickenhausen |
| Cryoröhrchen, 2ml | Greiner BioOne | Frickenhausen |
| LD MACS-Säulen | Miltenyi Biotec | Bergisch Gladbach |
| LS MACS-Säulen | Miltenyi Biotec | Bergisch Gladbach |
| Petrischalen 94/16 mm | Greiner BioOne | Frickenhausen |
| Pipettenspitzen | StarLab | Ahrensburg |
| Reaktionsgefäße, 1,5ml | Sarstedt | Nümbrecht |
| Röhrchen (15ml, 50ml) | Greiner BioOne | Frickenhausen |
| Rundbodenröhrchen, 5ml | BD Biosciences | Heidelberg |
| Stripetten (5ml, 10ml, 25ml) | Corning/Costar | Wiesbaden |
| Transwell Inserts | Corning/Costar | Wiesbaden |
| Zellkulturflaschen mit Filtertop (T25 und T75) | Greiner BioOne | Frickenhausen |

2.2 Reagenzien und Kits

| Reagenz | Hersteller | Firmensitz |
|--|-------------------------------|--------------------------------|
| Agarose (peQ Gold Universal Agarose) | peQLab | Erlangen |
| ALA; 5-Aminolävulinsäure | Merck | Darmstadt |
| Ammoniumchlorid-Lösung (8,3g NH ₄ Cl + 1,0g KHCO ₃ + 0,0375g EDTA-Na ₂ ad. H ₂ O dest. 1l) | Apotheke des UKD | Düsseldorf |
| Annexin V-FITC Kit | Beckman Coulter | Krefeld |
| Aqua dest. | DeltaSelect | Dreieich |
| Biocoll (Ficoll-Lösung) | Biochrom | Berlin |
| BrdU Zellproliferationskit (ELISA) | Roche | Mannheim |
| CCL-3 | R&D Systems | Wiesbaden |
| CellGroDC-Medium | CellGenix | Freiburg |
| Cell Proliferation Kit I (MTT-Kit) | Roche | Mannheim |
| CFDA-SE; Vybrant CFDA-SE Cell Tracer Kit | Molecular Probes / Invitrogen | Karlsruhe |
| Cytofix/Cytoperm plus Fixa- tion/Permeabilization Kit | BD Biosciences | Heidelberg |
| DAPI Eindeckelmedium (Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI) | Invitrogen | Darmstadt |
| 2,7-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat | Calbiochem | Schwalbach |
| DMEM-Medium, mit Phenolrot | Invitrogen | Darmstadt |
| DMEM-Medium, ohne Phenolrot | Invitrogen | Darmstadt |
| DMSO; Dimethylsulfoxid | Sigma-Aldrich | Seelze |
| DNase free RNA-Set | Qiagen | Hilden |
| DNA-Leiter | Invitrogen | Darmstadt |
| Ethanol, 70% | Apotheke des UKD | Düsseldorf |
| Ethidiumbromid (10mg/ml) | BioRad | Herkules, Cali- fornia, USA |
| Färbelösung (Fields A & B) | Alfa Aesar | Karlsruhe |

| | | |
|--|-------------------------------|----------------------|
| FCS; fötales Kälberserum | PAA Laboratories | Cölbe |
| Fibronectin, 0,1% | Sigma-Aldrich | Steinheim |
| FITC-BSA | Molecular Probes / Invitrogen | Karlsruhe |
| GM-CSF | CellGenix | Freiburg |
| Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) | Invitrogen | Darmstadt |
| HSA; 20% humanes Serumalbumin | Octapharma | Langenfeld |
| IL-4; Interleukin-4 | CellGenix | Freiburg |
| Methanol | Merck | Darmstadt |
| Noble Agar | Sigma-Aldrich | Seelze |
| Normal Goat Serum | Dako | Hamburg |
| Paraformaldehyd (PFA); 4% | USB | Staufen |
| PBS; Phosphate Buffered Saline | Invitrogen | Darmstadt |
| Penicillin-Streptomycin | Invitrogen | Darmstadt |
| Phalloidin (FITC-konjugiert) | Molecular Probes / Invitrogen | Karlsruhe |
| RPMI-1640 | Lonza | Verviers, Belgien |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen | Hilden |
| Sodumpyruvat | Biochrom | Berlin |
| TNF-α; Tumornekrosefaktor-α | CellGenix | Freiburg |
| Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit | Roche | Mannheim |
| Trypanblau-Lösung, 4% | Sigma-Aldrich | Seelze |
| Trypsin-EDTA, 1x | PAA Laboratories | Cölbe |
| Tween 20 | Serva Electrophoresis GmbH | Heidelberg |
| X-Vivo 15 | Lonza | Verviers, Belgien |

2.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie und Zell-Isolierung

| mAb (Spezifität) | Fluorochrom | Klon | Isotyp | Hersteller |
|-------------------|--------------|----------|-------------|-----------------|
| CD1a | FITC | HI149 | IgG1 Maus | BD Biosciences |
| CD3 | FITC/PE | UCHT 1 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| CD3 | unkonjugiert | UCHT 1 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| CD4 | FITC/PE | 13B8.2 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| CD11b | unkonjugiert | BEAR1 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| CD14 | FITC/PE | RM052 | IgG2a Maus | Beckman Coulter |
| CD14 | unkonjugiert | RM052 | IgG2a Maus | Beckman Coulter |
| CD14-beads | Microbeads | | IgG2a Maus | Miltenyi Biotec |
| CD16 | unkonjugiert | 3G8 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| CD19 | unkonjugiert | J4.119 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| CD29 | FITC | K20 | IgG2a Maus | Beckman Coulter |
| CD36 | FITC | FA6.152 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| CD40 | FITC | 5C3 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| CD44 | FITC | J-173 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| CD45 | PE-Cy5 | J33 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| CD49b | FITC | AK-7 | IgG1 Maus | BD Biosciences |
| CD49d | PE | L25 | IgG2b Maus | BD Bioscience |
| CD49f | PE | GOH3 | IgG2a Ratte | BD Biosciences |
| CD56 | unkonjugiert | C218 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| CD80 | FITC | MAB104 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| CD83 | FITC/PE | HB15a | IgG2b Maus | Beckman Coulter |
| CD86 | FITC | FUN-1 | IgG1 Maus | BD Biosciences |
| CD91 | PE | A2MR-a2 | IgG1 Maus | BD Biosciences |
| CD206 | PE | 329B1.10 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |

| | | | | |
|-------------------------|--------------|-------------|------------|-----------------|
| CD207 (Langerin) | PE | DCGM4 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| CD208 (DC-Lamp) | PE | 104.G4 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| E-Cadherin | unkonjugiert | 2Q663 | IgG1 Maus | Santa Cruz |
| HLA-DR | FITC | Immu-357 | IgG1 Maus | Beckman Coulter |
| HLA-DR | PE | G46-6(L243) | IgG2a Maus | BD Biosciences |
| HLA-DR | unkonjugiert | B8.12.2 | IgG2b Maus | BD Biosciences |
| HSP70 | PE | K-20 | IgG Ziege | Santa Cruz |

Quellen: BD Biosciences (Heidelberg), Beckman Coulter (Krefeld), Miltenyi Biotec (Bergische Gladbach), Santa Cruz (Heidelberg)

2.4 Geräte

| Gerät | Hersteller | Firmensitz |
|--|---------------------|---------------------------|
| Autoklav | Systec | Wettenberg |
| Aviso CellCelector™ | Aviso | Greiz |
| Bestrahlungsgerät Xstrahl RS225 | Gulmay Medical | Camberley, Großbritannien |
| Cell-Dyn-3500-Blutzell-Analysegerät | Abbott | Wiesbaden |
| CO₂ Inkubator | Binder | Tuttlingen |
| Cytozentrifuge | Eppendorf | Hamburg |
| ELISA-Reader, Model 680 | Bio Rad | München |
| Eppendorf-Pipetten | Eppendorf | Hamburg |
| FACS Canto | BD Biosciences | Heidelberg |
| Finn-Pipetten | Thermo Scientific | Bonn |
| Laser, Ceralas 633 | Biolitec | Bonn |
| Luminex Analysegerät | Luminex Corporation | Oosterhout, Niederlande |
| Mikroskop, Axiovert 25 | Zeiss | Jena |

| | | |
|--|--------------------------|-------------------|
| Mikroskop, CK2 | Olympus | Hamburg |
| Multipette | Eppendorf | Hamburg |
| Neubauer-Zählkammer | Brand | Wertheim |
| NanoDrop® ND-1000 | Thermo Fisher Scientific | Waltham, USA |
| PCR-Gerät GeneAmp PCR System 9700 | Applied Biosystems | Darmstadt |
| Photodokumentationssystem | Herolab | Wiesloch |
| Pipetboy, Accujet | Brand | Wertheim |
| Sterilbank, Lamin Air 1.8 | Holten | Allerød, Dänemark |
| Vario MACS | Miltenyi Biotec | Bergisch Gladbach |
| Wasserbad | Memmert | Schwabach |
| Wasserbad | Köttermann | Uetze/Hänigsen |
| Zentrifuge, 5810R | Eppendorf | Hamburg |

2.5 Software

| Software | Hersteller | Firmensitz |
|----------------------|------------------------------|-------------------------|
| FACS DIVA 6.0 | BD Biosciences | Heidelberg |
| Prism 5.0 | Graph Pad | San Diego CA, USA |
| WinMDI 2.8 | Scripps Research Institute | La Jolla, CA, USA |
| MS Office | Microsoft | Unterschleisheim |
| EndNote X3 | ISI Research Soft | Berkeley, CA, USA |
| Image J | National Institute of Health | Bethesda, Maryland, USA |
| Axio Vision | Zeiss | Jena |

2.6 Kultivierung der Glioblastomzelllinien

Als Grundlage für die experimentellen Teile dieser Arbeit dienten die Glioblastomzelllinien U87, U251, U373 und A172. Diese Glioblastomzelllinien wurden bei einer konstanten Temperatur von 37°C und einer stetigen CO₂-Begasung (5% (v/v) CO₂) kultiviert. Damit das Wachstum der Zellen und deren Vitalitätserhaltung gesichert waren, erfolgte in regelmäßigen Abständen ein Wechsel des Mediums, weil bestimmte Bestandteile des Mediums zum Teil von den Zellen metabolisiert werden. Da sich die unterschiedlichen Zelllinien in ihrer Proliferationsrate und der damit verbundenen Konfluenz zum Teil deutlich voneinander unterscheiden, wurden die Zellen täglich mikroskopisch kontrolliert und bei Bedarf passagiert bzw. ein Wechsel des Mediums durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T75-Zellkulturflaschen.

Das Medium, das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde, setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Medium für adhärente Zellen:

DMEM
10 % FCS (hitzeinaktiviert)
1% Natriumpyruvat
100U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

Medium für Gliomsphäroide:

DMEM (farblos)
10 % FCS (hitzeinaktiviert)
1% Natriumpyruvat
100U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

2.6.1 Passagieren der Zellen

Um optimale Wachstumsbedingungen der adhären wachsenden Glioblastomzellen zu gewährleisten, wurden diese bei einer Konfluenz von 70-80 % passagiert. Dazu musste das gesamte Medium vorsichtig aus der T75-Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen im Anschluss mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS) gewaschen werden. Nach Absaugen des PBS wurden 3 ml Trypsin/EDTA in die Flasche pipettiert und die Zellen für 3 Minuten im Brutschrank inkubiert, wodurch ein Ablösen der Zellen von der Oberfläche erfolgte. Nachfolgend konnten die Zellen durch leichtes Schlagen gegen die T75-Zellkulturflasche endgültig vom Flaschenboden abgelöst werden, was mit Hilfe eines Mikroskops überprüft wurde. Danach erfolgte unverzüglich die Zugabe von 7 ml frischen Mediums, das aufgrund seines FCS-Gehaltes die enzymatische Reaktion des Trypsins abstoppen kann. Nach Resuspendieren der Zellen konnten diese nun mit Medium versetzt und mit gewünschtem Zelltitert (5×10^4) auf eine neue T75-Kulturflasche gegeben werden.

2.6.2 Kryokonservierung der kultivierten Zellen

Um einen dauerhaften Pool der verwendeten Zelllinien zu erhalten, mussten in regelmäßigen Abständen Zellen eingefroren werden.

Dazu wurden die jeweiligen Zellen in T75-Zellkulturflaschen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Nach Zugabe serumhaltigen Mediums, Resuspendieren der Zellen und Transfer in ein 50 ml Röhrchen erfolgte eine Zentrifugation der Zellen für 7 Minuten bei 550 g, 4 °C. Die Glioblastomzellen wurden mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren. Dazu musste das Zellpellet in 500 µl Einfriermedium, bestehend aus 8% HSA/RPMI-1640, resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt werden. Nach Zugabe von 500 µl 22% DMSO/RPMI-1640 wurden die Zellen unmittelbar bei -80 °C eingefroren. Für längerfristige Lagerung wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Um die Zellen wieder aufzutauen, wurden zunächst 2 ml 8 % HSA/RPMI-1640 (Auftaumedium) in einem 15 ml Röhrchen vorgelegt. Nach Antauen der Zellen im Kryoröhrchen wurden diese in 1 ml Auftaumedium aufgenommen, anschließend in das vorbereitete Röhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und 7 Minuten bei 550 g, 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment konnte nun in einem bestimmten Volumen aufgenommen und für die Versuche eingesetzt werden.

2.6.3 Zellzahlbestimmung

Vor dem Bestimmen der Lebendzellzahl in einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen gut resuspendiert, um eine gleichmäßige Durchmischung zu gewährleisten. 10 µl der Zellsuspension versetzte man mit 10 µl einer Trypanblau-Lösung. Bei Trypanblau handelt es sich um einen Farbstoff, der die Membran vitaler Zellen nicht durchdringen kann. Tote Zellen mit poröser Membran hingegen sind für den Farbstoff permeabel und färben sich blau. Eine Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen in der Suspension wird so mikroskopisch ermöglicht. 10 µl des Zellsuspension-Farbstoff-Gemisches füllte man nun in die Neubauer-Kammer und je zwei diagonal gegenüber liegende Großquadrate der Kammer wurden ausgezählt. Durch das Addieren beider Großquadrate berücksichtigt man bereits den Verdünnungsfaktor von 1:2. Der erhaltene Wert gibt die Zellzahl $\times 10^4$ pro ml an.

Nach Multiplikation mit dem Gesamtvolumen erhält man die Gesamtzellzahl (vgl. Abbildung 2.1). Durch das Cell-Dyn-3500 Blutzell-Analysegeräts kann unter Verwendung ebenfalls die Zellzahl ermittelt werden. Hierfür sind 500 μl der Zellsuspension erforderlich.

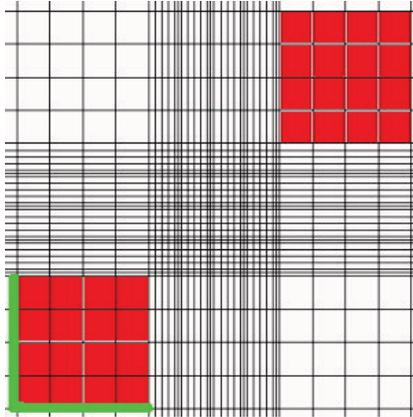


Abbildung 2.1: Darstellung einer Neubauer Zählkammer. Zwei auszählende Großquadrate wurden rot unterlegt. Die Außenlinien, auf denen die Zellen nicht mitgezählt wurden, wurden beispielhaft an einem Großquadrat grün markiert.

2.7 Herstellung von agarbeschichteten Zellkulturflaschen

Zur Generierung von dreidimensional wachsenden, multizellulären Mikrotumormodellen (Tumorsphäroide) benötigte man mit Agar beschichtete Zellkulturflaschen, die eine Adhärenz der Glioblastomzellen verhindern und so eine Ausbildung von Tumorsphäroiden ermöglichen. 1 g Noble Agar wurde in eine 100 ml Schott-Flasche überführt und in 20 ml Aqua dest. gelöst. Nach Autoklavieren dieses Gemisches erfolgte die Zugabe von 80 ml, auf 56 °C vorgewärmten, farblosen DMEM-Mediums. Je 10 ml der Agar-Medium-Lösung wurden nun zügig, jedoch unter Vermeidung von Blasenbildung, in T75-Zellkulturflaschen überführt und nach Aushärtung des Agars bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. 96-Well-Zellkulturplatten wurden in analoger Weise unter Verwendung von 100 μl /Well Agar-Medium-Lösung mit Agar beschichtet.

2.8 Generierung von Tumorsphäroiden

Mit Hilfe des nachfolgenden Verfahrens konnten Tumorsphäroide generiert und weiter kultiviert werden.

2×10^6 Zellen der sonst adhären wachsenden Tumorzelllinien wurden in 20 ml farblosem DMEM-Medium aufgenommen und vorsichtig in eine agarbeschichtete T75-Zellkulturflasche überführt. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der unterschiedlichen Zelllinien hatten die Sphäroide

nach 3-5 tägiger Inkubation (37° C; 5 % CO₂) die von uns gewünschte Größe von ungefähr 200 - 250 µm erreicht und konnten in die jeweiligen Versuche eingesetzt werden.

2.9 5-Aminolävulinsäure-basierende Photodynamische Therapie (PDT) von Tumorsphäroiden

Für die PDT-Behandlung von Tumorsphäroiden wurden zunächst 500 mg ALA in 10 ml sterilem Aqua dest. gelöst. Diese Stammlösung sollte erst kurz vor Versuchsbeginn angesetzt und mit farblosem DMEM-Medium (ohne Zusätze) auf eine Konzentration von 25 µg/ml gebracht werden. Anschließend wurde die Sphäroid-Kultur im Verhältnis 1:2 mit ALA-haltigem DMEM-Medium bzw. nur DMEM-Medium für die Negativkontrollen versetzt und in den Inkubator verbracht. Nach einer vierstündigen Inkubation wurden die Tumorsphäroide in eine Petrischale überführt und dort unter Sichtkontrolle mit Hilfe einer Größenskala im Okular des Mikroskops (Durchmesser: ca. 200 µm) gepickt. Diese Sphäroide wurden nun in eine agarbeschichtete 96-Well-Platte pipettiert (je 25 Sphäroide/Well in 100 µl farblosem DMEM-Medium).

Neben den ALA/PDT-behandelten Sphäroiden (ALA-behandelte Sphäroide, die zusätzlich bestrahlt wurden) und den unbehandelten Negativkontrollen (weder ALA, noch Bestrahlung), gab es zusätzlich die Sphäroidgruppen „ALA“ (nur ALA-Behandlung) und „Bestrahlung“ (nur bestrahlte Sphäroide).

Die Bestrahlung der Tumorsphäroide erfolgte mit Hilfe eines Diodenlasers bei einer Wellenlänge von 635 nm, für 625 Sekunden bei einer Leistung von 1 Watt (siehe Abbildung 2.2). Anschließend konnten die unterschiedlichen Sphäroidgruppen in die jeweiligen Versuche eingesetzt werden.



Abbildung 2.2: Aufbau des Lasergerätes zur Bestrahlung der Gliomsphäroide.

2.10 Tumorsphäroid-Migrationsassay

Um das Migrationsverhalten der Glioblastom-Sphäroide zu analysieren, wurde ein sogenannter Migrationstest durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst je 100 µl farblosen DMEM-Mediums in 8 Wells einer 96-Well-Kulturplatte vorgelegt. Tumorsphäroide wurden ALA/PDT-behandelt und anschließend in die 96-Well-Platte überführt (je 1 Sphäroid pro Well, 4 Wells). Unbehandelte Sphäroide dienten als Negativkontrollgruppe. Die Sphäroide wurden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch eine Migration von Tumorzellen aus dem Sphäroid kommt es zu einer Zunahme des Durchmessers, welche täglich am Aviso CellCelector™ vermessen wurde. Bei Bedarf erfolgte im Kulturverlauf die Zugabe von 100 µl frischem Medium.

2.11 Migrationsassay für unreife Dendritische Zellen

Mit Hilfe eines TransWell-Assays lässt sich das gerichtete Migrationsverhalten von unreifen Dendritischen Zellen detektieren.

Hierzu musste man zunächst TransWell-Inserts der geeigneten Porengröße (8 µm) mit einer Fibronectin-Schicht vorbehandeln. Dazu wurden je 100 µl einer Fibronectin-PBS-Lösung im Verhältnis 1:200 vorsichtig auf die Unterseite der Inserts pipettiert. In der 1-stündigen Inkubationszeit erfolgte die Einstellung der Dendritischen Zellen auf die gewünschte Zellkonzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml in CellGroDC-Medium. Je 500 µl CellGroDC-Medium wurden in eine 24-Well-Platte vorgelegt und das jeweilige Target hinzu pipettiert. Dieses waren zum einen die unterschiedlich behandelten Tumorsphäroide, zum anderen das Chemokin CCL3 (40 ng/ml) als Positivkontrolle für Dendritische Zellen. Reines Medium diente als Negativkontrolle.

Die TransWell-Inserts konnten nun in die Wells der Platte eingehangen und mit 200 µl der Zellsuspension befüllt werden. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die restliche Zellsuspension vorsichtig abgenommen. Die migrierten Zellen wanderten im Verlauf der Inkubation durch die Poren des Inserts in Richtung des darunterliegenden Wells und befanden sich nun in der Fibronectin-Schicht. Die Inserts wurden in je 500 µl Methanol fixiert. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Zellkerne und des Zytoplasmas mit Hilfe der Färbelösungen Fields A und B, die uns freundlicherweise von Dr. Erich Bünemann aus der Hautklinik zur Verfügung gestellt wurden.

Die migrierten Dendritischen Zellen wurden fotografiert und mit Hilfe des Programms Image J ausgewertet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

2.12 Phalloidin-Färbung des Aktin-Zytoskelettes

Phalloidin ist eines der Phallotoxine des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides* und bindet spezifisch an F-Aktin. Durch Benutzung eines Fluoreszenz-gekoppelten Phalloidin-Farbstoffes wird die Betrachtung des Aktin-Zytoskelettes der Zelle an einem Fluoreszenz-Mikroskop ermöglicht.

Um Phalloidin-Färbungen des Aktin-Zytoskelettes zu erhalten, mussten zunächst Tumorsphäroide auf FCS-beschichtete Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgesät werden. Nach 30-40%iger Konfluenz wurden die Deckgläschen für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Drei

Waschschritte mit 0,1 % Tween 20 in PBS (PBST) für 10 Minuten und ein Blocking-Schritt mit 5 % Normal Goat Serum in PBST für 1h bei Raumtemperatur schlossen sich an. Anschließend erfolgte die 2-stündige Inkubation unter Lichtausschluß mit einem FITC-konjugierten Phalloidin (Verdünnung 1:40 in 2 % Normal Goat Serum / PBST) bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschritten mit PBST konnten die Deckgläschen auf Objektträger überführt und mit DAPI-Medium eingedeckelt werden. Nun waren sie bereit für fluoreszenzmikroskopische Analysen.

2.13 Isolierung mononukleärer Zellen

Die Isolierung mononukleärer Zellen (MNC) aus der leukozytenreichen Fraktion (Buffy Coat) eines antikoagulierten Vollbluts erfolgte mittels eines Ficoll-Dichtegradienten. Hierzu wurden zunächst 15 ml Ficoll-Lösung mit einer spezifischen Dichte von $1,077 \text{ g/cm}^3$ in einem 50 ml Röhrchen vorgelegt und mit 35 ml vorverdünnten Blutes (1:2 mit PBS) überschichtet und zentrifugiert (20 Minuten, 850 g, 20°C , ohne Bremse). Aufgrund des Dichtegradienten zeigten sich nach der Zentrifugation von unten nach oben betrachtet folgende Schichten: Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen, Ficoll-Lösung, Interphase mit MNC und Plasmaschicht (vgl. Abbildung 2.3).

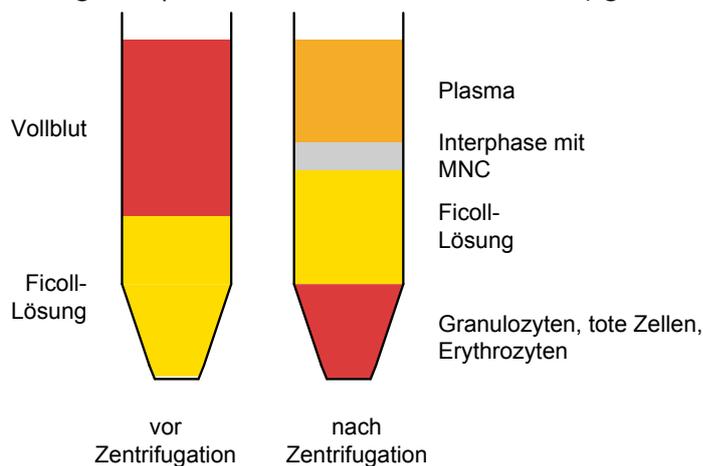


Abbildung 2.3: Verteilung der verschiedenen Phasen vor und nach der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.

Die mononukleären Zellen in der Interphase wurden abgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und sedimentiert (10 Minuten, 750 g, 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Ammoniumchlorid-Lyse mit 25 ml Ammoniumchlorid-Lösung (NH_4Cl), um eventuell noch vorhandene Erythrozyten zu lysieren. Nach 10 minütiger Inkubation bei 4°C erfolgten zwei Waschschritte mit PBS (7 Minuten, 550 g, 4°C). Anschließend fanden die MNC direkt in der immunmagnetischen Monozyten- oder T-Zell-Isolierung Verwendung oder konnten für spätere Nutzung mit einer Dichte von 5×10^7 Zellen/ml pro Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren werden.

2.13.1 Immunmagnetische Isolierung der CD14+ Monozyten aus mononukleären Zellen (MNC)

Charakteristisch für Monozyten ist die Expression des CD14-Antigens auf ihrer Oberfläche. Diese Eigenschaft macht man sich für die Isolierung dieser Zellfraktion aus mononukleären Zellen zu Nutze, indem man die Zellen entsprechend des Protokolls von Sorg et al. immunmagnetisch anreichert und auf diese Weise selektiert [144].

Dazu wurden zuvor frisch isolierte oder aufgetaute MNC mit kaltem 0,5 % HSA/PBS auf einen Zelltiter von $2,5 \times 10^8$ Zellen/ml eingestellt und mit $1,5 \mu\text{l}$ anti-CD14 Antikörper-Bead-Konjugat pro 10^6 Monozyten für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Vorbereitung der LS-MACS-Säule, indem sie in den VarioMACS eingebracht und zweimal mit 5ml kaltem 0,5 % HSA/PBS gespült wurde. Die Fassungskapazität jeder Säule betrug 1×10^8 Zielzellen. Anschließend wurden die markierten Zellen auf die Säule aufgetragen und verbliebene nicht markierte Zellen durch zweimalige Zugabe von 5 ml 0,5 % HSA/PBS aus der Säule gespült. Die so gewonnene Negativfraktion diente zur T-Zell-Isolation und konnte direkt aufgearbeitet oder bei -80°C eingefroren werden.

Zur Gewinnung der CD14+ Fraktion wurde die Säule aus dem Magnetfeld des Vario MACS genommen und die Zellen nach Zugabe von 5 ml 0,5% HSA/PBS eluiert. Die Reinheitsbestimmung der eluierten Fraktion erfolgte mittels und durchflusszytometrischer Analyse der Oberflächenantigene CD45 (Leukozyten) und CD14 (Monozyten). Mit Hilfe des Cell-Dyn-3500-Analysegeräts konnte die Zellzahl bestimmt werden, die Vitalität der Zellen wurde mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Bis zu den jeweiligen Versuchen konnten die Monozyten mit einer Zelldichte von 10^7 Zellen pro Kryoröhrchen bei -80°C gelagert werden.

2.13.2 Isolierung von T-Zellen aus mononukleären Zellen

Auch diesem Isolierverfahren liegt eine immunmagnetische Selektion zu Grunde. Die Gewinnung von T-Zellen erfolgte durch die Depletion aller Zellen, die die Antigene CD11b, CD14, CD16, CD19, CD56 und HLA-DR exprimieren. Dieses sind alle übrigen im Blut enthaltene Zellen, die keine T-Zellen sind. Das Protokoll von Sorg et al. diente als Grundlage [144].

Mononukleäre Zellen oder die Negativfraktion nach Monozyten-Gewinnung wurden mit kaltem 0,5 % HSA/PBS auf einen Zelltiter von 10^8 Zellen/ml gebracht und mit je $2 \mu\text{l}$ der jeweiligen Linantigenspezifischen, unkonjugierten Antikörper (siehe oben) pro 10^6 Zellen markiert (30 Minuten bei 4°C). Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen mit 0,5% HSA/PBS (7 Minuten, 550 g, 4°C) entfernt. Das Sediment wurde mit 0,5% HSA/PBS erneut auf einen Titer von 10^8 Zellen/ml eingestellt und pro 10^6 Zellen mit je $1 \mu\text{l}$ Ziege-anti-Maus gekoppelten magnetischen Mikrobeads für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. In dieser Zeit wurde die LD-MACS-Säule vorbereitet, indem sie in den VarioMACS eingebracht und dreimal mit 3 ml kaltem 0,5 % HSA/PBS gespült wurde. Im Anschluss wurden die Zellen auf die Säule pipettiert und die Negativfraktion mit insgesamt 10 ml eluiert. Die gewünschte T-Zell-Fraktion befand sich innerhalb dieses Eluats.

Die Reinheitsbestimmung der eluierten Fraktion erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse der Oberflächenantigene CD45 (Leukozyten) und CD3 (T-Zellen). Mit Hilfe des Cell-Dyn-3500-Analysegeräts konnte die Zellzahl bestimmt werden, die Vitalität der Zellen wurde mittels

Trypanblau-Färbung bestimmt. Die isolierten T-Zellen sollten nach Möglichkeit direkt für die jeweiligen Versuche verwendet werden, da eine Lagerung bei -80°C ohne erhebliche Vitalitätsverluste nur für einen Zeitraum von ca. 14 Tagen möglich war.

2.14 *In vitro* Kultivierung und Ausreifung Dendritischer Zellen

Mit Hilfe eines Zwei-Phasen-Kulturverfahrens nach modifiziertem Protokoll von Zhou et al. und Rapp et al. erfolgte die Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen aus Monozyten. In einem ersten Schritt generierte man innerhalb von sechs Tagen unreife Dendritische Zellen. Nach Zugabe eines Reifungsstimulus erhielt man nach weiteren drei Tagen ausgereifte Dendritische Zellen.

Zuvor isolierte oder kryokonservierte Monozyten wurden mit einer Zelldichte von 10^6 Zellen/ml in CellGroDC-Medium, in Gegenwart von 1000 U/ml GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) und 1000 U/ml IL-4 (*Interleukin-4*), in einer 24-Well-Gewebekulturplatte ausplattiert, wobei das Volumen pro Well 2 ml betrug. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für neun Tage bei 37°C und 5 % CO_2 .

An Tag 3 und 6 wurde ein Wechsel des Mediums durchgeführt, wobei je 1 ml Medium/Well abgenommen und durch 1 ml frisches Medium ersetzt wurde. Dieses Medium enthielt 2000 U/ml GM-CSF und 2000 U/ml IL-4. Zusätzlich zu diesen Zytokinen erfolgte an Tag 6 die Zugabe eines Ausreifungsstimulus in Form von 1000 U/ml TNF- α (*Tumornekrosefaktor- α*). Am neunten Tag wurden die Zellen aus den Wells geerntet, durchflusszytometrisch analysiert und in die gewünschten Versuche eingebracht.

2.14.1 Co-Kultivierung von Tumorsphäroiden mit Dendritischen Zellen

Um den Einfluss von Tumorsphäroiden auf die Differenzierung bzw. die Ausreifung von Dendritischen Zellen zu untersuchen, wurden Monozyten bzw. unreife Dendritische Zellen (Tag 6) mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro ml in Gegenwart der Zytokine GM-CSF und IL-4 in 2 ml Volumen auf eine 24-Well-Gewebekulturplatte in CellGroDC-Medium ausplattiert. Pro Well wurde je eine Sphäroid-Gruppe (ALA/PDT; ALA; Bestrahlung; unbehandelt; je 25 Sphäroide pro Ansatz) hinzu pipettiert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle drei Tage, wobei je 1 ml des alten Mediums vorsichtig abgenommen und durch 1 ml frischen Mediums, versetzt mit der Zytokinmenge für das Gesamtvolumen des Wells, ersetzt wurde. TNF- α stimulierte Dendritische Zellen wurden als Positivkontrolle innerhalb der Ausreifungsversuche mitgeführt. Nach sechs (Differenzierung) bzw. drei Tagen (Ausreifung) bei 37°C , 5 % CO_2 erfolgte die Ernte der Dendritischen Zellen und ihre Analyse.

2.14.2 HSP70 Blockierung

Einem anderen Versuchsansatz lag die Frage zugrunde, ob eine Blockierung des HSP70 Moleküls auf den Tumorsphäroiden einen Einfluss auf die Differenzierung sowie die Antigenaufnahmeaktivität Dendritischer Zellen in Co-Kultur mit Sphäroiden hat. Die eigentlichen Versuchsansätze verliefen wie

bereits beschrieben (Abschnitt 2.2.15) bzw. wie in Abschnitt 2.3.5 noch erfolgt. Abweichend hiervon war die vorherige „Blockierung“ von HSP70 Bindestelle durch einen HSP70-spezifischen Antikörper.

Hierfür wurden Tumorsphäroide generiert und den jeweiligen Ansätzen entsprechend behandelt (ALA/PDT-Behandlung sowie unbehandelte Kontrollsphäroide; 25 Sphäroide pro Ansatz). Anschließend wurden die Sphäroide in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl Kulturmedium überführt. Dort erfolgte die „Blockierung“ durch Zugabe von 5 µl eines HSP70-spezifischen polyklonalen Antikörpers. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ wurde ungebundener Antikörper durch einen Waschschrift entfernt. Die Tumorsphäroide konnten nun den eigentlichen Co-Kulturen zugeführt werden. In Kontrollexperimenten wurde anstelle des HSP70-spezifischen Antikörpers ein irrelevanter polyklonaler Ziege-anti-human Antikörper (IgG) eingesetzt.

2.15 Durchflusszytometrie

2.15.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch als Flowzytometrie bezeichnet, ermöglicht die quantitative Analyse von Zellpopulationen anhand ihrer Größe, Granularität und der Expression ihrer Oberflächenmoleküle. Eine Antigen-Antikörperbindung liegt dem Prinzip dieser Methode zugrunde, wobei fluoreszenzgekoppelte Antikörper an ihre spezifischen Antigene auf der Zelloberfläche binden.

Innerhalb des Durchflusszytometers wird die Zellsuspension durch eine dünne Kapillare vereinzelt und die an die Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe mittels eines Lasers angeregt, so dass eine Analyse der einzelnen Zellen ermöglicht wird. Die Fluoreszenz der angeregten Farbstoffe wird, genau wie das Streulicht, welches von der Größe (Vorwärtsstreulicht – Forward Scatter; FSC) und Granularität (Seitwärtsstreulicht – Side Scatter; SSC) der Zellen abhängt, von Detektoren aufgefangen. Das so zusammengesetzte, resultierende Signal kann nun anhand der Intensität und des Farbspektrums ausgewertet und mit Hilfe eines Analyseprogrammes in einem Koordinatensystem dargestellt werden (vgl. Abbildung 2.4). Die Tabelle 5 zeigt die Wellenlänge der genutzten Fluorochrome und Detektoren.

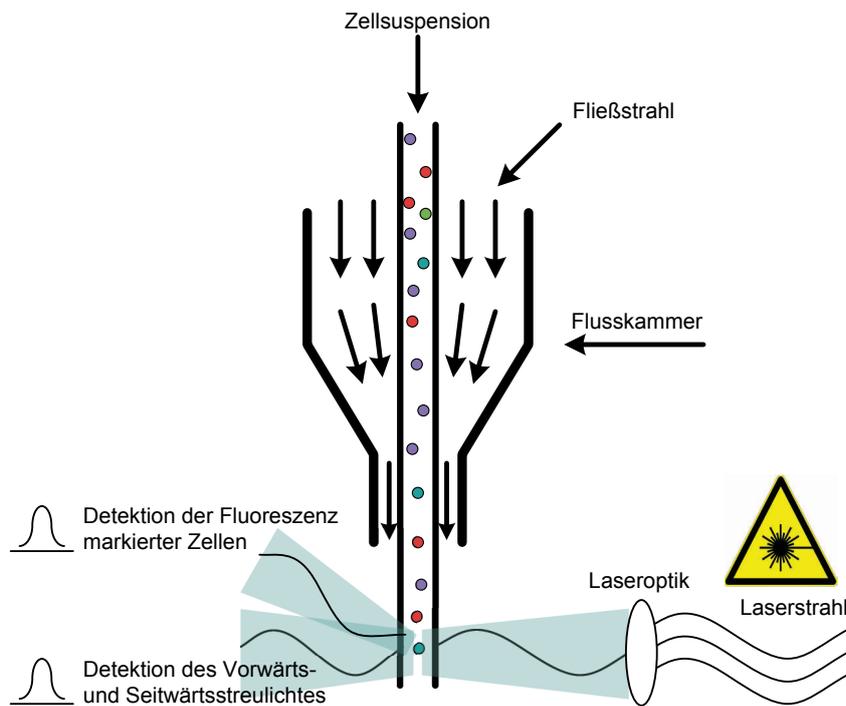


Abbildung 2.4: Prinzip der Durchflusszytometrie.

Tabelle 5: Wellenlänge der genutzten Fluorochrome und Detektoren.

| Fluorchrom, Detektor | Wellenlänge |
|--------------------------------------|-------------|
| Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht) | 488/10 nm |
| Side Satter (Seitwärtsstreulicht) | 488/10 nm |
| Fluoresceinisothiocyanat (FITC) | 530/30 nm |
| Phycoerythrin (PE) | 535/42 nm |
| Phycoerythrin-Carbocyanin-5 (PE-Cy5) | 670 nm |

2.15.2 Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenmolekülen und Durchflusszytometrische Analyse

Die zu analysierenden Zellen (mindestens 1×10^5 Zellen) wurden mit einem Zelltiter von in einem Volumen von 100 μl PBS aufgenommen und in ein 5 ml Polypropylen-Rundbodenröhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 5 μl eines spezifischen Fluoreszenz-konjugierten Antikörpers und eine 15-minütige Inkubation bei 4°C unter Ausschluss von Licht. Färbungen mit Isotyp-

Kontrollantikörpern wurden als Negativkontrollen mitgeführt. Nicht gebundener Antikörper konnte mittels eines Waschschrilles mit PBS (7 Minuten, 550 g, 4°C) entfernt werden. Die markierten Zellen konnten nun entweder in 100 µl PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer FACS-Canto gemessen werden oder durch Zugabe von 100 µl Paraformaldehyd (4 % PFA) für eine spätere Analyse fixiert werden.

Um intrazytoplasmatische Bestandteile einer Zelle nachzuweisen, mussten die Zellen mit Hilfe des Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kits intrazellulär markiert werden. Hierzu wurden pro Färbung mindestens 1×10^5 Zellen in einem 5 ml Polypropylen-Rundbodenröhrchen pelletiert und in 250 µl Cytofix-Lösung aufgenommen. In der 20-minütigen Inkubationszeit bei 4°C wurden die Zellen fixiert die Zellmembran permeabilisiert. Durch zweimaliges Waschen mit je 1 ml Perm/Wash Puffers (7 Minuten, 550 g, 4°C) konnten die gebildeten Poren aufgrund des im Puffer enthaltenen Saponins bestehen bleiben. Anschließend erfolgte die eigentliche Markierung mit 5 µl des spezifischen Antikörpers (15 Minuten Inkubation bei 4 °C). Nach einem Waschschrilt mit 1 ml Perm/Wash Puffer (7 Minuten, 550g, 4°C) konnten die Zellen durchflusszytometrisch analysiert oder fixiert werden. Auch hier dienten Isotyp-Färbungen als Kontrolle.

2.16 Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse

Für verschiedene Fragestellungen waren Fluoreszenzmikroskopische Analysen unumgänglich. Zum einen fanden diese bei der Analyse der jeweiligen Lokalisation der gefärbten Moleküle Verwendung, zum anderen kam sie bei Untersuchungen des Zytoskeletts zum Einsatz.

Die Aufbringung der Zellen konnte unterschiedlich erfolgen. Entweder konnten die Zellen direkt auf einem Deckgläschen anwachsen und wurden dort gefärbt (vgl. Abschnitt 2.14) oder die Zellen wurden erst mit dem jeweiligen Fluoreszenz-konjugierten Antikörper markiert und anschließend auf einen Objektträger aufgebracht. Letzteres Verfahren erfolgte mit Hilfe einer Cytospinzentrifugation, wobei Poly-L-Lysinbeschichtete Objektträger in die Vorrichtung einer Cytospinzentrifuge eingebracht wurden. Pro Ansatz wurden in Abhängigkeit von der Zellgröße bis zu 6×10^4 in 100 µl PBS eingesetzt. Die Zentrifugation erfolgte bei 1500 rpm für 10 Minuten. Nach der Zentrifugation wurden die Proben mit Eindeckelmedium eingedeckelt und konnten entweder sofort am Fluoreszenzmikroskop analysiert werden oder für spätere Analysen unter Ausschluss von Licht bei 4°C für etwa 7 Tage gelagert werden.

2.17 Pinozytoseaktivität unreifer Dendritischer Zellen

Eine der wichtigsten Aufgaben unreifer Dendritischer Zellen ist die Aufnahme von Antigenen aus der Umgebung, unter anderem durch Pinozytose. Diese Pinozytoseaktivität konnte mit Hilfe eines FITC-konjugierten BSA (FITC-BSA) nachgewiesen werden.

Unreife Dendritische Zellen wurden mit 0,5% HSA/PBS gewaschen und pelletiert (7 Minuten, 550 g, 4°C). Anschließend erfolgte die Einstellung der Zellzahl von 1×10^5 Zellen in 100µl PBS pro Ansatz. Die Proben wurden bei 37°C bzw. bei 4°C (Negativkontrolle) für 15 Minuten äquilibriert und anschließend mit unterschiedlichen FITC-BSA-Konzentrationen (0 – 100 µg/ml) versetzt. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C bzw. 4°C schlossen sich ein Waschschrilt mit kaltem PBS und die Fixierung mit 100 µl 4

% Paraformaldehyd an. Die Analyse der Proben erfolgte durchflusszytometrisch, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die Pinozytoseaktivität der Dendritischen Zellen diente.

2.18 CFDA-SE-Färbung von Tumorsphäroiden

Um die Antigenaufnahme-Aktivität unreifer Dendritischer Zellen von Tumormaterial nachzuweisen, wurden Tumorsphäroide mit Carboxyfluorescein-Succinylmidyl-Ester (CFDA-SE) markiert und für 16 Stunden mit unreifen Dendritischen Zellen co-kultiviert. Die abschließende Analyse erfolgte durchflusszytometrisch, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die Antigenaufnahmeaktivität der Dendritischen Zellen diente.

Um Tumorsphäroide (ALA/PDT; ALA; bestrahlt; unbehandelt; 25 Sphäroide pro Ansatz) mit CFDA-SE zu markieren, mussten diese zunächst in sterile 2 ml Reaktionsgefäße überführt und sedimentiert werden (7 Minuten, 550 g, 4°C). Nach Zugabe von 2 ml PBS schloss sich eine Inkubation von 15 Minuten bei 37 °C an. In dieser Zeit konnte die Färbelösung vorbereitet werden, indem man die 10 mM Stammlösung (gelöst in DMSO) mit PBS auf eine Endkonzentration von 1 nM verdünnte. 1 µl/ml dieser verdünnten Lösung wurde nun zu den Sphäroiden pipettiert und diese, nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C, erneut sedimentiert (7 Minuten, 550 g, 4°C) und in 2 ml CellGroDC-Medium überführt. In der sich nun anschließenden Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C konnte nicht metabolisiertes CFDA-SE aus den Zellen diffundieren. Nach zwei weiteren Waschschritten mit CellGroDC-Medium wurden die Sphäroide zu unreifen Dendritischen Zellen gegeben und bei 37°C; 5 % CO₂ inkubiert. Als Positivkontrolle diente ein Zell-Lysat von CFDA-SE gefärbten Sphäroiden, welches man durch die dreimalige Folge von Erhitzen auf 56°C und sofortiges Einbringen in flüssigen Stickstoff (-196°C) erzeugen konnte. Nach 16-stündiger Co-Kultur konnten die Zellen geerntet und die Aufnahme von CFDA-SE gefärbten Tumorzellen durch unreife DC fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch analysiert werden. Um die beiden Zellpopulationen am Durchflusszytometer voneinander unterscheiden zu können, erfolgte vor der Analyse eine Markierung der Dendritischen Zellen durch einen PE-konjugierten HLA-DR-spezifischen Antikörper. Entsprechend wurde die Grünfluoreszenz (CFSE, Tumormaterial) der rotpositiven DC über den MFI-Wert quantifiziert.

2.19 Allostimulatorische Aktivität Dendritischer Zellen

Um die allostimulatorische Aktivität Dendritischer Zellen nachzuweisen wurde eine sogenannte allogene, gemischte Leukozytenreaktion herangezogen, in der die Dendritischen Zellen als Stimulatorzellen für die T-Zell-Proliferation dienten [145].

Hierzu plattierte man unreife und mit TNF- α -stimulierte Dendritische Zellen (Positivkontrolle) sowie unreife DC, die für 3 Tage mit Sphäroiden co-kultiviert wurden (ALA/PDT; ALA; Bestrahlung; unbehandelt) in unterschiedlichen Zellzahlen (0 – 5 x 10³ Zellen pro Well) in X-Vivo 15 Medium auf einer 96-Well-Rundbodenplatte aus. Die unterschiedlichen Ansätze erfolgten als Triplikate. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen bei 15 Grey bestrahlt, wodurch es zu Chromosomenschäden kommt, die eine weitere Proliferation der Stimulatorzellen verhindern. Nach einer Ruhezeit von einer Stunde erfolgte die Zugabe von 1 x 10⁵ allogener T-Zellen/Well in 100 µl X-Vivo 15 Medium. Nach fünf-tägiger Co-Kultur bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Zugabe von 20 µl 5'-Brom-2'-Deoxy-Uridin (BrdU)/Well (1:100 verdünnt mit X-Vivo 15 Medium). Diese ermöglichte nach 16 h Inkubation die

quantitative Auswertung der Zellproliferation durch die Erfassung des BrdU-Einbaus in die proliferierenden Zellen.

Dazu mussten die Zellen sorgfältig resuspendiert und auf eine 96-Well-Flachbodenplatte überführt werden. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 300 g ohne Bremse und das vorsichtige Abnehmen des Überstandes. Nach 60 Minuten Inkubation bei 60°C wurden die Zellen mit 200 µl FixDenat/Well fixiert (30 Minuten bei Raumtemperatur). Das Fix/Denat wurde abgenommen, 100 µl Peroxidase-konjugierter anti-BrdU-Antikörper (1:100 verdünnt mit Verdünnungslösung, BrdU-Kit) pro Well appliziert und für weitere 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl Waschpuffer/Well (1:10 Verdünnung mit Aqua dest., BrdU-Kit) erfolgte die Zugabe von je 100 µl TMB-Substrats/Well und eine abschließende Inkubation von 30 Minuten. Die optische Dichte bei 660 nm gegenüber 490 nm konnte mit Hilfe eines ELISA-Readers ermittelt werden. Als Negativkontrolle dienten die Werte des BrdU-Einbaus von Dendritischen Zellen bzw. T-Zellen alleine.

2.20 MTT-Assay

Um eine mögliche Sensitivitätsabnahme der Glioblastomzellen gegenüber einer ALA/PDT-Behandlung frühzeitig zu bemerken, wurden in regelmäßigen Abständen MTT-Assays durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode kann die Proliferation von Zellen mittels einer Reduktion des gelb gefärbten Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (kurz MTT) in ein blauviolett Formazan durch vitale Zellen bestimmt werden [146].

Im Rahmen dieser Arbeit kam das Cell Proliferation Kit zum Einsatz. Dazu wurden in Abhängigkeit von der jeweiligen Zellgröße 5×10^3 – 1×10^4 Zellen pro Well auf eine 96-Well-Flachbodenplatte in einem Volumen von 100 µl des jeweiligen Kulturmediums ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation (37°C, 5% CO₂) erfolgte die Zugabe von 10 µl des MTT-Reagenzes pro Well. Während der folgenden vierstündigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ fand die Reduktion des MTT statt und lila-gefärbtes Tetrazolium-Salz wurde gebildet. Durch Zugabe von je 100 µl Solubilization Lösung pro Well und einer Inkubation über Nacht wurde die Reaktion abgeschlossen. Die Absorption konnte mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 550 nm gegenüber 650 nm ermittelt werden.

2.21 Nachweis hochreaktive Sauerstoffspezies (ROS) durch H₂DCF-DA

Das Prinzip der Photodynamischen Therapie beruht unter anderem auf einer direkten Zellschädigung durch Singulett-Sauerstoff (¹O₂) oder andere hochreaktive Sauerstoffspezies (ROS). Um diese Sauerstoffmoleküle nachzuweisen, erfolgte nach einer vier-stündigen Inkubation der Gliomsphäroide mit ALA eine zusätzliche Färbung mit 2,7-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (H₂DCF-DA)

H₂DCF-DA wird von Zellen durch die Zellmembran (begünstigt durch Acetatreste) aufgenommen. Intrazellulär wird H₂DCF-DA durch Esterasen prozessiert wodurch 2'7-Dichlorodihydrofluorescein entsteht, das im Zytoplasma akkumuliert. Durch Sauerstoffradikale wird das gebildete 2'7-Dichlorodihydrofluorescein intrazellulär oxidiert und führt im Endeffekt zu einer Fluoreszenz. Die ROS-Detektion erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers. Die ermittelte Fluoreszenzintensität diente zur Bestimmung der relativen ROS-Generierung.

Das H₂DCF-DA wurde als 100 mM Stocklösung in DMSO angesetzt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Anfärbung der Zellen erfolgte zunächst ein zweimaliger Waschschrift mit warmer Hanks Balance Salt Solution (HBSS). Anschließend wurde die H₂DCF-DA-Lösung zunächst auf eine Konzentration von 20 nM durch Verdünnung mit DMSO gebracht. Eine weitere Verdünnung mit HBSS schloss sich an, so dass sie eine Endkonzentration von 20 µM ergab. Die eigentliche Anfärbung der Tumorsphäroide erfolgte in einem 5 ml Polypropylen-Rundbodenröhrchen durch Zugabe von 1 ml der H₂DCF-DA-Lösung. Nach 20-minütiger Inkubation sowie zwei Waschschrift mit HBSS schloss sich die Bestrahlung der Tumorsphäroide an. Aufgrund der Flüchtigkeit der ROS musste die durchflusszytometrische Analyse der Zellen unmittelbar nach der Bestrahlung erfolgen.

2.22 Apoptosenachweis durch Annexin V-FITC

Um den prozentualen Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen nach ALA/PDT-Behandlung zu ermitteln, wurde das Annexin V-FITC Kit System for Detection of Apoptosis eingesetzt. Das Prinzip dieses Kits beruht auf einer Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin (PS), welches normalerweise auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist. Durch Apoptose kommt es zu Veränderungen der Zelle, unter anderem zu einer Translokation von PS auf die Außenseite der Membran. Das Ca²⁺-abhängige Phospholipid-bindende Protein Annexin V bindet mit einer hohen Affinität an Phosphatidylserin und kann somit als sensibler Marker für apoptotische Zellen genutzt werden. Nekrotische Zellen können aufgrund des Verlustes ihrer Membran-Integrität ebenfalls Annexin V binden und so ist es nicht möglich, apoptotische Zellen von nekrotischen zu differenzieren. Daher empfiehlt es sich, zur eindeutigen Unterscheidung, eine Propidiumiodid-Färbung (PI) durchzuführen, da Propidiumiodid (PI) nur in Zellen mit permeabler Membran, also nekrotischen Zellen, eindringen kann. Somit wird eine Differenzierung zwischen apoptotischen (Annexin V positiv, PI negativ) und nekrotischen Zellen (Annexin V positiv, PI positiv) ermöglicht.

Um die Tumorsphäroide anzufärben, wurden zunächst die vorbehandelten Sphäroide (ALA/PDT-behandelt bzw. unbehandelte Sphäroide) sowie hitzegeschädigte Zellen (30 Minuten bei 60°C) der jeweiligen Zelllinie aus Monolayer-Kultur als Positivkontrolle mit eiskaltem Kulturmedium oder PBS gewaschen (7 Minuten, 550 g, 4°C) und auf eine Zelldichte von 10⁵ – 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Danach erfolgte die Zugabe von je 2,5 µl Annexin V pro Ansatz in 100 µl der Zellsuspension. Eine 10-minütige lichtgeschützte Inkubation auf Eis schloss sich an. Je 1 µl PI wurde zu den Proben pipettiert, dann erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

2.23 Zytokinnachweis mittels Multiplex-Analyse mit fluoreszenten Bead-Arrays

Mit Hilfe der Luminex-xMap-Technologie konnte die Messung verschiedener Zytokinkonzentrationen durchgeführt werden. Diese Technologie erlaubt eine simultane Quantifizierung von bis zu 100 Parametern in einem Messvorgang aus einer einzelnen Probe. Die Grundlage dieser Methode bilden mikroskopisch kleine sphärische Polystyrolpartikel, sogenannte Mikrosphären oder Beads. Diese Beads sind mit zwei verschiedenen Farbstoffen (rot und infrarot) in 10 unterschiedlichen Konzentrationsstufen angefärbt. Daraus resultieren 100 verschiedene Bead-Sets mit genau definierten Fluores-

zenzintensitäten. Diese Fluoreszenzkodierung der Mikrosphären ist die Basis für ihre Erkennung durch das Analysegerät. Die in der jeweiligen Probe enthaltenen Analyten, hier Zytokine und Chemokine, binden an die spezifischen Antikörper, die sich auf der Beadoberfläche befinden. Jeder Bead-Typ ist dabei mit einem anderen Antikörper beschichtet. Der spezifische Nachweis der Bindung der Analyten an die Mikrosphären erfolgt über einen biotinylierten Antikörper gegen den jeweiligen Analyten, der wiederum durch einen an Streptavidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff detektiert wird. Die Bead-assoziierte Fluoreszenz wird dann für jeden Bead-Typ im Luminex-Analysegerät gemessen.

Der Nachweis der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, TNF- α , MIP1 α , MCP1, Fractalkine, Eotaxin, Rantes und Resistin wurde mit dieser Technologie durchgeführt. Dazu wurden Überstände aus Sphäroid-Kulturen verwendet. Um diese zu generieren wurden ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide in eine 96-Well-Platte mit 250 μ l 10 % DMEM-Medium überführt und für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgenommen und konnte bis zu Analyse bei -20°C gelagert werden. Überstände von unbehandelte Sphäroide dienten jeweils als Kontrolle. Reines Kulturmedium wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Je 50 μ l der Probe wurden in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert und mit 10 μ l des Bead-Mixes versetzt. Die Proben wurden in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt: pur, 1:10 und 1:100. Nach einer einstündigen Inkubation auf einer Schüttelplatte unter Ausschluss von Licht erfolgte die Zugabe der Detektions-Antikörper. Je 10 μ l des Antikörper-Mix wurden zu den Proben pipettiert und erneut für eine Stunde inkubiert. Nach Entfernen der überschüssigen Antikörper mit Wasch-Puffer wurde die Flüssigkeit mittels Vakuum-Filtration entfernt. Anschließend wurden 50 μ l der Streptavidin-PE-Lösung zu den Proben pipettiert und 30 Minuten auf einer Schüttelplatte unter Ausschluss von Licht inkubiert. Nach Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit mittels Vakuum-Filtration und der Zugabe von 100 μ l Waschpuffer konnte die Platte mittels Luminex-Analysegerät ausgewertet werden.

2.24 Zyklusversuche Sphäroide

Eine Photodynamische Behandlung mit 5-Aminolävulinsäure als Photosensitizer führt unter anderem zu einer direkten Schädigung der Zellen und möglicherweise zu einer damit einhergehenden, stabilen Veränderung. Um diese Frage zu klären, wurden mehrere ALA/PDT-Behandlungszyklen durchgeführt, um derart veränderte Zellen zu selektieren.

Dazu wurden zunächst Tumorsphäroide generiert und nach der jeweiligen Behandlung (ALA/PDT und unbehandelt) mit 5 ml DMEM-Medium in eine T25-Zellkulturflasche gegeben und kultiviert (37°C, 5% CO₂). Tägliche Kontrolle der Sphäroide und die fotografische Dokumentation mittels Aviso CellCelector™ schlossen sich an. Bei 80 % Konfluenz wurden die Zellen auf eine T75-Zellkulturflasche umgesetzt, weiter kultiviert und aus diesen Zellen erneut Sphäroide generiert, um diese wiederum einem weiteren Behandlungszyklus zu unterziehen. Hier wurde nach dem gleichen Schema verfahren, bis ein 3. Behandlungszyklus erfolgte. Aus diesen Zellen konnte anschließend RNA für weiterreichende Analysen isoliert werden.

2.25 Molekularbiologische Methoden

2.25.1 RNA-Isolation aus Tumorsphäroiden

Die Isolierung von RNA aus Tumorsphäroiden der Linie A172 (1. sowie 3. Behandlungszyklus ALA/PDT und unbehandelte Sphäroide) erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen. Hierzu wurden pro Ansatz 200 Sphäroide in 350 µl RLT-Lysepuffer mit β-Mercaptoethanol aufgenommen. Nach erfolgter Zellyse konnten die Proben nun entweder direkt weiter aufgearbeitet oder zur späteren Verarbeitung bei -80°C gelagert werden. Zur weiteren Behandlung wurde das Lysat auf eine Qiashreder-Säule pipettiert und anschließend bei Raumtemperatur 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Mit Hilfe dieses Zentrifugationsschrittes werden unerwünschte Zellmembranbestandteile aus den Proben entfernt. Nach Zugabe von 350 µl 70 % Ethanol und gründlicher Durchmischung wurde der Probenansatz auf eine RNeasy mini column überführt und bei 10.000 rpm 15 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Eine DNase-Behandlung schloss sich an, um sicher zu stellen, dass jegliche DNA aus der Probe eliminiert wird. Dazu führte man zunächst einen Waschschrift mit 350 µl RW1-Puffer durch und bereitete dann den DNase-Verdau vor, indem man 10 µl DNase I Stocklösung und 70 µl RDD-Puffer (RNase-Free DNase Set) möglichst mittig auf die RNeasy Silica-Gelmembran pipettierte. Es folgte ein 15-minütiger Inkubationsschritt bei Raumtemperatur, dem sich wiederum ein Waschschrift mit RW-1-Puffer anschloss. Hiermit war die DNase-Behandlung abgeschlossen. Nach zwei weiteren Waschschriften mit je 500 µl RPE-Puffer erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm, um sicher zu stellen, dass jegliche Ethanol-Reste entfernt wurden. Die nun „trockene“ Membran der Säule sollte nun nur noch die Proben-RNA beinhalten. Um diese zu eluieren, wurden 30-50 µl RNase-freies Wasser direkt mittig auf die Membran der Säule gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 10.000 rpm erhielt man die aufgereinigte RNA, welche aufgrund ihrer hohen Instabilität direkt auf Eis gestellt werden sollte. Mit Hilfe des Nanodrops konnte die Konzentration der RNA bestimmt werden. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.25.2 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde mit dem Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit der Firma Roche; Mannheim durchgeführt.

Es wurde nach folgendem Pipettierschema gearbeitet:

- 1µg RNA
- 1µl Oligo-dT-Primer (50 µM)
- Ad 11,4µl H₂O

Dieser Ansatz musste 5 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis überführt werden.

In dieser Zeit konnte der eigentliche Reaktionsansatz vorbereitet werden:

- 4µl Transkriptor Buffer (V2)
- 0,5µl RNase Inhibitor (V3)
- 2µl Desoxynucleotide Mix 10mM (V5)
- 1µl DTT (V7)
- 1,1µl Reverse Transkriptase (V1)

Pro Reaktion wurden nun 8,6 µl dieses Ansatzes zu den RNA-Proben gegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 20 µl ergab. Die Ansätze wurden zunächst 30 Minuten bei 50°C inkubiert, danach erfolgte eine Inkubation für 5 Minuten bei 85°C. Ein sofortiges Überführen der Proben auf Eis beendete die Reaktion. Die cDNA konnten sofort eingesetzt oder für einen späteren Einsatz bei -20°C gelagert werden.

2.25.3 RT-PCR

Zur Analyse der Expression der Matrix Metalloproteinasen in den Gliomosphäroiden der Zelllinien U373 und A172 (1. sowie 3. ALA/PDT-Behandlungszyklus) wurde die klassische RT-PCR herangezogen (siehe Abbildung 2.5). Die durch reverse Transkription (vgl. Abschnitt 2.25.2) gewonnene cDNA diente als Template für die Reaktion. β -Aktin, als „House-Keeping-Gen“ wurde in allen Ansätzen als Kontrolle mitgeführt.

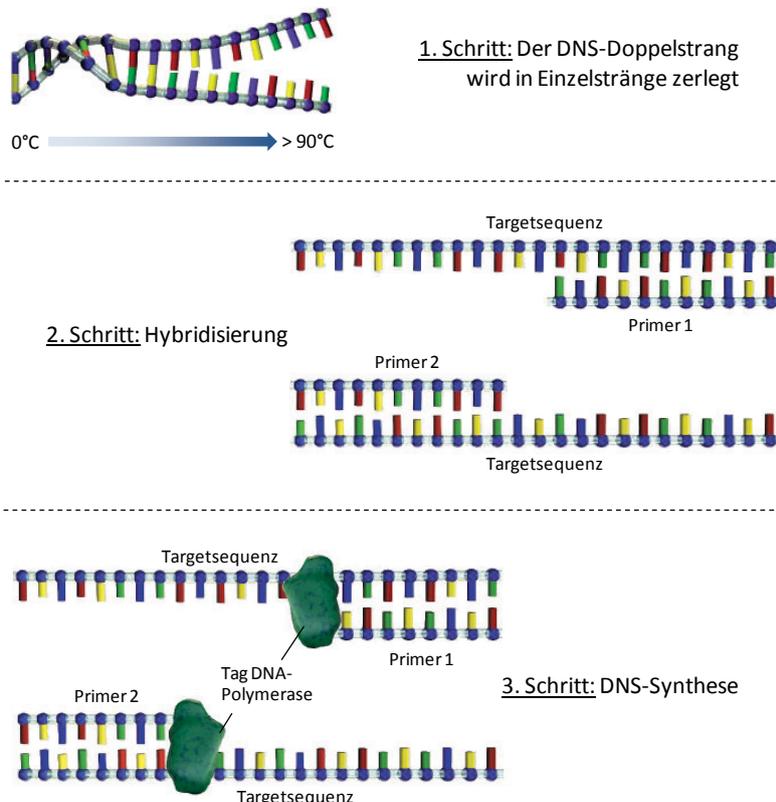


Abbildung 2.5: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (modifiziert nach: http://www.roche.de/diagnostics/infektionsdiagnostik/pcr_funktionsweise.htm?).

Folgender Standardansatz lag der PCR zu Grunde:

- 1,5 µl cDNA
- 1 µl sense-primer (10 pmol)
- 1 µl antisense-primer (10 pmol)
- 12,55 µl H₂O
- 5 µl Q-Solution (5x)
- 2,5 µl Puffer (10x)
- 1,25 µl dNTP Mix (10mM)
- 0,2 µl Taq-Polymerase

Tabelle 6 zeigt die Primer, die für die jeweiligen PCR-Ansätze genutzt wurden.

Tabelle 6: verwendete Primer für die PCR

| Gen | GeneBank Accession | Größe des Produktes | Sequenz | |
|------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------|-----------------------------------|
| MMP-1 (Collagenase 1) | NM_002421.3 | 406 bp | Sense: | ATT CTA CTG ATA TCG GGG CTT TGA |
| | | | Antisense: | ATG TCC TTG GGG TAT CCG TGT AG |
| MMP-2 (Gelatinase A) | NM_004530.4 | 253 bp | Sense: | TTT CCA TTC CGC TTC CAG GGC ACA T |
| | | | Antisense: | TCG CAC ACC ACA TCT TTC CGT CAC T |
| MMP-3 (Stromelysin 1) | NM_002422.3 | 441 bp | Sense: | ATG CCC ACT TTG ATG ATG ATG AAC |
| | | | Antisense: | CCA CGC CTG AAG GAA GAG ATG |
| MMP-7 (Matrilysin) | NM_002423.3 | 267 bp | Sense: | TGT TAA ACT CCC GCG TCA TAG AAA |
| | | | Antisense: | CTC CTC GCG CAA AGC CAA TCA T |
| MMP-8 (Collagenase 2) | NM_002424.2 | 461 bp | Sense: | ACG GGG AAG CCA AAT GAG GA |
| | | | Antisense: | GAG TGA GCG AGC CCC AAA GAA T |
| MMP-9 (Gelatinase B) | NM_004994.2 | 475 bp | Sense : | GCG CTG GGC TTA GAT CAT TCC TCA |
| | | | Antisense : | GCA GCG CGG GCC ACT TGT C |
| MMP-10 (Stro- | NM_002425.2 | 176 bp | Sense: | GGC TCT TTC ACT CAG CCA AC |

| | | | | |
|--------------------------------------|-------------|--------|-------------|---------------------------------|
| melysin 2) | | | Antisense: | TCC CGA AGG AAC AGA TTT TG |
| MMP-11 (Stromelysin 3) | NM_005940.3 | 205 bp | Sense: | TAG GTG CCT GCA TCT GTC TG |
| | | | Antisense: | TGG CTT TGG AGG ATA GCA GT |
| MMP-12 (hum. Metalloelastase) | NM_002426.4 | 272 bp | Sense: | GAC CGG GCA ACT GGA CAC ATC TA |
| | | | Antisense: | CAC GGG CAA AAA CCA CCA AAA T |
| MMP-13 (Collagenase 3) | NM_002427.3 | 280 bp | Sense : | CCT GGC TGC CTT CCT CTT CTT GA |
| | | | Antisense : | AAC CCC GCA TCT TGG CTT TTT C |
| MMP-19 (RASI) | NM_002429.4 | 735 bp | Sense: | GCT GGG CCG CTG GAG AAA GAA |
| | | | Antisense: | CGA GGC GAG TAG ACA GCA GCA TCC |
| TIMP-1 | NM_003254.2 | 497 bp | Sense: | TTT GAG CCC CTG GCT TCT GG |
| | | | Antisense: | AAG CAA TGA GTG CCA CTC TGC |
| TIMP-3 | NM_000362.4 | 196 bp | Sense: | CAC GCT GGT CTA CAC CAT CAA G |
| | | | Antisense: | CCT CTC CAC GAA GTT GCA CAG |
| β-Aktin | NM_001101.3 | 192 bp | Sense: | GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA |
| | | | Antisense: | GGT CTC AAA CAT GAT CTG GGT C |

Standardbedingungen für die Primer MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und β-Aktin:

94°C 4 Minuten Denaturierung

35 Zyklen:

94°C 30 Sekunden Denaturierung

60°C 30 Sekunden Annealing

72°C 30 Sekunden Elongation

abschließend:

72°C 7 Minuten finale Elongation

4°C ∞

Standardbedingungen für verbleibende Primer:

| | | |
|------|-----------|---------------|
| 94°C | 4 Minuten | Denaturierung |
|------|-----------|---------------|

35 Zyklen:

| | | |
|------|-------------|---------------|
| 94°C | 45 Sekunden | Denaturierung |
|------|-------------|---------------|

| | | |
|------|-------------|-----------|
| 59°C | 60 Sekunden | Annealing |
|------|-------------|-----------|

| | | |
|------|-------------|------------|
| 72°C | 60 Sekunden | Elongation |
|------|-------------|------------|

abschließend:

| | | |
|------|-----------|-------------------|
| 72°C | 7 Minuten | finale Elongation |
|------|-----------|-------------------|

| | | |
|-----|---|--|
| 4°C | ∞ | |
|-----|---|--|

2.25.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde in einer Elektrophorese-Kammer bei 120 Volt für 30 Minuten durchgeführt. Zunächst musste dazu ein 2%iges Agarosegel hergestellt werden, indem die jeweilige Menge an Agarose mit 1 x TBE-Puffer versetzt und bis zur vollständigen Auflösung der Agarose aufgekocht wurde. Nach Abkühlung der Lösung wurde eine entsprechende Menge Ethidiumbromid (10 mg/ml Stammlösung) zugesetzt (3% Endkonzentration) und das Agarose-Ethidiumbromid-Gemisch in einen Gelschlitten überführt. Nach Erstarren der Agarose erfolgte das Einlegen des Gels in die Kammer, wo es mit einfach konzentriertem TBE-Puffer überschichtet wurde. Danach erfolgte die Beladung der Agarosegeltaschen mit den Proben, denen ein Loadingpuffer zugesetzt wurde. Zur Bestimmung der Größe der einzelnen DNA-Fragmente wurde die 100 bp-Leiter als Größenstandard eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht und wurde mit Hilfe eines Photodokumentationssystem dokumentiert.

Pipettierschema für die Probenvorbereitung:

| | |
|-------|-------------|
| 25 µl | PCR-Produkt |
|-------|-------------|

| | |
|------|---------------|
| 5 µl | Loadingpuffer |
|------|---------------|

davon:

| | |
|-------|-----------------------|
| 10 µl | auf das Gel auftragen |
|-------|-----------------------|

Agarose-Gel:

| | |
|-----------|---------|
| 2 % (w/v) | Agarose |
|-----------|---------|

| | |
|-------------|----------------|
| 50 – 100 ml | 1 x TBE-Puffer |
|-------------|----------------|

Lösungen:

10x TBE-Puffer: 0,89 M Tris

0,89 M Borsäure

0,25 M Na₂EDTA

pH 8,3

2.26 Statistik

Soweit nicht anderes angegeben, sind alle Daten als Mittelwert \pm SEM aufgeführt. Statistische Analysen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism Software Version 5 durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-test oder einem 2-way ANOVA ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung von Glioblastom-Sphäroiden aus Monolayer-Kulturen

Im Rahmen dieser Dissertation wurde schwerpunktmäßig mit Tumorsphäroiden gearbeitet, die aus Monolayer-Kulturen generiert wurden. Nach drei- bis fünftägiger Kultur auf agarbeschichteten Zellkulturflaschen konnten aus 2×10^6 Zellen 200 – 250 μm große Glioblastom-Sphäroide gewonnen werden. Abbildung 3.1 stellt dies repräsentativ für alle verwendeten Zelllinien anhand der Zelllinien A172 und U87 dar.

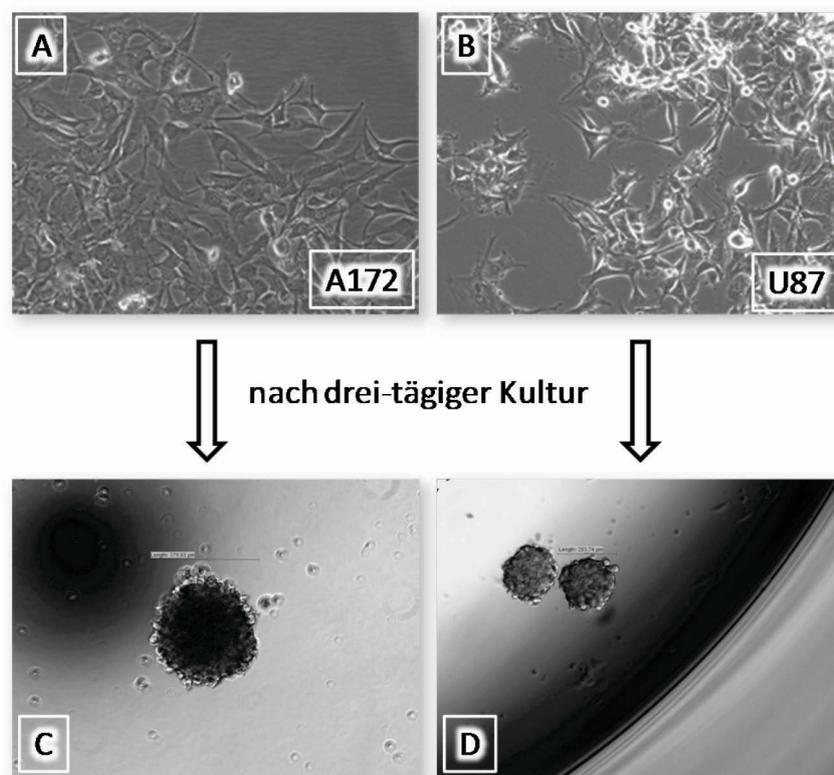


Abbildung 3.1: Generierung von Gliomsphäroiden aus Monolayer-Kulturen. Aus adhärennten Monolayer-Kulturen konnten im Verlauf von drei bis fünf Tagen Tumorsphäroide durch Kultivierung auf agarbeschichteten Zellkulturflaschen gewonnen werden. A und B zeigen die adhärennten Zellen der Zelllinien A172 und U87 (10-fache Vergrößerung), C und D stellen die entsprechenden Tumorsphäroide dar (10-fache (C) sowie 4-fache Vergrößerung (D)).

Diese Tumorsphäroide, die für die Zelllinien U87, U251, U373 und A172 generiert wurden, konnten in die entsprechenden Versuche eingebracht werden. Um die Effekte einer ALA vermittelten Photodynamischen Therapie auf die Glioblastomzellen zu untersuchen, wurde eine Behandlung der Sphäroide wie in Abschnitt 2.11 beschrieben durchgeführt. Parallel dazu erfolgte eine Behandlung der Sphäroide nur mit ALA (ALA) oder nur mit Bestrahlung bei 635 nm (Bestrahlung). Als weitere Kontrolle wurden unbehandelte Sphäroide verwendet. Durch diese Kontrollen sollte sichergestellt werden,

dass mögliche Effekte tatsächlich auf eine ALA/PDT-Behandlung zurückzuführen sind und nicht bereits durch Teilkomponenten induziert werden.

3.2 Reduktion der Zellproliferationsrate durch ALA/PDT-Behandlung von Glioblastomzellen

In vorherigen Arbeiten in unserem Labor konnte bereits ein zytotoxischer Effekt der ALA/PDT-Behandlung sowie eine damit einhergehende Reduktion der Proliferationsrate der Glioblastomzellen nachgewiesen werden. Die im Rahmen dieser Versuchsreihen als optimal ermittelte Konzentration von 12,5 µg/ml ALA (LD₅₀-Dosis) wurde auch hier für alle Versuche beibehalten.

Um eine mögliche Abnahme der Sensitivität gegenüber der Photodynamischen Therapie rechtzeitig zu bemerken, erfolgten in regelmäßigen Abständen Zytotoxizitäts-Assays. Dazu wurden die Sphäroide mit aufsteigender ALA-Konzentration (0 µg/ml – 25 µg/ml ALA) behandelt, bestrahlt und mittels MTT-Assay analysiert.

Abbildung 3.2 zeigt beispielhaft einen repräsentativen MTT-Assay für die Zelllinie U373. Die Proliferationsrate der Zellen wurde über ELISA-Messungen (Optische Dichte (OD) bei 550 nm gegenüber 650 nm) ermittelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Sphäroide für die eine OD von $0,484 \pm 0,009$; n=12 gemessen wurde. Bei zunehmender ALA-Konzentration zeigte sich eine deutliche Abnahme der Proliferationsrate. Der Wert der OD lag für eine Konzentration von 12,5 µg/ml ALA bei $0,262 \pm 0,014$; n=4 und für 18 µg/ml ALA bei $0,198 \pm 0,009$; n=4. Eine weitere Reduktion der Proliferationsrate war bei 25 µg/ml des Photosensitizers zu verzeichnen, hier lagen die Werte bei $0,196 \pm 0,001$; n=4).

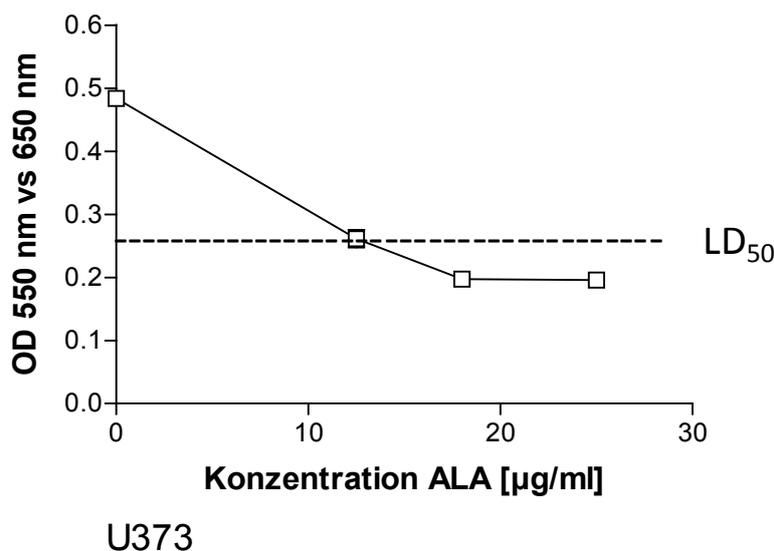


Abbildung 3.2: Reduktion der Zellproliferationsrate von Gliomsphäroiden nach ALA/PDT-Behandlung. Tumorsphäroide der Zelllinie U373 wurden mit aufsteigender ALA-Konzentration inkubiert, bestrahlt und die Proliferation mittels MTT-Assay analysiert. Dargestellt ist die Reduktion der Zellproliferationsrate gemessen anhand der optischen Dichte (OD) mit steigender ALA-Konzentration. Werte repräsentieren Mittelwert ± SEM für Kontrolle n=12 und die unterschiedlichen ALA-Konzentrationen n=4.

Vergleichbare Daten ergaben sich ebenfalls für die Zelllinien U87, U251 und A172. Im Verlauf der gesamten Arbeit konnte kein Verlust der Sensitivität der verschiedenen Gliomzelllinien gegenüber einer Photodynamischen Therapie mit ALA als Photosensitizer nachgewiesen werden.

3.3 Inhibierung des migratorischen Verhaltens von Glioblastomzellen nach ALA/PDT-Behandlung

Glioblastome zeichnen sich unter anderem durch ein invasives Wachstum aus. Um den Einfluss der ALA/PDT-Behandlung auf dieses Charakteristikum zu untersuchen, erfolgte zunächst die Durchführung von Migrationsassays. Dazu wurden ALA/PDT-behandelte und unbehandelte Sphäroide der unterschiedlichen Tumorzelllinien auf eine 96-Well-Gewebeplatte ausplattiert (1 Sphäroid/Well) und über ein Zeitintervall von 7 - 10 Tagen (je nach Zelllinie) beobachtet. Der Durchmesser der Sphäroide, d.h. der Migrationsradius der Tumorzellen, die vom Sphäroid ausgehend wuchsen, wurde gemessen und mit Hilfe des Aviso CellCelector™ dokumentiert.

Für alle analysierten Zelllinien konnte herausgestellt werden, dass eine ALA/PDT-Behandlung eine deutliche Inhibierung der Migrationsfähigkeit induziert. Das Maß dieser Inhibierung variierte von Linie zu Linie.

Abbildung 3.3 stellt die Migration aus einem Tumorsphäroid der Zelllinie U251 über einen Zeitraum von acht Tagen dar. Die Größe der unbehandelten Sphäroide nahm von $285,6 \mu\text{m} \pm 26,66 \mu\text{m}$ ($n=4$) an Tag 0 auf $1390 \mu\text{m} \pm 3,643 \mu\text{m}$ ($n=4$) an Tag 8 zu. Es konnte folglich eine ausgeprägte Größenzunahme verzeichnet werden. Durch ALA/PDT-Behandlung hingegen konnte eine signifikante Inhibierung ($p < 0,0001$) der Zellmigration nach ALA/PDT-Behandlung induziert werden. Die Migration der Zellen stagnierte für mehrere Tage. Nur eine geringfügige Zunahme der Größe konnte verzeichnet werden (Tag 0: $429 \mu\text{m} \pm 38,08 \mu\text{m}$; $n=4$ und Tag 8: $604 \mu\text{m} \pm 53,24 \mu\text{m}$). Deutlich herauszustellen ist hierbei, dass es sich in dieser Versuchsreihe um vitale Zellen handelte, die lediglich in ihrem Migrationsverhalten gehemmt wurden. Dieses konnte mittels Trypanblau-Färbung überprüft werden.

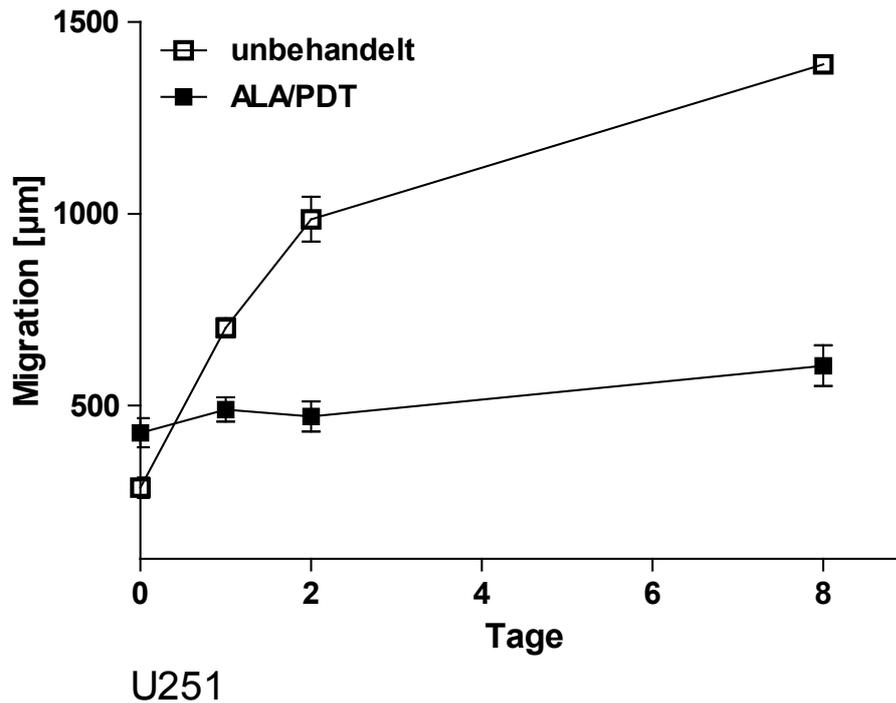


Abbildung 3.3: Inhibierung des Migrationsverhaltens von Zellen der Linie U251 nach Photodynamischer Therapie. Ermittelt wurde der Durchmesser, d.h. der Migrationsradius un behandelter und ALA/PDT-behandelter Zellen aus einem Sphäroid heraus, über einen Zeitraum von acht Tagen. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Aviso CellCelector™. Deutlich erkennbar ist der inhibitorische Effekt der ALA/PDT-Behandlung auf das Migrationsverhalten der U251-Zellen. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM vier unabhängiger Einzelerperimente.

Vergleichbare Daten ergaben sich für die Tumorsphäroide der Zelllinie U373. Die Abbildung 3.4 veranschaulicht deutlich den inhibitorischen Einfluss, den eine Photodynamische Behandlung mit ALA auf das Migrationsverhalten dieser Zellen ausübt. Illustriert wird der Verlauf der ersten vier Tage nach einer ALA/PDT-Behandlung. Während die un behandelten Zellen rasch vom Sphäroid ausgehend migrieren, zeigen die ALA/PDT-behandelten Sphäroide im Verlauf der ersten vier Tage keine Migration von Zellen aus dem Sphäroid heraus.

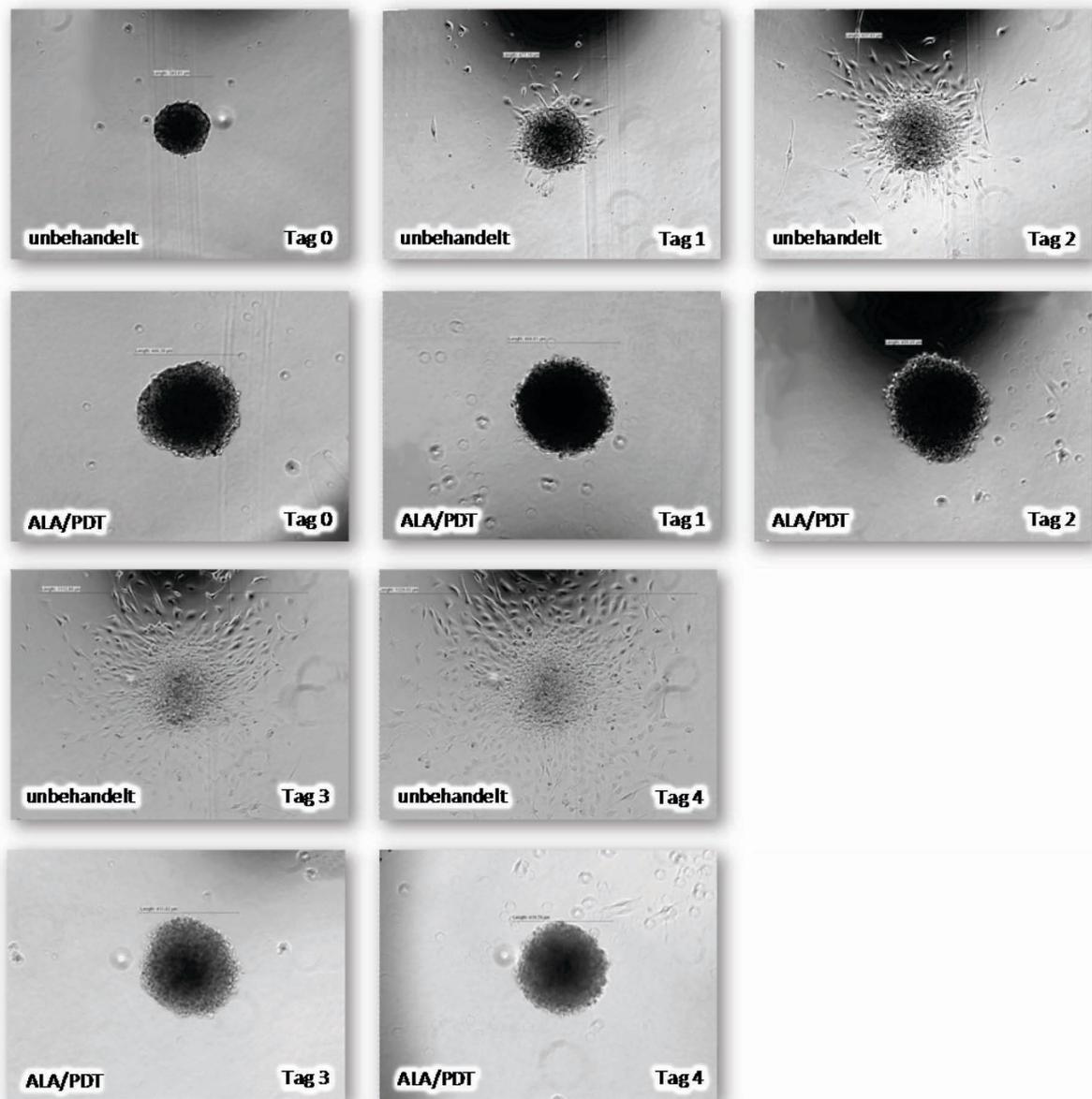


Abbildung 3.4: Inhibition der Migration von U373-Zellen nach ALA/PDT-Behandlung. Unbehandelte und ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide der Zelllinie U373 wurden in einer 96-Well-Platte ausplattiert (je 1 Sphäroid pro Well). Dargestellt ist ein repräsentativer Verlauf der ersten vier Tage nach einer ALA/PDT-Behandlung von vier unabhängigen Experimenten (10-fache Vergrößerung).

Die Abbildung 3.5 fasst diese Ergebnisse für einen Verlauf von sieben Tagen graphisch zusammen. Die Größe der Sphäroide der Zelllinie U373 nahm im Durchschnitt für die unbehandelten Zellen von $336,3 \mu\text{m} \pm 31,87 \mu\text{m}$ ($n=4$) an Tag 0 auf $1375 \mu\text{m} \pm 28,16 \mu\text{m}$ ($n=4$) an Tag 7 zu. Die Werte der ALA/PDT-behandelten Zellen lagen signifikant darunter ($p < 0,0001$). Hier reichte die Spanne von $369,6 \mu\text{m} \pm 33,49 \mu\text{m}$ ($n=4$) an Tag 0 bis hin zu einem Durchmesser von $414,6 \mu\text{m} \pm 0 \mu\text{m}$ ($n=1$) an Tag 7. Auch dieses verdeutlicht erneut, dass die Glioblastomzellen durch ALA/PDT-Behandlung in ihrem migratorischen Verhalten gehemmt werden.

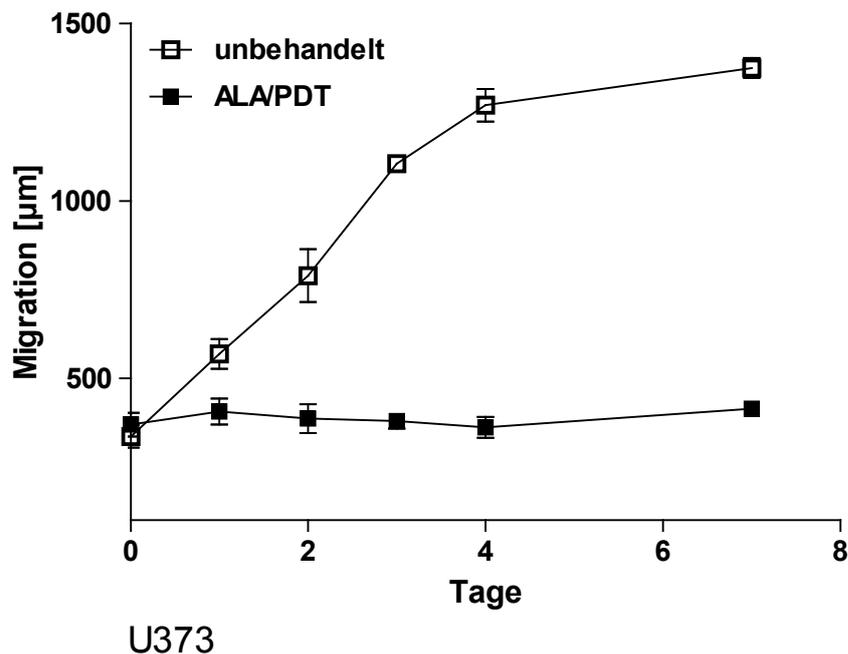


Abbildung 3.5: Inhibierung des Migrationsverhaltens von U373-Zellen nach ALA/PDT-Behandlung. Ermittelt wurde der Durchmesser, d.h. der Migrationsradius unbehauelter und ALA/PDT-behandelter Zellen, die aus einem Sphäroid migrierten, über einen Zeitraum von sieben Tagen. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Aviso CellCelector™. Deutlich erkennbar ist der inhibitorische Effekt der ALA/PDT-Behandlung auf das Migrationsverhalten der U373-Zellen. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM vier unabhängiger Einzelerperimente.

Ein vergleichbarer Verlauf zeigte sich ebenfalls für die Sphäroide der Linien U87 und A172. Auch hier zeigte sich erneut ein signifikanter inhibitorischer Effekt auf das Wachstumsverhalten der Tumorsphäroide nach ALA/PDT (U87, $p < 0,0001$; A172=0,0002). Die unbehauelten Sphäroide lagen im Durchschnitt bei einer Größe von $226 \mu\text{m} \pm 9,717 \mu\text{m}$ (Tag 0; $n=4$) und $3257 \mu\text{m} \pm 155,8 \mu\text{m}$ (Tag 8) für die U87-Sphäroide sowie bei $361,9 \mu\text{m} \pm 26,97 \mu\text{m}$ (Tag 0; $n=4$) und $1621 \mu\text{m} \pm 322,8$ (Tag 7) für A172-Sphäroide. Die Größe der ALA/PDT-behandelten Sphäroide startete bei $270,6 \mu\text{m} \pm 28,17 \mu\text{m}$ (Tag 0; $n=4$; U87) bzw. $428,5 \mu\text{m} \pm 24,03 \mu\text{m}$ (Tag 0; $n=4$; A172) und erreichte maximale Werte von $1018 \mu\text{m} \pm 46,8 \mu\text{m}$ (Tag 8; U87) bzw. $726,7 \mu\text{m} \pm 26,15 \mu\text{m}$ (Tag 7; A172). Diese Daten werden in Abbildung 3.6 zusammengefasst. Auch an dieser Stelle muss noch einmal verdeutlicht werden, dass die Zellen der Linien U87 und A172 durch die ALA/PDT nicht in den Zelltod übergegangen sind, sondern dass es sich um vitale Zellen handelte.

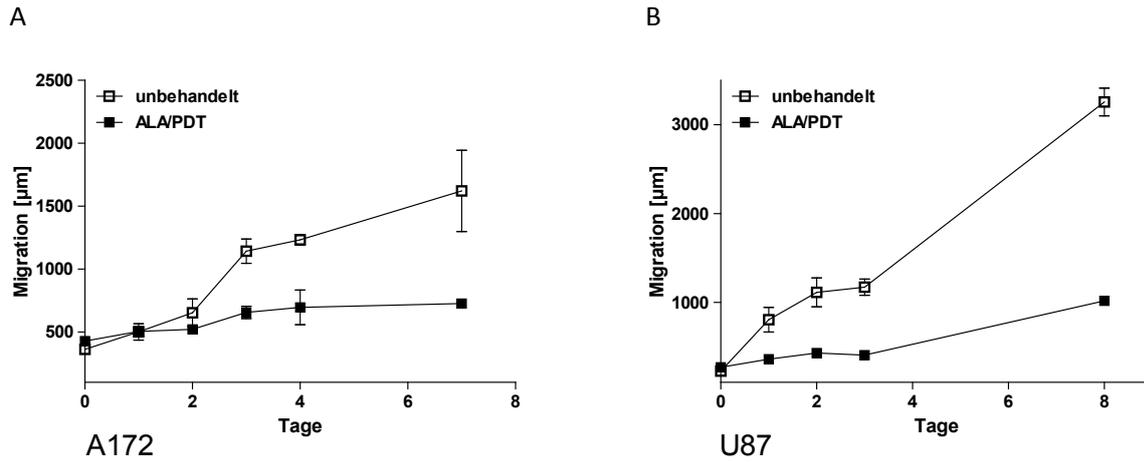


Abbildung 3.6: Inhibierung des Migrationsverhaltens von U87- und A172-Zellen nach ALA/PDT-Behandlung. Ermittelt wurde der Durchmesser, d.h. der Migrationsradius un behandelter und ALA/PDT-behandelter Zellen, die aus einem Sphäroid migrierten, über einen Zeitraum von sieben bzw. acht Tagen. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Aviso CellCelector™. Deutlich erkennbar ist der inhibitorische Effekt der ALA/PDT-Behandlung auf das Migrationsverhalten der A172- und U87-Zellen. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM vier unabhängiger Einzelerperimente.

Abbildung 3.7 zeigt den Einfluss der ALA/PDT-Behandlung auf Tumorsphäroide der Zelllinie A172 während der ersten vier Tage. Herauszustellen ist hierbei, dass auch für die behandelten Sphäroide bereits in den ersten Tagen nach der Behandlung die ersten Zellen begannen, aus dem Sphäroid zu wachsen. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien geschieht dieses zu einem deutlich früheren Zeitpunkt.

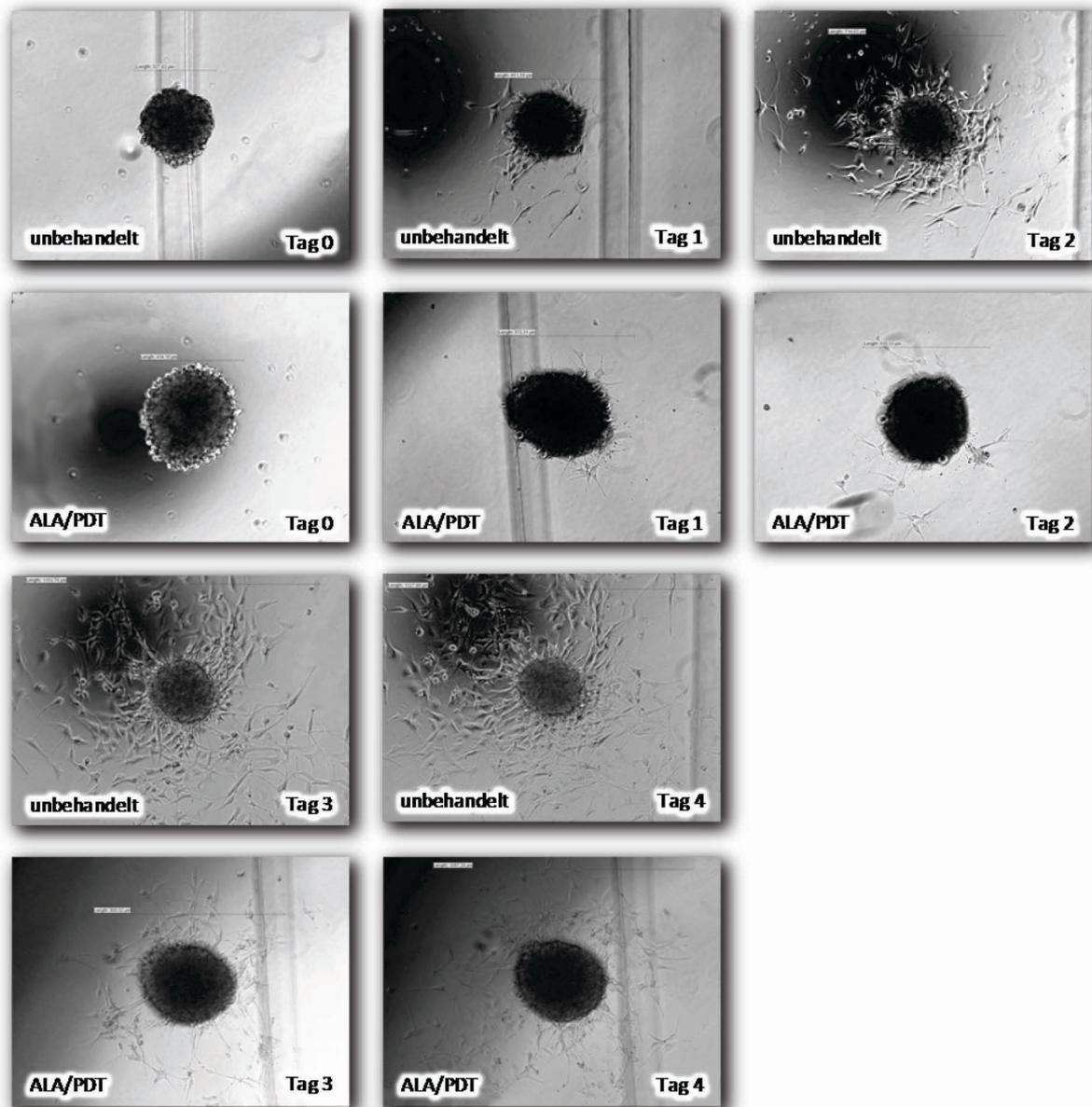


Abbildung 3.7: Inhibition der Migration von A172-Zellen nach ALA/PDT-Behandlung. Unbehandelte und ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide der Zelllinie A172 wurden in einer 96-Well-Platte ausplattiert (je 1 Sphäroid pro Well). Dargestellt ist ein repräsentativer Verlauf der ersten vier Tage nach einer ALA/PDT-Behandlung von vier unabhängigen Experimenten (10-fache Vergrößerung).

3.3.1 Morphologische Veränderungen infolge der ALA/PDT-Behandlung

Um herauszufinden, ob die gehemmte Migrationsfähigkeit mit morphologischen Veränderungen der Zelle einhergeht, wurden Versuche mit repetitiven ALA/PDT-Behandlungszyklen durchgeführt. Damit konnte überprüft werden, ob es zum einen überhaupt zu morphologischen Veränderungen in den überlebenden Zellen kommt und zum anderen, ob diese Veränderungen gegebenenfalls stabil, das heißt über einen längeren Zeitraum andauernd sind.

Dazu erfolgte eine ALA/PDT-Behandlung mit anschließendem Ausplattieren der Sphäroide in einer Gewebekulturflasche. Bei 80% Konfluenz wurden aus diesen als Monolayer wachsenden Zellen erneut Sphäroide generiert und ein zweiter Behandlungszyklus schloss sich an. Unbehandelte Tumorsphäroide, die entsprechend kultiviert wurden, dienten als Vergleichszellen.

Bereits nach einer ALA/PDT-Behandlung der Tumorsphäroide der Zelllinie A172 zeigten sich die ersten Veränderungen der Zellen, die vom Sphäroid ausgehend wuchsen (vgl. Abbildung 3.8). Waren diese zuvor meist spindelförmige Zellen mit zwei oder mehreren längeren Zytoplasmafortsätzen, so wiesen sie nach der Behandlung, aufgrund der Zurückbildung der länglichen Ausläufer eine eher „rundliche“ Morphologie auf.

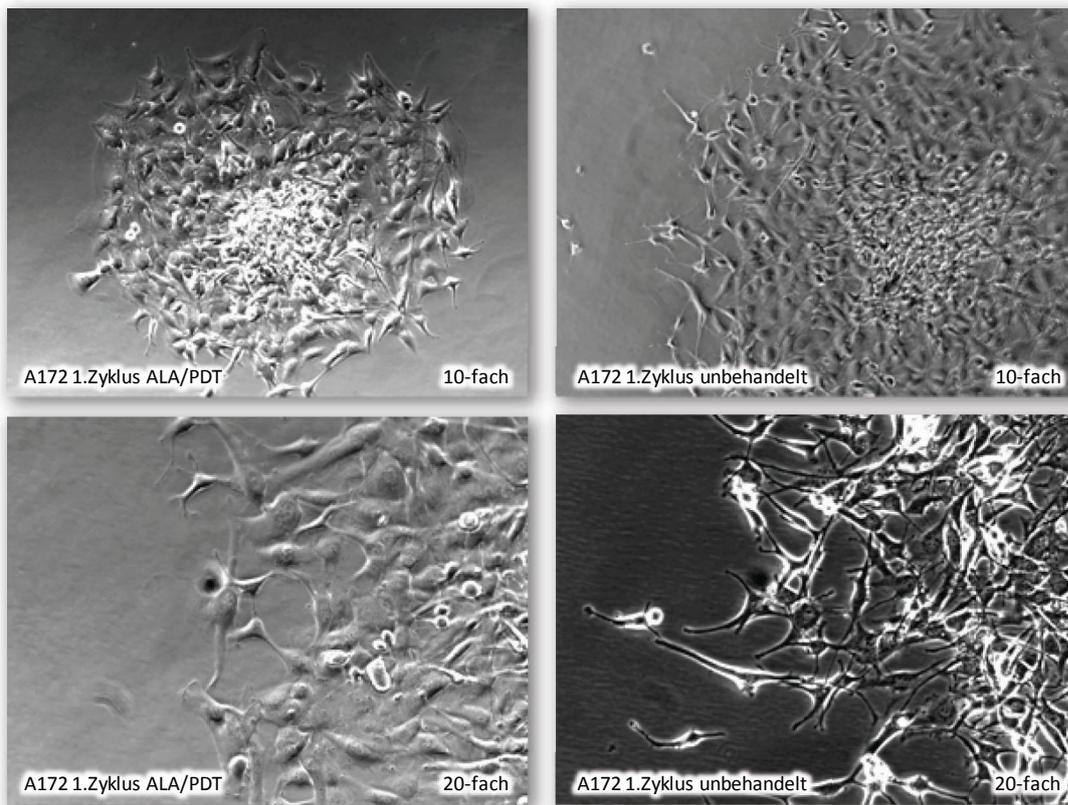


Abbildung 3.8: Morphologische Veränderungen infolge einer ALA/PDT-Behandlung. Unbehandelte und ALA/PDT-behandelte A172-Sphäroide wurden in einer Gewebekulturflasche ausplattiert und morphologische Veränderungen der aus dem Sphäroid herauswachsenden Zellen mittels Aviso CellCelector™ dokumentiert (10-fache und 20-fache Vergrößerung). Deutlich erkennbar ist eine Veränderung von vormalig spindelförmiger Morphologie zu abgerundeten Zellen durch eine Zurückbildung der länglichen Ausläufer in den ALA/PDT-behandelten Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Ganz besonders ausgeprägt zeigte sich der Einfluss einer ALA/PDT-Behandlung für Zellen der Linie U373. Das Migrationsverhalten dieser Zellen wurde für einige Tage vollständig inhibiert, deutlich länger im Vergleich zu den Zellen der Linie A172. Damit einher ging eine stark veränderte Morphologie, die man bei den aus den Sphäroiden herauswachsenden überlebenden Zellen zur Kenntnis nehmen konnte. Vor der Behandlung konnten die Zellen ebenfalls als eher spindelförmige Zellen mit zwei oder mehreren Fortsätzen charakterisiert werden. Nach einer ALA/PDT-Behandlung hingegen änderten sie ihren Phänotypen fast vollständig. Jetzt stellten sie sich als abgerundete, fast kubische

Zellen dar, bei denen man nahezu von einer epithelialen Morphologie sprechen konnte. Dieses wird besonders durch Abbildung 3.9 verdeutlicht.

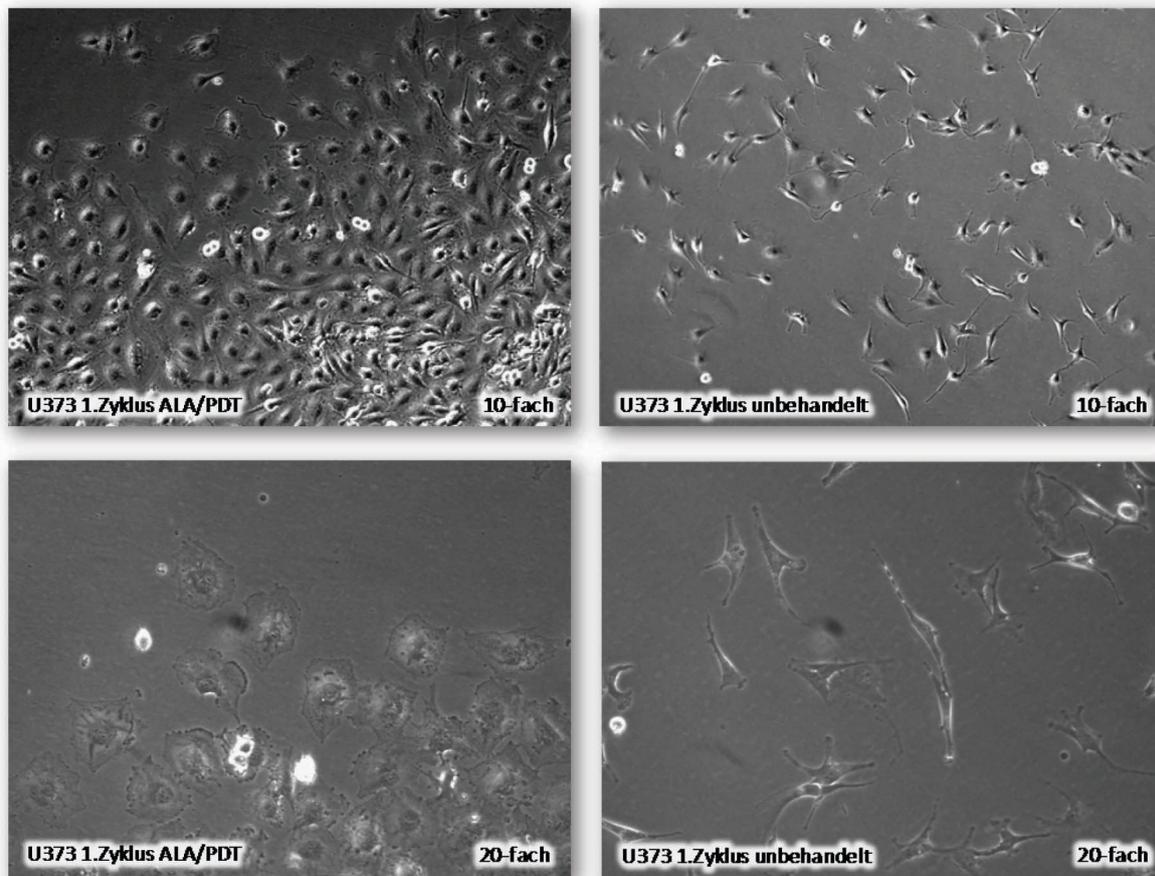


Abbildung 3.9: Morphologische Veränderungen infolge einer ALA/PDT-Behandlung. Unbehandelte und ALA/PDT-behandelte U373-Sphäroide wurden in einer Gewebekulturflasche ausplattiert und morphologische Veränderungen der aus dem Sphäroid herauswachsenden Zellen mittels Aviso CellCelector™ dokumentiert (10-fache und 20-fache Vergrößerung). Deutlich erkennbar wird hier die Veränderung der Morphologie von vormals spindelförmigen zu runden, nahezu epithelialen Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Fraglich war nun, ob es sich bei diesen Veränderungen um kurzfristige Phänomene handelte oder ob sie über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden konnten. Daher wurden ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide des zweiten (U373) bzw. des dritten Behandlungszyklus (A172) ausplattiert und über mehrere Tage beobachtet. Die zuvor detektierten Veränderungen erwiesen sich, zumindest in abgeschwächter Form, über einen Zeitraum von mindestens 10 Tagen als stabil. Die Zellen der Linie U373 stellten sich nun nicht mehr vollständig rund bis kubisch dar, zeigten aber dennoch eine völlig veränderte Morphologie verglichen mit der Ausgangszellpopulation bzw. den entsprechenden Kontrollzellen. Auch in den Zellen der Linie A172 konnten die zuvor beschriebenen Veränderungen („rundliche“ Morphologie und Zurückbildung der länglichen Ausläufer) über einen längeren Zeitraum detektiert werden. Anhand der Abbildung 3.10 können diese stabilen Veränderungen nachvollzogen werden.

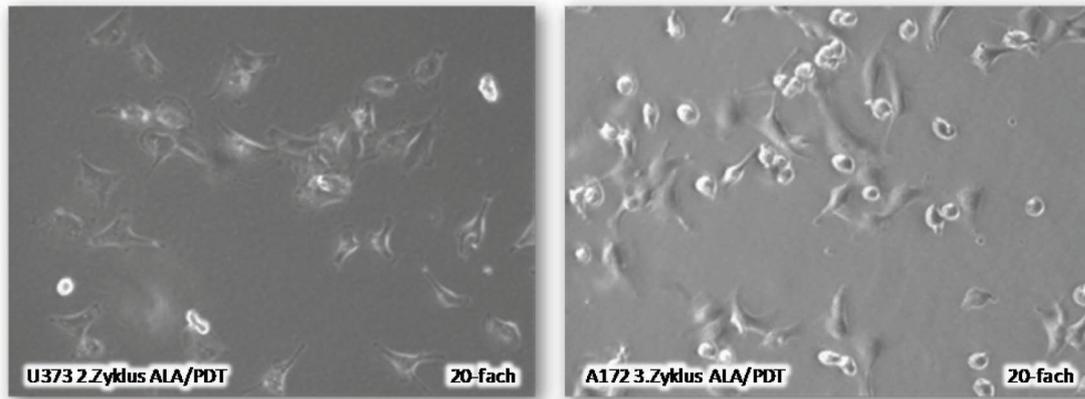


Abbildung 3.10: Stabile morphologische Veränderungen nach ALA/PDT-Behandlung. Nach repetitiven ALA/PDT-Behandlungszyklen von U373- und A172-Sphäroiden konnten über einen längeren Zeitraum (mindestens zehn Tage) die zuvor beschriebenen morphologischen Veränderungen (Abrundung des Zellkörpers, Rückbildung der Ausläufer) für U373- und A172-Zellen, die aus dem Sphäroid herausgewachsen sind, nachgewiesen werden.

3.3.2 ALA/PDT-vermittelte Modifikation der Cadherin-Expression in Gliomsphäroiden

Im Rahmen der Morphologie-Studien nach ALA/PDT-Behandlung zeigte sich vor allem in Zellen der Linie U373 eine deutliche Veränderung von spindelförmigen Zellen zu Zellen mit epithelalem Charakter (vgl. Abschnitt 3.3.1).

In wieweit die Expression des Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin, charakteristisch für epitheliale Zellen, beeinflusst wird, sollten weiterführende Analysen klären. Zu diesem Zweck wurden Tumorsphäroide der Zelllinien U87 und U373 einer ALA/PDT-Behandlung unterzogen und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Unbehandelte Sphäroide der jeweiligen Linie dienten als Kontrolle. Als Maß für die Expressionsdichte wurde die mittlere Fluoreszenzintensität herangezogen, die durchflusszytometrisch ermittelt wurde.

Wie aus Abbildung 3.11 ersichtlich wird, exprimierten unbehandelte U87-Sphäroide E-Cadherin. Eine ALA/PDT-Behandlung der Tumorsphäroide induzierte eine gesteigerte Expression von E-Cadherin (A). Unbehandelte Sphäroide zeigten eine durchschnittliche Expression des Zell-Adhäsionsmoleküls von 904.0 ± 261.7 für eine Messreihe von vier unabhängigen Experimenten. Nach einer Behandlung der Zellen mit ALA/PDT konnte ein signifikanter Anstieg ($p=0,0251$) der MFI auf 2665 ± 532.9 (für $n=4$) verzeichnet werden (B).

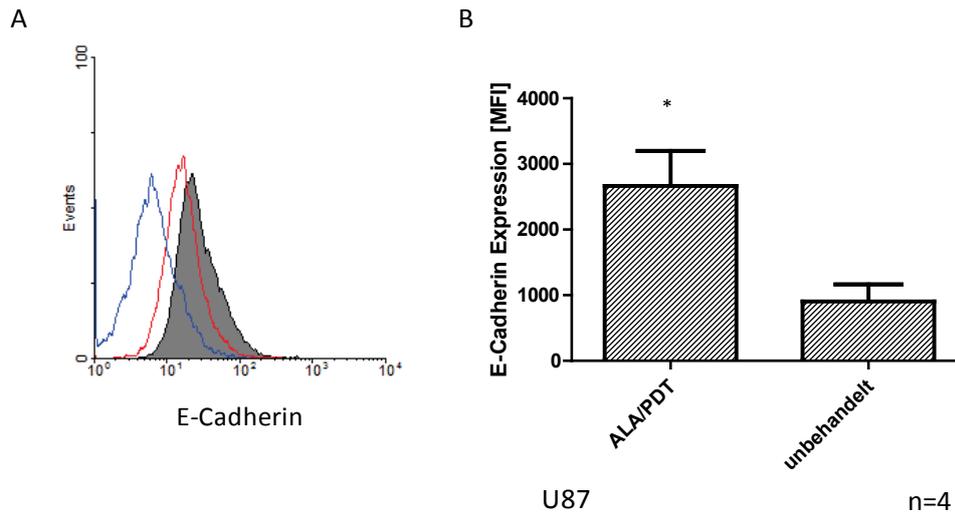


Abbildung 3.11: E-Cadherin-Expression der Gliomsphäroide der Linie U87. Dargestellt sind die Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Analyse nach ALA/PDT-Behandlung von U87-Sphäroiden (A) sowie die graphische Zusammenfassung der vier durchgeführten unabhängigen Experimente (B). Das graue Histogramm veranschaulicht die Expression der ALA/PDT-behandelten Zellen, rot die unbehandelten Kontrollzellen und blau ist die Isotypkontrolle, die der Negativkontrolle entspricht. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n=4. Statistische Signifikanz wird angezeigt durch: *- $p \leq 0,05$.

Vergleichbare Daten ergaben sich nach einer durchflusszytometrischen Analyse der Tumorsphäroide der Zelllinie U373. Die Abbildung 3.12 zeigt eine exemplarische durchflusszytometrische Analyse dargestellt als Histogramm sowie eine Auswertung der vier durchgeführten Experimente über den MFI-Wert. Unbehandelte Zellen zeigten keine E-Cadherin-Expression (MFI-PE: $342,0 \pm 47,08$; n=4; $p=0,0974$). Deutlich erkennbar ist auch hier der Trend für eine Zunahme der E-Cadherin-Expression nach ALA/PDT-Behandlung der Zellen (MFI-PE: 623.5 ± 135.5 ; n=4; $p=0,0974$).

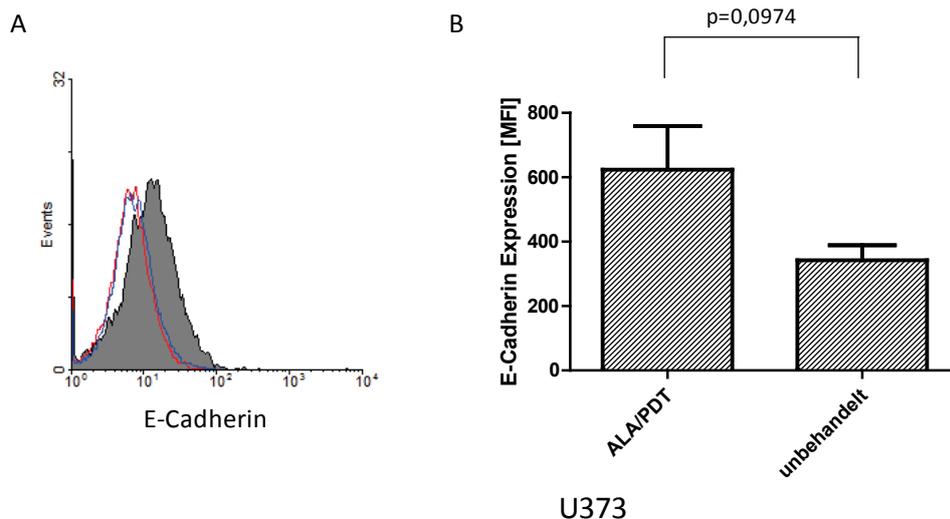


Abbildung 3.12: E-Cadherin-Expression der U373-Tumorsphäroide. Dargestellt sind die Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Analyse nach ALA/PDT-Behandlung von U373-Sphäroiden (A) sowie die graphische Zusammenfassung der vier durchgeführten unabhängigen Experimente (B). Das graue Histogramm veranschaulicht die Expression der ALA/PDT-behandelten Zellen, rot die unbehandelten Kontrollzellen und blau ist die Isotypkontrolle, die der Negativkontrolle entspricht. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n=4.

Zusammenfassend konnte nun gesagt werden, dass eine ALA/PDT-Behandlung der Gliomsphäroide einen deutlichen Anstieg der E-Cadherin-Expression induzierte. In einem weiteren Schritt sollte daher geklärt werden, ob zusätzliche Marker, die im Kontext einer EMT, einer Epithelialen-Mesenchymalen Transition verändert auftreten, durch eine Photodynamische Therapie modifiziert werden. Dazu zählen neben dem zuvor analysierten E-Cadherin auch N-Cadherin sowie Vimentin, dieses ist ein Zytoskelettprotein mesenchymaler Zellen. Fraglich war nämlich, ob durch eine ALA/PDT-Behandlung ein umgekehrter Prozess stattfindet, das heißt eine MET (Mesenchymale-Epitheliale Transition). Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurden diese Parameter bestimmt. Als Zelllinie wurde hierfür U373 gewählt, da in dieser Linie die morphologischen Veränderungen am stärksten ausgeprägt waren (vgl. Abschnitt 3.4). Wie aus Abbildung 3.13 entnommen werden kann, exprimierten unbehandelte U373-Zellen sowohl Vimentin als auch N-Cadherin. Eine signifikante Veränderung der Expression nach ALA/PDT-Behandlung konnte nicht detektiert werden.

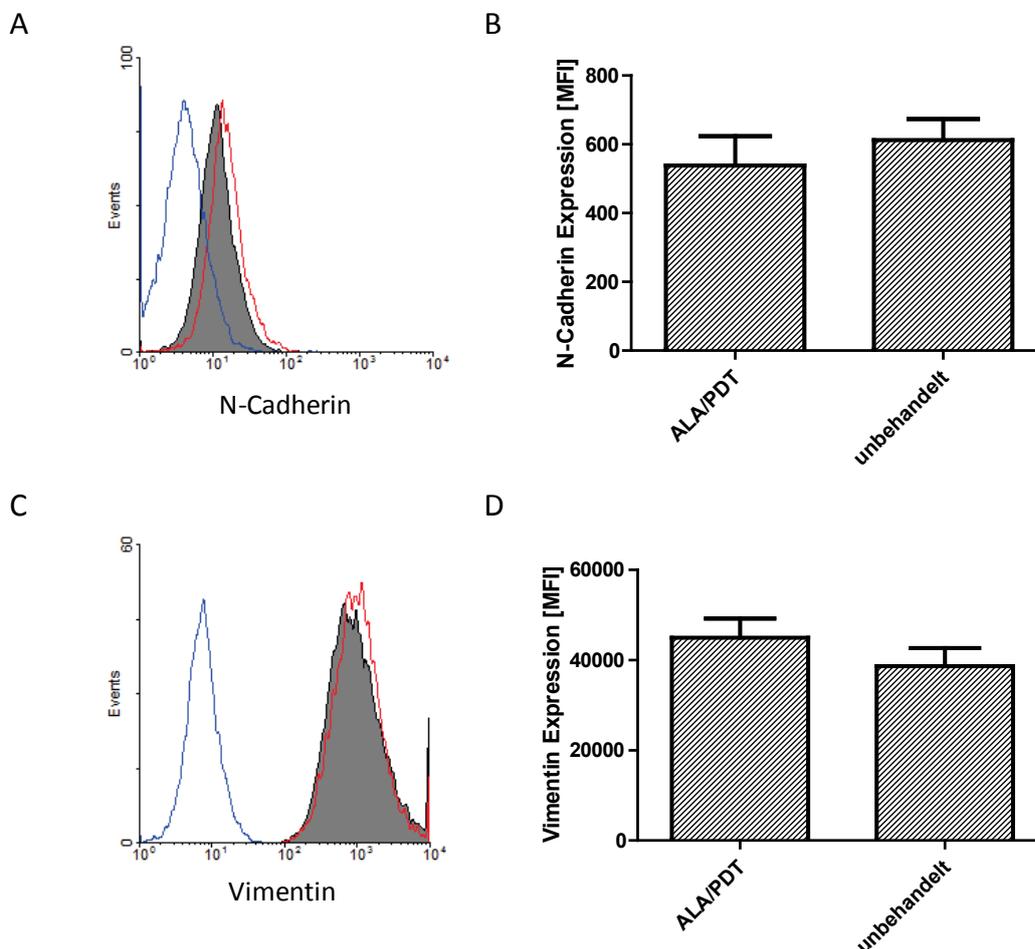


Abbildung 3.13: N-Cadherin- und Vimentin-Expression nach Photodynamischer Therapie. Dargestellt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen nach ALA/PDT-Behandlung von U373-Sphäroiden sowie die graphische Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm SEM für $n=3$) für N-Cadherin (A, B) und Vimentin (C, D). Die grauen Histogramme veranschaulichen die Expression der ALA/PDT-behandelten Sphäroide, rot die unbehandelten Kontrollsphäroide und blau die Isotypkontrollen.

3.3.3 Induktion einer Zytoskelett-Neuorganisation nach ALA/PDT-Behandlung in Gliomsphäroiden

Inwieweit neben den nachgewiesenen Veränderungen der Morphologie auch eine Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch ALA/PDT induziert wird, mussten weiterführende Analysen klären. Eine Anfärbung des Zytoskeletts von ALA/PDT-behandelten sowie unbehandelten Zellen der Linien A172 und U373 mit einem FITC-gekoppelten Phalloidin sollte darüber Aufschluss geben.

Eine Photodynamische Behandlung der Tumorsphäroide mit ALA/PDT induzierte nachweislich Veränderungen des Zytoskeletts. Unbehandelte Zellen der Linie A172 zeigten eine verstärkte Aktinanfärbung an den auslaufenden Enden der Zellen, den sogenannten „Growth Cones“. Nach einer ALA/PDT-Behandlung der Zellen kam es zu einer Neuorganisation des Zytoskeletts und einer damit einhergehenden Reduktion der Aktin-Anteile in den Growth Cones. Abbildung 3.14 veranschaulicht diese Beobachtungen.

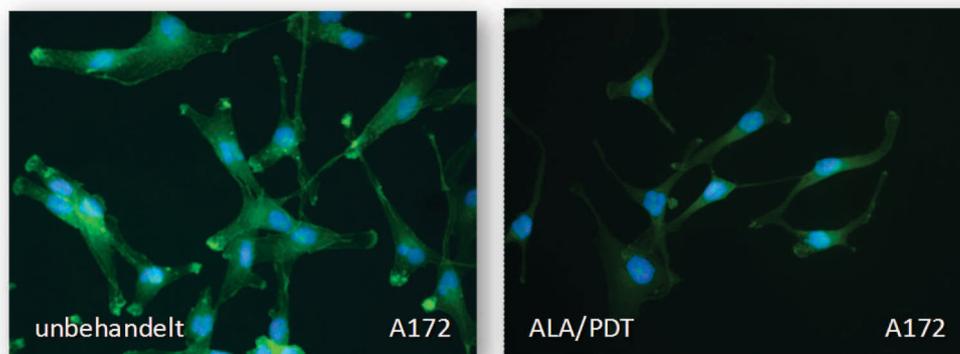


Abbildung 3.14: Umorganisation des Aktinzytoskeletts nach Photodynamischer Therapie. Unbehandelte und ALA/PDT-behandelte A172-Sphäroide wurden auf einem Deckgläschen ausplattiert. Nach dem Herauswachsen der überlebenden Zellen aus dem Sphäroid, erfolgte die Anfärbung des Zytoskeletts mit einem FITC-gekoppelten Phalloidin und die fluoreszenzmikroskopische Analyse (20-fache Vergrößerung). Deutlich nachweisbar ist hier die verstärkte Aktinanfärbung an den auslaufenden Enden der unbehandelten A172-Zellen, den sogenannten „Growth Cones“. Diese sind nach ALA/PDT-Behandlung durch Umstrukturierungen des Zytoskeletts nicht mehr nachweisbar. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis drei unabhängiger Experimente.

Besonders deutlich wurden die durch die Behandlung erzeugten Effekte in der Zelllinie U373. Hier schien eine vollständige Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts statt zu finden. Die vormals spindelförmigen Zellen zeigten sowohl eine veränderte Strukturierung des Aktins innerhalb der Zelle, als auch eine damit einhergehenden Veränderung der Morphologie. Dieses geht aus Abbildung 3.15 hervor.

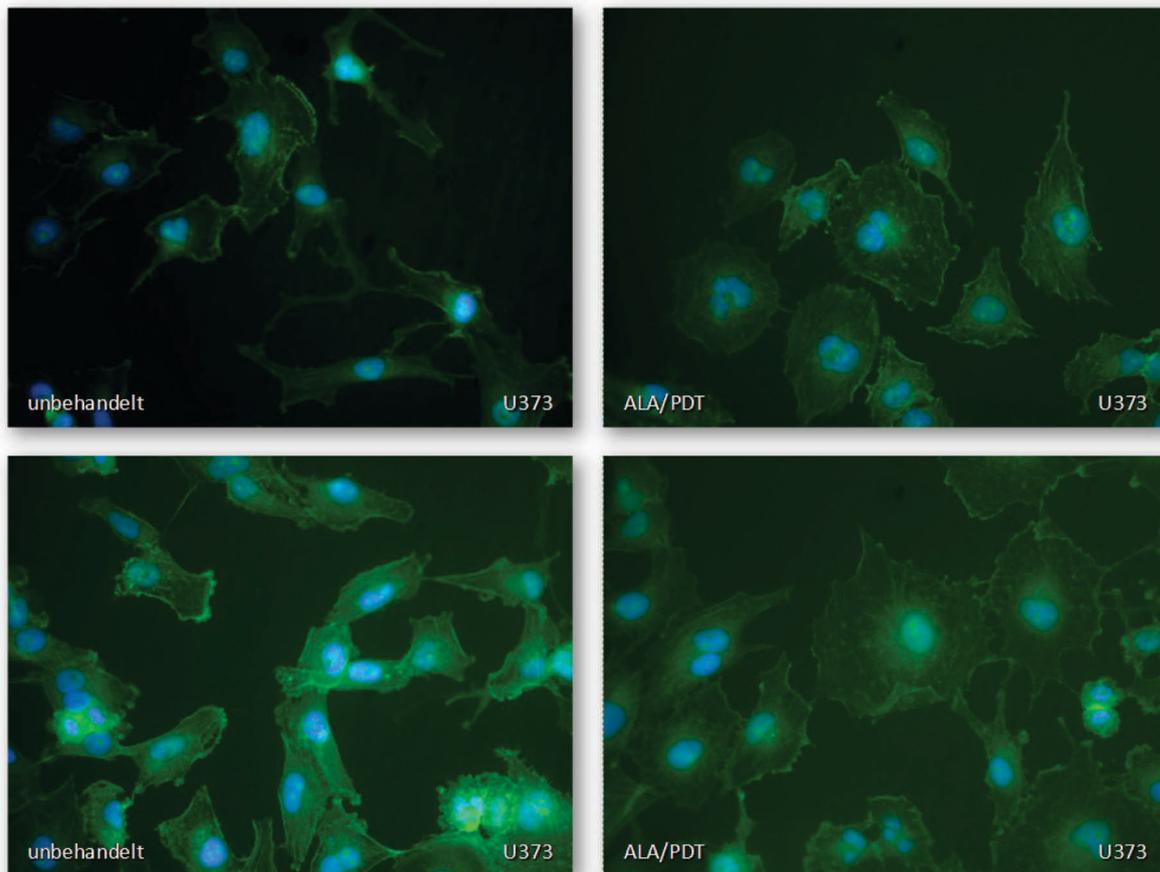


Abbildung 3.15: Umorganisation des Aktinzytoskeletts infolge einer ALA/PDT-Behandlung. Unbehandelte und ALA/PDT-behandelte U373-Sphäroide wurden auf einem Deckgläschen ausplattiert. Nach dem Herauswachsen der überlebenden Zellen aus dem Sphäroid, erfolgte die Anfärbung des Zytoskeletts mit einem FITC-gekoppelten Phalloidin und die fluoreszenzmikroskopische Analyse (40-fache Vergrößerung). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis drei unabhängiger Experimente.

3.3.4 Expression von Matrix Metalloproteinasen in Glioblastomzellen

Möglicherweise stehen die Hemmung der Zellmigration und der an anderer Stelle beobachtete Rückgang der Invasivität [147] auch in direktem Zusammenhang mit einer veränderten Expression der Matrix Metalloproteinasen (MMP) in den Sphäroidzellen. Diese stellen die größte Gruppe der ECM-degradierenden Enzyme dar und sind unmittelbar mit Invasionsprozessen assoziiert. Zunächst einmal konnte mit Hilfe der RT-PCR ein Gesamtüberblick über das Expressionsmuster von MMPs in Glioblastomzellen der Linie A172 erhalten werden.

Nachweisbar waren folgende MMPs in unbehandelten Zellen der Zelllinie A172: MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -11, -12, -13 und -19 sowie die Metalloprotease Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2. Diese Ergebnisse bestätigten sich in drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Nach einer Behandlung mit ALA/PDT und sofortiger RNA-Isolierung zeigte sich ein gleiches Expressionsmuster wie in unbehandelten Zellen (Daten nicht gezeigt). Deswegen wurden für weitere Analysen RNA-Proben verwendet, die aus Zellen gewonnen wurden, die drei Behandlungszyklen durchlaufen hatten. Damit sollten durch die Behandlung veränderte Zellen angereichert werden.

Hier zeigte sich ein verändertes Expressionsmuster – die Matrix Metalloproteinasen 7 und 8 wurden herunter reguliert und konnten in keinem der drei unabhängigen Experimente detektiert werden. Abbildung 3.16 veranschaulicht diese Ergebnisse exemplarisch.

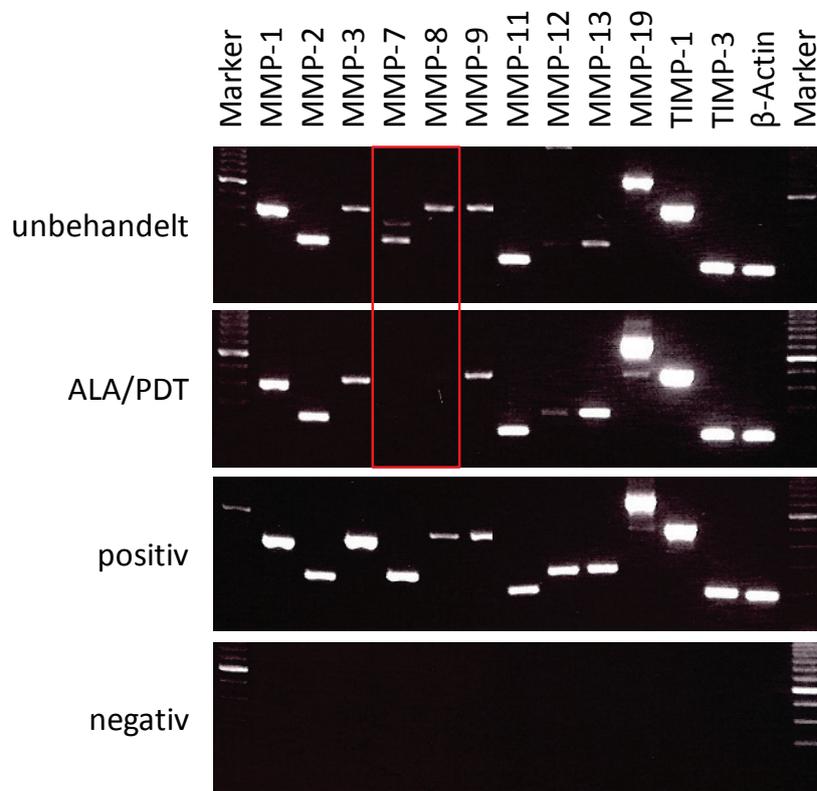


Abbildung 3.16: Expressionsprofil der Matrix Metalloproteinasen in Gliomsphäroiden der Linie A172. Die Analyse der mRNA-Expression der einzelnen MMPs und TIMPs in unbehandelten und ALA/PDT-behandelten A172-Sphäroiden erfolgte durch RT-PCR, gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte und ihren Nachweis durch Ethidiumbromidfärbung. Als Positivkontrolle dienten U87-Zellen, das mitgeführte House-Keeping-Gen war β -Aktin. Als Negativkontrolle wurde eine –RT mitgeführt, d.h. eine reverse Transkriptionsreaktion, bei der nur das Enzym fehlte. Diese Ergebnisse konnten in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Im Anschluss wurde diese Versuchsreihe für Sphäroide der Zelllinie U373 wiederholt. Hierbei erfolgte die RNA-Isolierung aus ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden des 3. Behandlungszyklus und un-behandelten Kontrollsphäroiden. Auch für diese Linie zeigte sich ein breites Spektrum exprimierter Matrix Metalloproteinasen in unbehandelten Tumorsphäroiden. Nachweisbar waren MMP-1, -2, -3, -7, -8, -11, -13 und -19 sowie TIMP-1 und TIMP-2. Im Vergleich zu der Linie A172 konnte jedoch für U373 zu keiner Zeit eine Expression der MMPs -9 und -12 nachgewiesen werden. Eine ALA/PDT-Behandlung der Sphäroide induzierte eine Veränderung des Expressionsmusters der MMPs. Wie zuvor in der Linie A172 gesehen, konnte auch hier eine vollständige Herunterregulation von MMP-7 und MMP-8 verzeichnet werden. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse für die Linie U373 zeigt Abbildung 3.17.

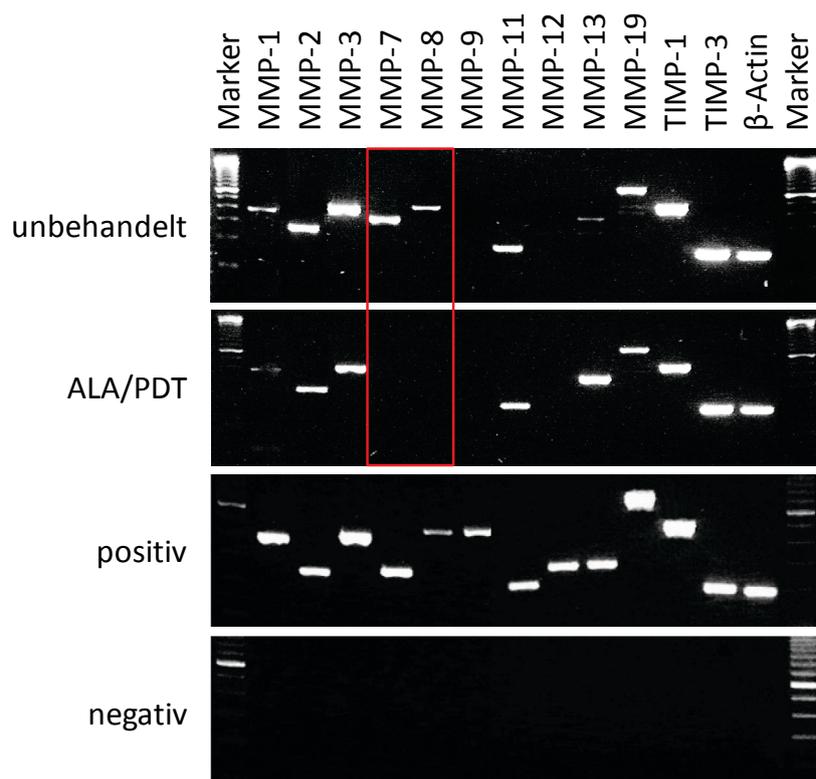


Abbildung 3.17: Expressionsprofil der Matrix Metalloproteinasen in U373-Sphäroiden. Die Analyse der mRNA-Expression der einzelnen MMPs und TIMPs in unbehandelten und ALA/PDT-behandelten U373-Sphäroiden erfolgte durch RT-PCR, gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte und ihren Nachweis durch Ethidiumbromidfärbung. Als Positivkontrolle dienten U87-Zellen, das mitgeführte House-Keeping-Gen war β -Aktin. Als Negativkontrolle wurde eine –RT mitgeführt, d.h. eine reverse Transkriptionsreaktion, bei der nur das Enzym fehlte. Diese Ergebnisse konnten in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

3.3.5 Integrine

Da Zelladhäsionsproteine maßgeblich an einer Tumorzellinvasion beteiligt sind, rückten diese in den Fokus weiterer Analysen. Der Schwerpunkt lag hier auf den Integrinen beta-1 (CD29), alpha-2 (CD49b), alpha-6 (CD49f) und CD44, einem Glykoprotein, das an Zell-Zellinteraktionen, Zell-Adhäsion und Zell-Migration beteiligt ist. Unbehandelte sowie ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide der Zelllinien U251 und U87 wurden im Hinblick auf die Expression dieser Moleküle durchflusszytometrisch analysiert. Als Maß für die Expressionsdichte des jeweiligen Moleküls diente die MFI.

Abbildung 3.18 stellt ein Einzelergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der Tumorsphäroide der Linie U251 dar. Jedes der untersuchten Moleküle, CD29, CD44, CD49b und CD49f, wird auf U251-Zellen exprimiert. Die CD29-Expression der ALA/PDT-behandelten Sphäroide liegt auf einem vergleichbaren Niveau, wie die Expression auf unbehandelten Vergleichszellen (siehe A). Die Expression der Moleküle CD44 und CD49b scheint im Rahmen dieses Einzelversuchs durch die ALA/PDT-Behandlung leicht herunterreguliert zu werden (siehe B und C). Für die Expressionsdichte des Moleküls CD49f hingegen kann eine geringfügige Hochregulation durch ALA/PDT-Behandlung verzeichnet werden.

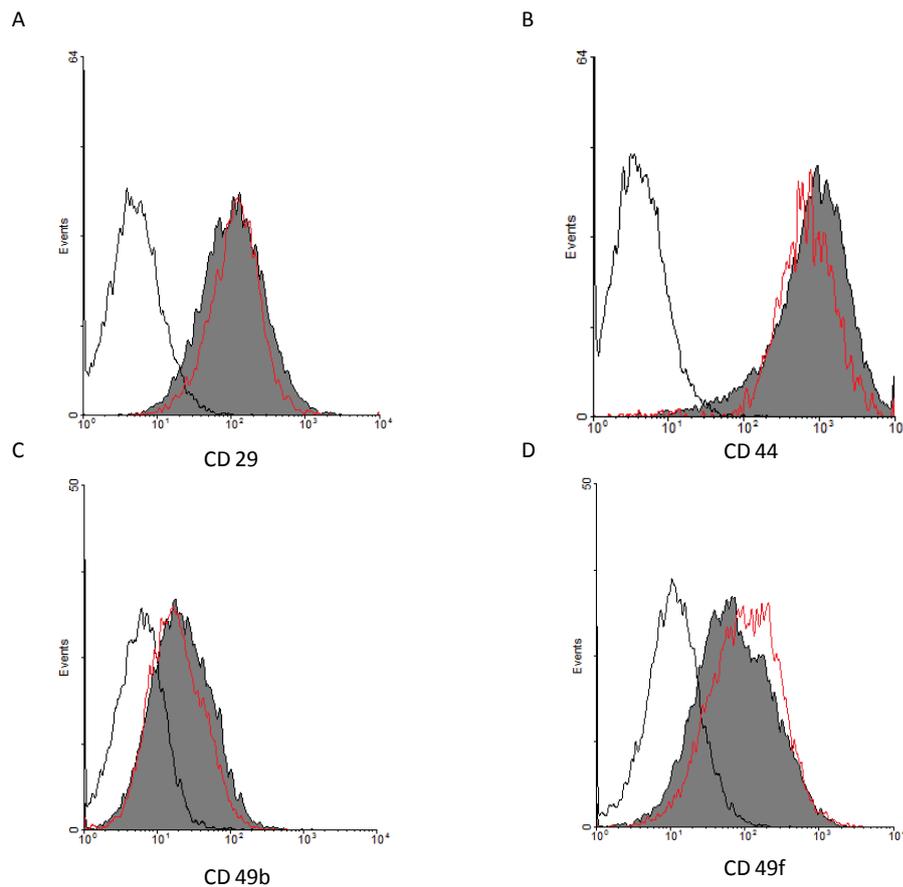


Abbildung 3.18: Expression verschiedener Integrine auf U251-Sphäroiden. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse der Moleküle CD29, CD44, CD49b und CD49f auf Gliomsphäroiden der Zelllinie U251. Das graue Histogramm veranschaulicht die Expression auf unbehandelten Sphäroiden, rot dargestellt sind ALA/PDT-behandelte Sphäroide und das schwarze Histogramm repräsentiert die Isotypkontrolle.

Abbildung 3.19 fasst die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten für die Zelllinie U251 graphisch zusammen. Die ALA/PDT-Behandlung der Tumorsphäroide induzierte keine signifikante Veränderung des Expressionsmusters der analysierten Integrine. Die zuvor beschriebenen geringfügigen Veränderungen zeigten sich als nicht repräsentativ.

Die mittlere Fluoreszenzintensität der Expression des CD29 Proteins der unbehandelten Sphäroide lag bei $4196 \pm 243,2$; $n=3$. Diese war nicht signifikant verschieden von der MFI-FITC bei ALA/PDT-behandelten Sphäroiden ($3515 \pm 358,7$; $n=3$). Ähnlich stellten sich die Werte der übrigen Proteine dar. Hier ergaben sich Werte für CD44 von 46670 ± 6166 ; $n=3$ (MFI-FITC; unbehandelte Sphäroide) gegenüber von 50970 ± 12640 ; $n=3$ (MFI-FITC; ALA/PDT-behandelte Sphäroide). Für CD49b und CD49f ergaben sich Werte von $931,7 \pm 21,76$; $n=3$ (MFI-FITC; CD49b; unbehandelte Sphäroide) gegenüber $836,7 \pm 235,6$; $n=3$ (MFI-FITC; CD49b; ALA/PDT-behandelte Sphäroide) sowie 4635 ± 1065 ; $n=3$ (MFI-PE; CD49f; unbehandelte Sphäroide) gegenüber $5227 \pm 250,8$; $n=3$ (MFI-PE; CD49f; ALA/PDT-behandelte Sphäroide).

Ebenfalls konnten keine signifikanten Veränderungen der Expressionsdichte der Proteine bei der Analyse der Tumorsphäroide der Zelllinie U87 nachgewiesen werden. Abbildung 3.20 veranschaulicht diese Daten.

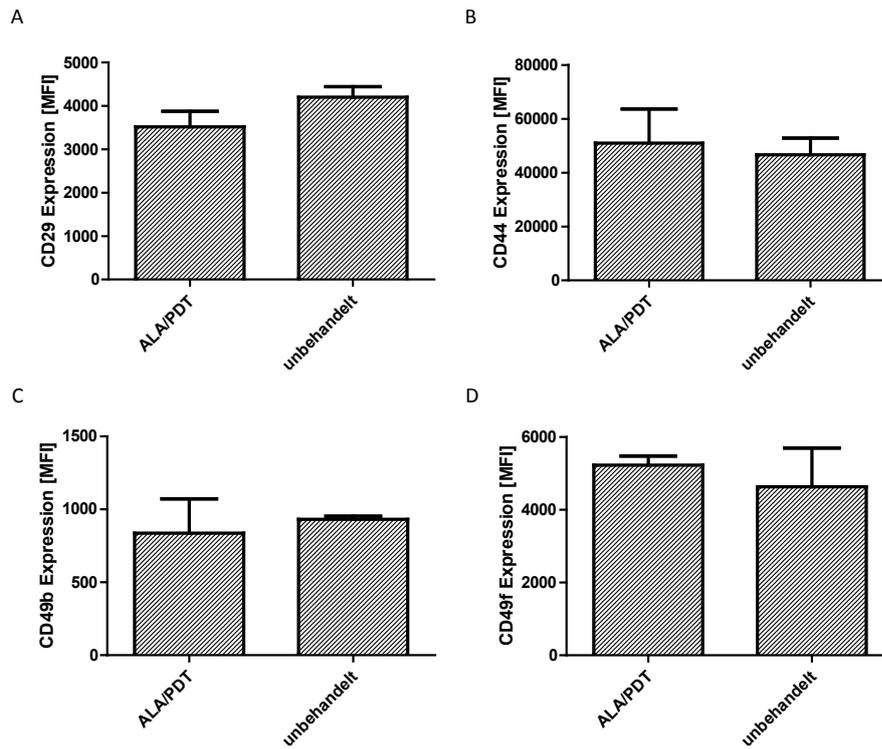


Abbildung 3.19: Expressionsprofil unterschiedlicher Zelladhäsionsmoleküle auf U251-Tumorsphäroiden. Durch eine durchflusszytometrische Analyse wurde die Expression der Moleküle CD29 (A), CD44 (B), CD49b (C) und CD49f (D) auf Gliomsphäroiden der Linie U251 bestimmt. Dargestellt ist die Zusammenfassung drei unabhängiger Einzelerperimente. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n=3$.

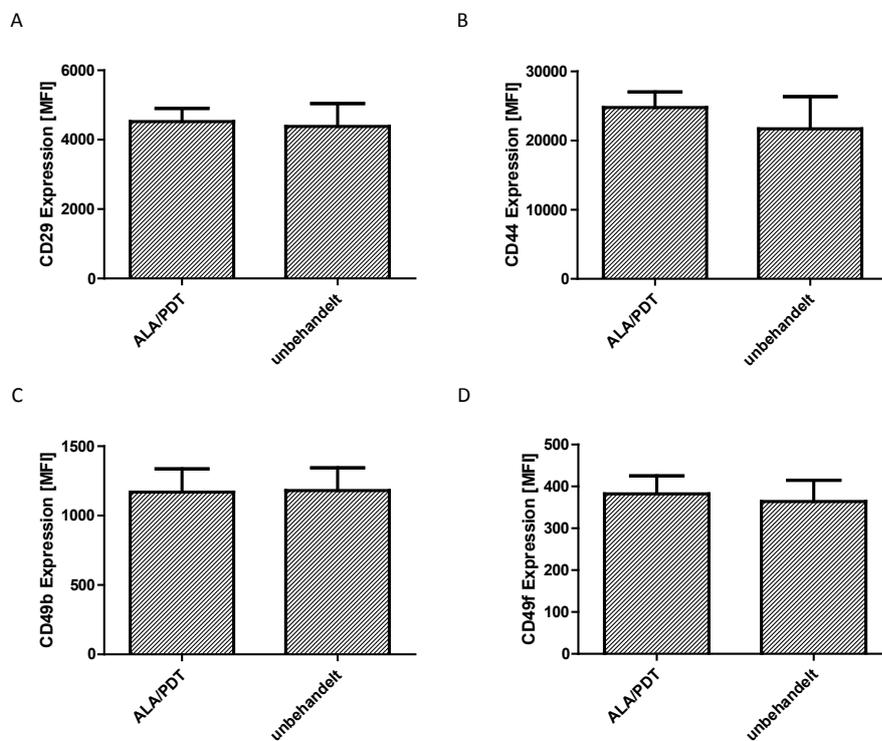


Abbildung 3.20: Expressionsprofil von unterschiedlichen Zelladhäsionsmoleküle auf U87-Gliomsphäroiden. Durch eine durchflusszytometrische Analyse wurde die Expression der Moleküle CD29 (A),

CD44 (B), CD49b (C) und CD49f (D) auf Gliomsphäroiden der Linie U87 bestimmt. Dargestellt ist die Zusammenfassung vier unabhängiger Einzelexperimente. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n=4$.

3.4 Das immunogene Potential der Photodynamischen Therapie

Neben den direkten zellschädigenden Effekten und den Auswirkungen auf die Migrationsfähigkeit, die in den letzten Kapiteln beschrieben wurden, hat die Photodynamische Therapie vermutlich auch immunologische Konsequenzen. Die Induktion einer anti-tumoralen Immunantwort durch PDT wäre ein mehrstufiger Prozess, der in Abbildung 3.21 anschaulich zusammengefasst wird.

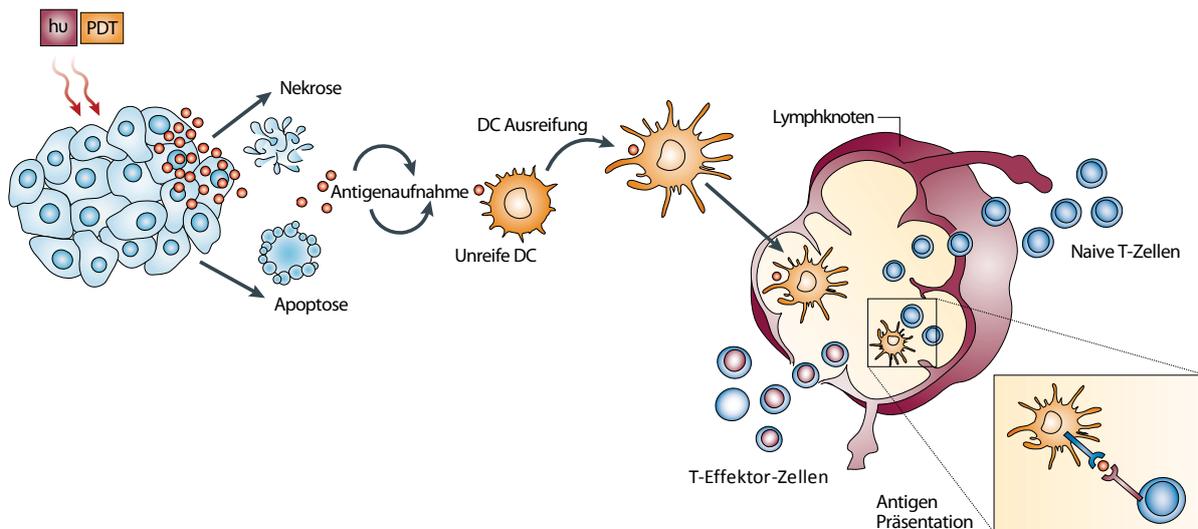


Abbildung 3.21: Induktion einer anti-tumoralen Immunantwort nach PDT. (Abbildung modifiziert nach Castano et al. [148])

Initiiert würde diese komplexe Kaskade durch direkte Schädigung der Zellen durch Apoptose und/oder Nekrose. Eine Migration unreifer Dendritischer Zellen zum Ort des Geschehens sowie die Aufnahme von Tumorantigenen von den geschädigten Zellen durch die unreifen Dendritische Zellen und deren Ausreifung müssten sich anschließen. Dieses ginge einher mit einer Migration der Dendritischen Zellen in einen nahegelegenen Lymphknoten, für das Gehirn die zervikalen Lymphknoten, gefolgt von einer dortigen Stimulation der antigenspezifischen T-Zellen. Sollte unsere Hypothese, dass ALA/PDT eine anti-tumorale Immunantwort gegen Glioblastomzellen initiiert, sich als zutreffend erweisen, so müssten diese Schritte durch die ALA/PDT-Behandlung induziert werden. Weiterführende Analysen sollten daher Aufschluss darüber bringen, ob eine ALA/PDT ein solches immunogenes Potential besitzt.

3.4.1 ROS-Bildung durch ALA/PDT-Behandlung

Das Prinzip der Photodynamischen Therapie beruht, wie bereits beschrieben, auf der selektiven Anreicherung eines Photosensitizers in den Zellen und der Bestrahlung dieser Zellen mit Licht definierter Wellenlänge. In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff in der Zelle wird eine photochemische Reaktion initiiert, in deren Verlauf hochreaktiver Singulett-Sauerstoff oder andere hochreaktive Sau-

erstoffspezies (ROS) gebildet werden. Diese sind maßgeblich an der direkten Zellschädigung und der damit einhergehenden Zytotoxizität beteiligt. Initiale Analysen sollten klären, ob durch die ALA/PDT-Behandlung von Gliomsphäroiden ROS gebildet werden.

Daher erfolgte eine ALA/PDT-Behandlung von Tumorsphäroiden der Linien U87, U251 und U373. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte Zellen der jeweiligen Zelllinie. Nach einer vierstündigen Inkubation mit ALA erfolgte jedoch vor der Bestrahlung der Zellen eine Anfärbung der Sphäroide mit 2,7-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat, einem zellpermeablen Substrat, das sich für eine fluorimetrische Detektion von ROS eignet. Nach Anfärbung und Bestrahlung der Sphäroide erfolgte eine sofortige durchflusszytometrische Analyse der Zellen.

Wie aus Abbildung 3.22 ersichtlich wird, kann eine ALA/PDT-Behandlung der Zellen die Bildung hochreaktiver Sauerstoffspezies in den Glioblastomsphäroidzellen induzieren. Unbehandelte Zellen (blaue Kurve) setzen geringe Mengen des Farbstoffes um, durch eine Photodynamische Therapie hingegen werden große Mengen an 2,7-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat umgesetzt und führen zu einer deutlich gesteigerten Fluoreszenz. Als Maß für die Fluoreszenz diente die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Die MFI-Werte der gebildeten ROS reichten in einem repräsentativen Experiment von 286 für unbehandelte Zellen der Linie U251 bis zu 1668 nach ALA/PDT-Behandlung. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für die Zelllinie U87 und U373. Hier reichten die ermittelten Werte von 515 (U87) und 56 (U373) für unbehandelte Sphäroide bis hin zu 1116 (U87) und 624 (U373) nach einer ALA/PDT-Behandlung der Zellen. Die Daten für die Zelllinie U87 wurden nicht graphisch dargestellt.

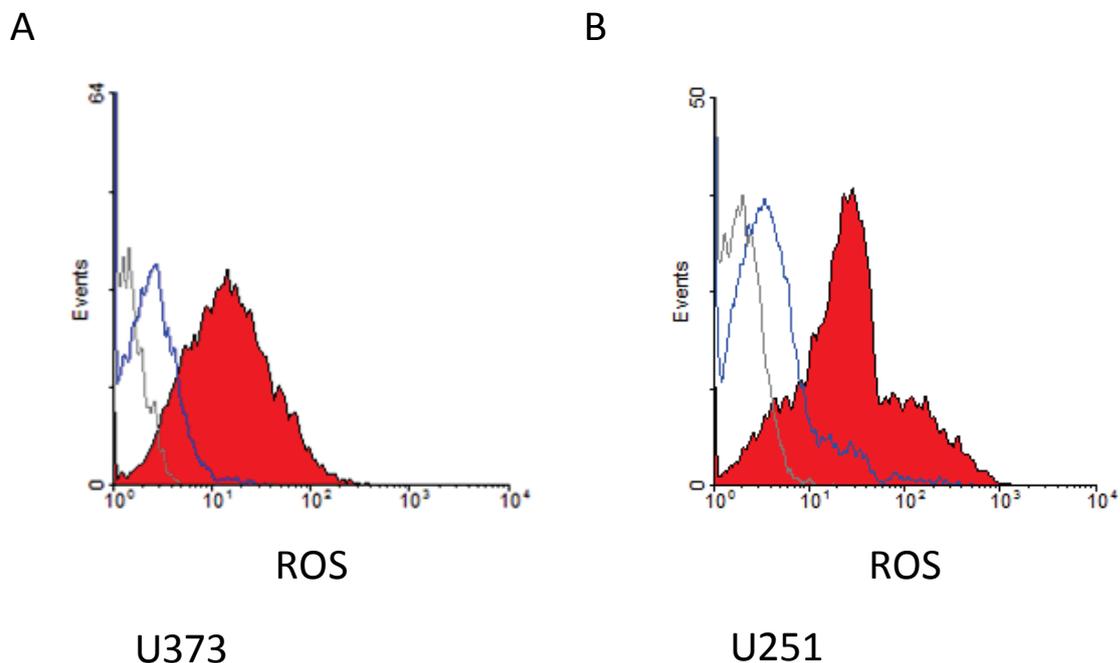


Abbildung 3.22: Induktion von ROS in Tumorsphäroiden als Konsequenz einer Photodynamischen Therapie. Unbehandelte und ALA/PDT-behandelte Sphäroide der Zelllinien U373 (A) und U251 (B) wurden mit dem Indikator für eine ROS-Bildung (2,7-Dichlorodihydrofluorescein) angefärbt, bestrahlt und die ROS-abhängige Bildung eines grünen Fluoreszenzfarbstoffes durchflusszytometrisch nachgewiesen. Rot dargestellt ist der ROS-Gehalt ALA/PDT-behandelter Zellen, blau repräsentiert den ROS-Gehalt unbehandelter Zellen und grau stellt ungefärbte Zellen dar.

3.4.2 Induktion zellschädigender Prozesse durch ALA/PDT in Gliomzellen

Da gezeigt werden konnte, dass durch eine ALA/PDT-Behandlung der Gliomsphäroide ROS generiert werden, schloss sich folglich die Frage an, ob diese ROS unmittelbar auf die Zellen einwirken und zu direkten Zellschäden in Form von Apoptose oder Nekrose führen.

Aus diesem Grund erfolgte eine Färbung ALA/PDT-behandelter Tumorsphäroide der Linien U87, U251 und U373 mit Annexin-V-FITC und Propidiumiodid, um den Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen zu bestimmen.

Wie aus Abbildung 3.23 anhand eines exemplarischen Experiments für die Zelllinien U373 (A), U87 (B) und U251 (C) ersichtlich wird, führen die durch ALA/PDT-Behandlung generierten ROS zu einer direkten Schädigung der Zellen. Es konnte für alle Zellen nekrotischer Zelltod nachgewiesen werden. Die ermittelten Werte für nekrotische Zellen nach einer ALA/PDT-Behandlung betragen 58,9 % für Zellen der Linie U373, 46,9 % für U87-Zellen sowie 49,3 % für U251-Zellen.

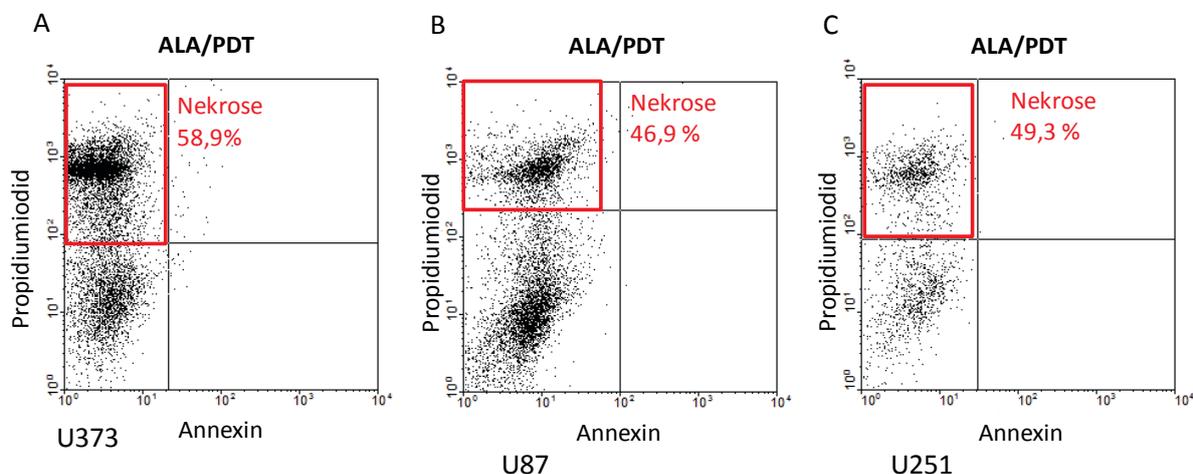


Abbildung 3.23: Nachweis nekrotischer Zellen. ALA/PDT-behandelte Sphäroide der Zelllinien U373 (A), U87 (B) und U251 (C) wurden mit einem Annexin-V-spezifischen Antikörper und Propidiumiodid angefärbt und nekrotische und apoptotische Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt ist der Dotplot je eines repräsentativen Einzelergebnisses der jeweiligen Zelllinie (n=3), die Quadranten wurden entsprechend der Negativkontrolle gesetzt.

Abschließend kann festgehalten werden, dass durch eine ALA/PDT-Behandlung Zelltod in Glioblastomzellen induziert wird. Dabei können nekrotische Prozesse generiert werden, wodurch eine erste Voraussetzung für eine anti-tumorale Immunantwort erfüllt wird (vgl. Abbildung 3.24).

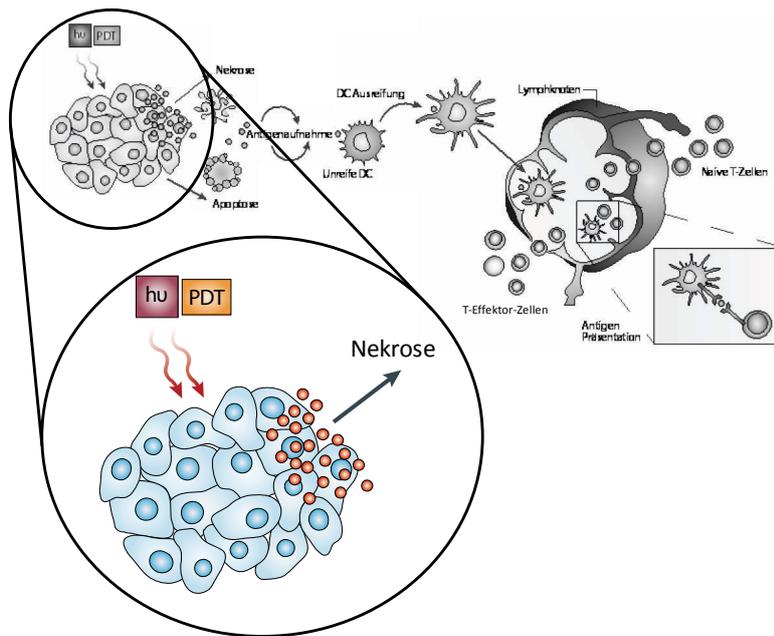


Abbildung 3.24: Zellschädigung durch Nekrose nach ALA/PDT-Behandlung als erster Schritt einer anti-tumoralen Immunantwort (Abbildung modifiziert nach Castano et al. [148]).

3.4.3 Ausreifung Dendritischer Zellen

Als Basis für zahlreiche Versuche dieser Arbeit dienten Monozyten sowie Dendritische Zellen in unterschiedlichen Ausreifungsstadien. Die Gewinnung der CD14 positiven Monozyten erfolgte über ein immunmagnetisches Isolationsverfahren aus mononukleären Zellen. Anschließend bildeten die Monozyten die Ausgangspopulation für eine Differenzierung zu unreifen (Tag 6) bzw. reifen Dendritischen Zellen (Tag 9).

Eine Überprüfung der Differenzierung und der Ausreifung erfolgte über die durchflusszytometrische Analyse spezifischer Oberflächenmarker. Monozyten (Tag 0) zeichnen sich durch die Expression des Oberflächenantigens CD14 aus. Unreife Dendritische Zellen (Tag 6) haben dieses Antigen weitestgehend herunter reguliert und exprimieren in der Regel noch nicht den spezifischen Ausreifungsmarker CD83. Reife Dendritische Zellen sind durch die Expression von CD83 charakterisiert.

Folglich ergeben sich die Expressionsmuster, welche in Tabelle 7 zusammengefasst wurden.

Tabelle 7: Charakteristische Marker auf Monozyten und Dendritischen Zellen

| Zelltyp | Expression CD14 | Expression CD83 |
|-------------------------------------|------------------------------|-----------------|
| Monozyten | positiv | negativ |
| Unreife Dendritische Zellen (Tag 6) | schwach positiv oder negativ | negativ |
| Reife Dendritische Zellen (Tag 9) | negativ | positiv |

Die Zellen wurden vor Einbringung in die jeweiligen Versuche durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenantigene CD14 und CD83 überprüft, um sicher zu stellen, dass die Monozyten bzw. Dendritischen Zellen dem gewünschten Reifungsstatus entsprachen.

Die Abbildung 3.25 zeigt exemplarisch den charakteristischen Verlauf einer Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen. An Tag 0 zeigt sich eine große Population CD14 positiver Zellen, bei denen es sich um Monozyten handelt. In den nächsten sechs Tagen regulieren die Zellen im Verlauf ihrer Differenzierung zu unreifen Dendritischen Zellen in Anwesenheit der Zytokine IL-4 und GM-CSF die Expression des CD14-Antigens nahezu vollständig herunter. Durch Zugabe eines Ausreifungsstimulus in Form des Tumornekrosefaktor-alpha werden im Verlauf weiterer drei Tage CD83 positive reife Dendritische Zellen generiert.

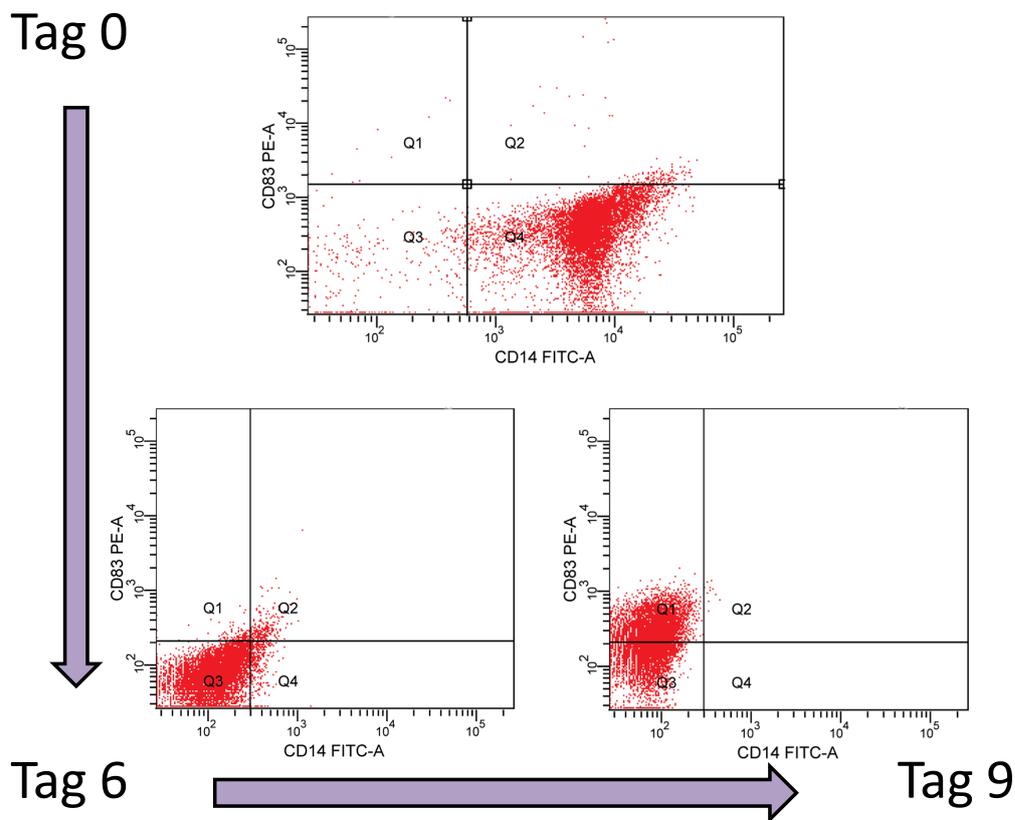


Abbildung 3.25: Expression der charakteristischen Oberflächenmarker CD14 und CD83 während der Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen. Monozyten (Tag 0) konnten in Gegenwart der Zytokine GM-CSF und IL-4 in einem 2-Phasenkulturverfahren über unreife DC (Tag 6) zu reifen DC (Tag 9) differenziert und ausgereift werden, wobei TNF- α als Reifungsstimulus zum Einsatz kam. An den Tagen 0, 6 und 9 erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Reifungsmarker CD14 und CD83. Anhand der Isotypenkontrolle konnte die Einstellung der Quadranten erfolgen.

3.4.4 ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide induzieren die Migration von unreifen Dendritischen Zellen

Der Nachweis einer möglichen Chemoattraktivität von Tumorsphäroiden auf Dendritische Zellen und ihrer damit einhergehenden gerichteten Migration, erfolgte mit Hilfe des TransWell-Migrationsassays.

Unreife Dendritische Zellen wurden hierfür in ein Transwell-Insert pipettiert. Diese Inserts wurden in die Wells einer 24-Well-Gewebekulturplatte eingehangen, die die jeweiligen Targets enthielten. Dieses waren zum einen unterschiedlich behandelte Tumorsphäroide der Zelllinien U87 und U251 (ALA/PDT; ALA; Bestrahlung; unbehandelt) und zum anderen das Chemokin CCL3 (40 ng/ml) als Positivkontrolle und CellGroDC-Medium als Negativkontrolle. Nach 16 Stunden Inkubation wurden die durch die Poren des Inserts migrierten Zellen ausgezählt. Abbildung 3.26 veranschaulicht diesen Versuchsansatz. Deutlich sind dort die migrierten Dendritischen Zellen zu erkennen.

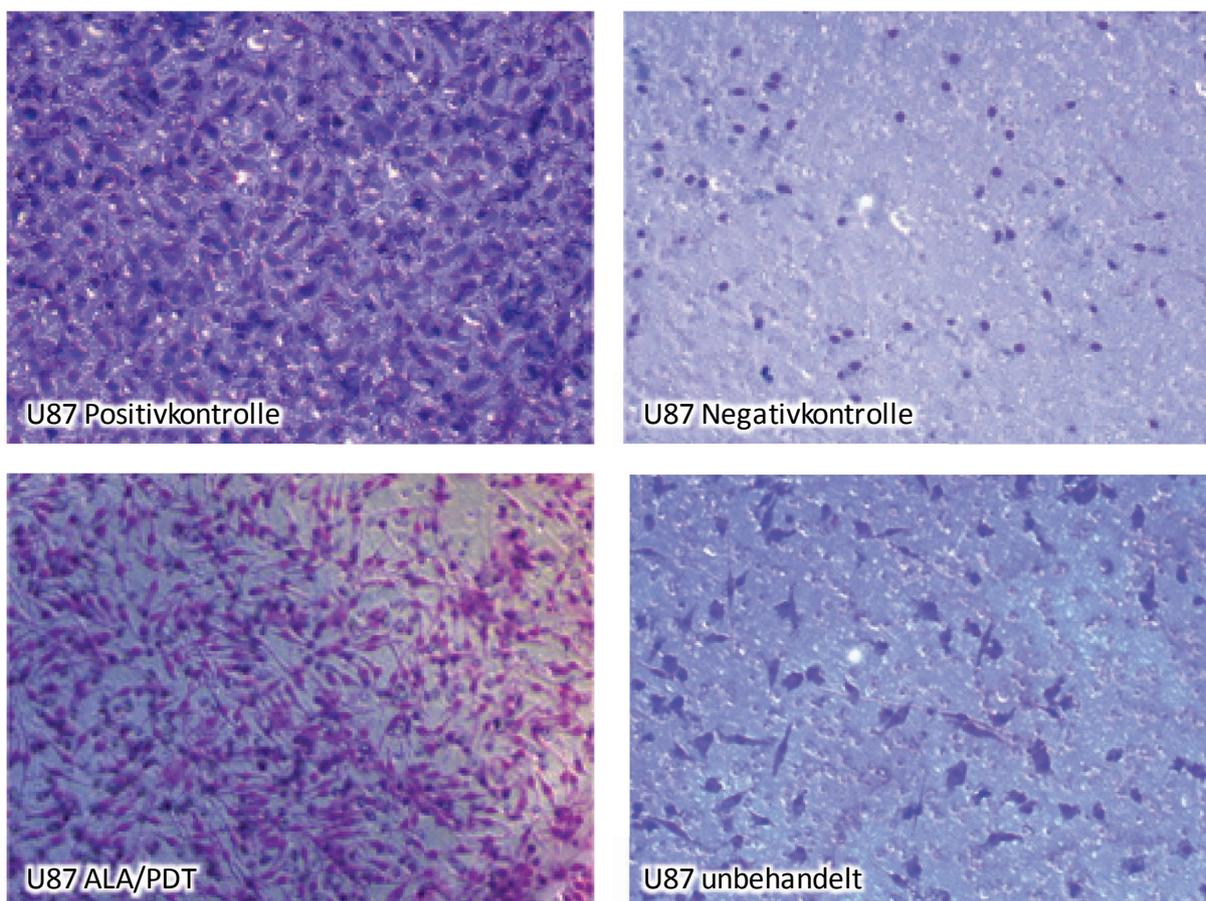


Abbildung 3.26: ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide induzieren die Migration von unreifen Dendritischen Zellen. Die Migration unreifer Dendritischer Zellen zu den unterschiedlichen Sphäroid-Präparationen der Zelllinie U87 wurde in einem Transwell-Assay untersucht. Nach 16 h wurden die Zellen, die sich an der Unterseite der Inserts befanden, d.h. vom Insert in Richtung Sphäroide migriert waren, ausgezählt. Als Positivkontrolle wurde das Chemokin CCL3 eingesetzt, als Negativkontrolle diente reines Kulturmedium. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis vier unabhängiger Experimente (10-fache Vergrößerung).

Abbildung 3.27 fasst die Ergebnisse für die Sphäroide der Zelllinien U251 und U87 zusammen. Herauszustellen ist hierbei, dass ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide beider Zelllinien chemoattraktiv für unreife Dendritische Zellen waren. Die Migration der Dendritischen Zellen in Richtung der ALA/PDT-behandelten Sphäroide war im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant höher. Der ermittelte Wert der migrierten Zellen zu ALA/PDT-behandelten Sphäroiden lag für die Linie U87 bei $239,2 \pm 64,05$ ($n=4$; $p=0,034$) und für U251-Sphäroide bei $268,8 \pm 56,81$ ($n=4$; $p=0,008$). Die Kontrollen ergaben Werte von $58,81 \pm 15,09$ (U87) bzw. $36,44 \pm 17,58$ (U251) migrierte Dendritische Zellen. Weiterhin festzuhalten ist, dass bestrahlte Tumorsphäroide der Linie U251 eine schwache Chemoattraktivität für Dendritische Zellen aufwiesen. Die Anzahl der migrierten Zellen lag hier bei $167,9 \pm 50,51$ ($p=0,049$). Bei allen weiteren Ansätzen konnte keine oder nur eine sehr schwach ausgeprägte, nicht signifikante Migration nachgewiesen werden.

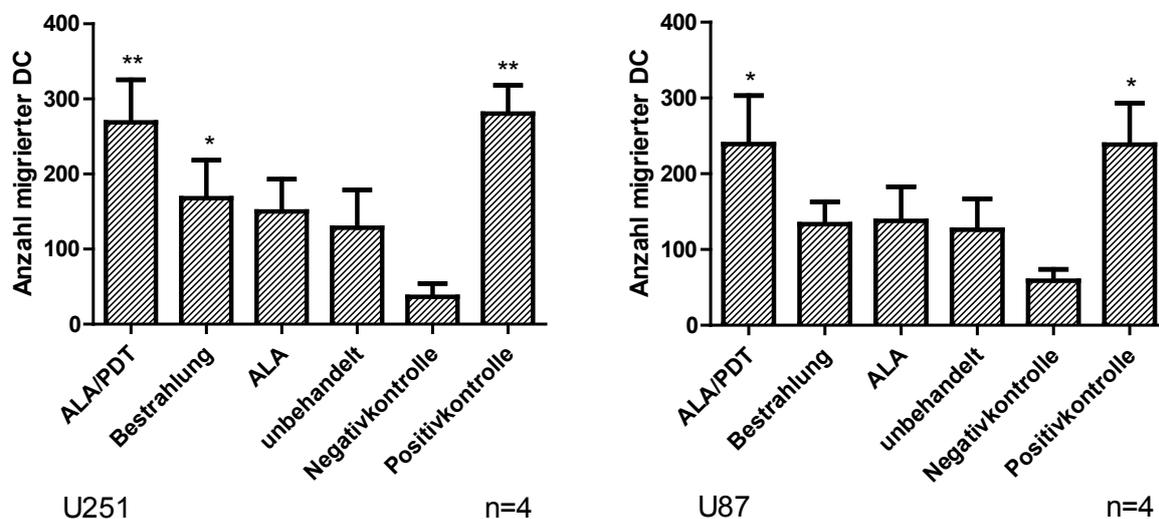


Abbildung 3.27: ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide induzieren die Migration unreifer Dendritischer Zellen. Die Migration unreifer Dendritischer Zellen zu den unterschiedlichen Sphäroid-Präparationen der Zelllinien U251 und U87 wurde in einem Transwell-Assay untersucht. Nach 16 h wurden die Zellen, die sich an der Unterseite der Inserts befanden, d.h. vom Insert in Richtung Sphäroide migriert waren, ausgezählt. Als Positivkontrolle wurde das Chemokin CCL3 eingesetzt, als Negativkontrolle diente reines Kulturmedium. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n=4$ (Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu der Negativkontrolle wurden kenntlich gemacht durch: **- $p \leq 0,01$, *- $p \leq 0,05$).

3.4.5 Chemokinsezernierung als Folge einer ALA/PDT-Behandlung von Gliomsphäroiden

Fraglich war nun, worin die Chemoattraktivität der ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroide gegenüber Dendritischen Zellen begründet war. Naheliegend war die Vermutung, dass die Dendritischen Zellen anhand eines Chemokingradienten in Richtung der Sphäroide migrieren. Um dieses näher zu analysieren, erfolgten Multiplex-Analysen. Dazu wurden die Überstände einer ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroidkultur auf die Chemokine IL-8 (CXCL8), MIP1 α (CCL3), MCP1 (CCL2), Fractalkine (CXCL1), Eotaxin (CCL11) und Rantes (CCL5). Überstände aus Sphäroidkulturen mit nicht behandelten Sphäroiden dienten als Referenzwerte.

Abbildung 3.28 fasst die Ergebnisse dieser Analysen zusammen. Von den untersuchten Chemokinen konnte nur IL-8 (CXCL8) in den Überständen der Sphäroid-Kulturen der Linien U87, U251 und U373 nachgewiesen werden. Für die Linien U373 und U251 blieb die Konzentration an IL-8 nach ALA/PDT-Behandlung der Sphäroide nahezu unverändert, wogegen für die Linie U87 eine Zunahme an IL-8 festgestellt werden konnte (6,0 ng/ml vs. 9,2 ng/ml, n=1; vorläufiges Ergebnis). Aufgrund dieser Ergebnisse kann nicht davon ausgegangen werden, dass die hier untersuchten Chemokine an der Chemoattraktion von unreifen Dendritischen Zellen durch ALA/PDT-behandelte Gliomsphäroide beteiligt sind

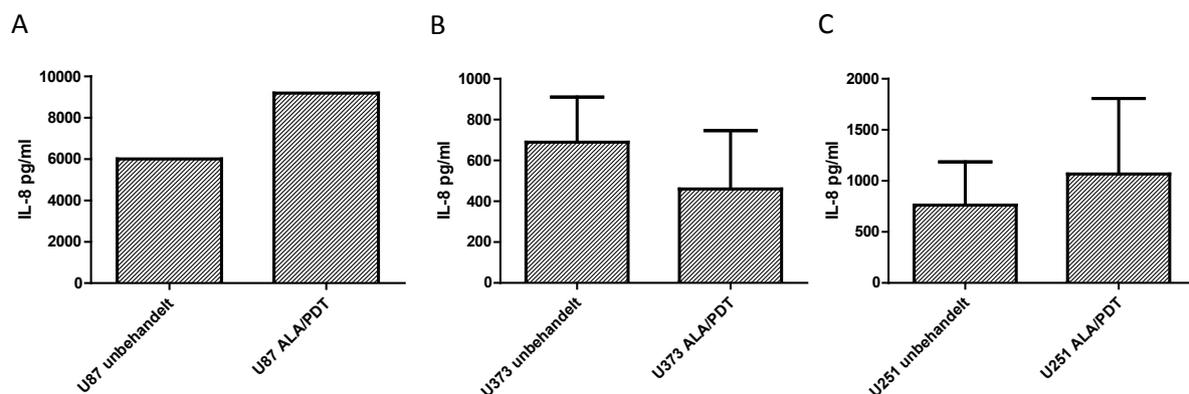


Abbildung 3.28: Chemokinsekretion durch Gliomsphäroide infolge einer ALA/PDT-Behandlung. Überstände von Gliomsphäroidkulturen der Linien U87, U373 und U251 nach ALA/PDT-Behandlung wurden mittels Multiplex-Analysen auf Chemokine untersucht. Dargestellt wird die gemessene IL-8 Konzentration, die von U87-Sphäroiden (A; n=1), U373-Sphäroiden (B; n=2) und U251-Sphäroiden (C; n=2) sezerniert wurde. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM, Einzelwerte in A.

3.4.6 Aufnahme von Tumormaterial durch unreife Dendritische Zellen

Die Fähigkeit Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen ist charakteristisch für unreife Dendritische Zellen. Die Untersuchung der Pinozytoseaktivität stellte eine Möglichkeit dar, die Funktionalität der unreifen Dendritischen Zellen unter dem Einfluss von Gliomsphäroiden zu charakterisieren. Hierfür wurden Monozyten in Co-Kulturen mit Tumorsphäroiden (ALA/PDT; ALA; Bestrahlung; unbehandelt; ohne) für 6 Tage in Gegenwart der Zytokine GM-CSF und IL-4 zu unreifen Dendritischen Zellen differenziert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Antigenaufnahme-Aktivität dieser Dendritischen Zellen durch Inkubation mit variierenden Konzentrationen an BSA-FITC (0-100 μ g/ml) für 60 Minuten bei 37°C oder als Negativkontrolle bei 4°C. Dendritische Zellen ohne Sphäroide dienten als Referenzzellen. Die Aufnahme des BSA-FITC durch Pinozytose konnte durchflusszytometrisch ermittelt werden. Die quantitative Analyse erfolgte über die mittlere Fluoreszenzintensität.

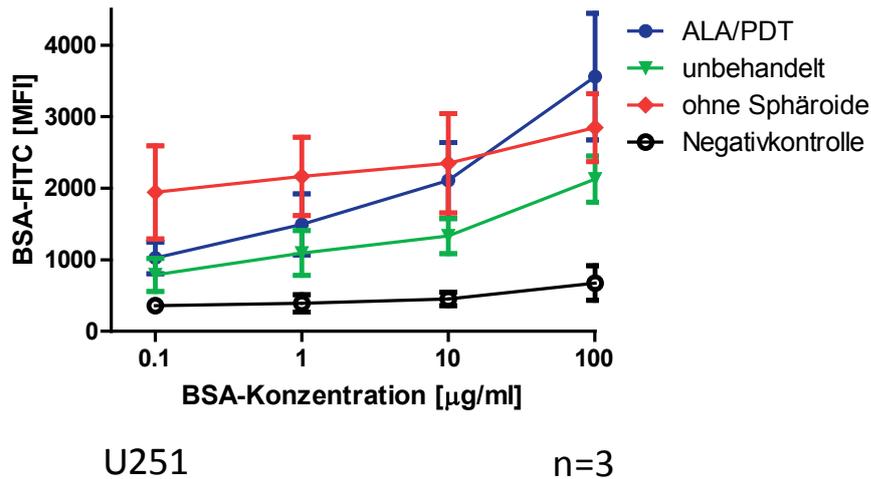


Abbildung 3.29: Pinozytoseaktivität unreifer Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit U251-Sphäroiden. Monozyten wurden in Co-Kulturen mit U251-Tumorsphäroiden zu Dendritischen Zellen differenziert. Die quantitative Analyse der BSA-FITC Aufnahme als Maß für ihre Pinozytoseaktivität erfolgte durchflusszytometrisch über die MFI-FITC. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n=3.

Abbildung 3.29 veranschaulicht die Ergebnisse der Analysen nach Co-Kultur der Dendritischen Zellen mit Tumorsphäroiden der Linie U251. Betrachtet man den gesamten Verlauf, so zeigte sich eine Pinozytoseaktivität der Dendritischen Zellen aus Kontrollkulturen bereits in Gegenwart geringer BSA-Konzentrationen. Dendritische Zellen, die mit U251 ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden ausdifferenzierten, zeigten eine ähnliche Aufnahmeaktivität ($p=0,535$). Nach Co-Kultur mit unbehandelten Sphäroiden zeigte sich eine leichte Reduktion der Pinozytoseaktivität der DC im Vergleich zu den Kontroll-DC, die sich jedoch als nicht signifikant erwies ($p= 0,968$).

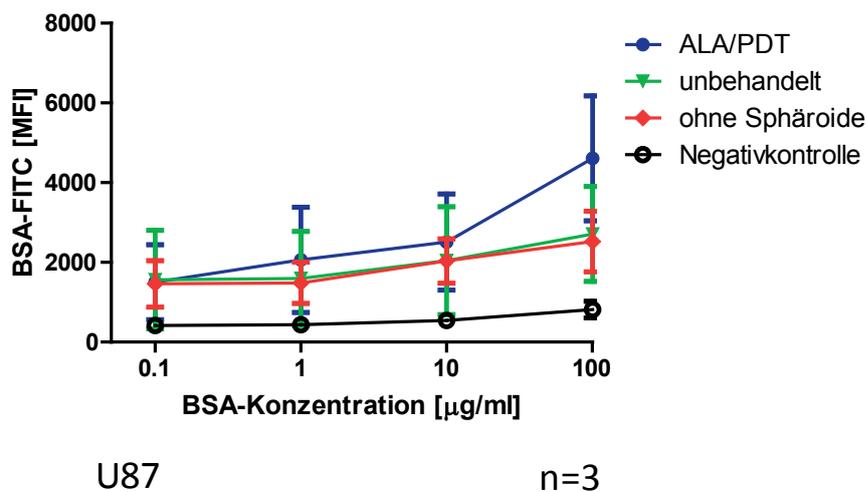


Abbildung 3.30: Pinozytoseaktivität unreifer Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit U87-Sphäroiden. Monozyten wurden in Co-Kulturen mit U87-Tumorsphäroiden zu Dendritischen Zellen differenziert. Die quantitative Analyse der BSA-FITC Aufnahme als Maß für die Pinozytoseaktivität erfolgte durchflusszytometrisch über die MFI-FITC. Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM für n=3.

Die Ergebnisse für Sphäroide der Zelllinie U87 sind in Abbildung 3.30 dargestellt. Nach Zugabe aller Sphäroid-Präparationen konnte kein Unterschied in der Pinozytoseaktivität im Vergleich zu den Kontroll-DC festgestellt werden ($p > 0,05$ für $n=3$).

Somit zeichneten sich die in der Gegenwart oder Abwesenheit von Gliomsphäroiden, unabhängig von deren Behandlung, generierten unreifen Dendritischen Zellen hinsichtlich ihrer Antigenaufnahmeaktivität als funktionell vergleichbar aus. Die Sphäroide hatten demnach keinen Einfluss auf die Antigenaufnahmeaktivität der Dendritischen Zellen. Um zu prüfen, ob die Attraktivität der Sphäroide für eine Aufnahme von Tumormaterial durch unreife DC zunimmt, d.h. ob die ALA/PDT-Behandlung zu einer Opsonisierung der Tumorzellen führt, wurden CFDA-SE-markierte Tumorsphäroide der unterschiedlichen Ansätze (ALA/PDT; ALA; Bestrahlung; unbehandelt) mit unreifen Dendritischen Zellen für 16 Stunden co-kultiviert. Um die Dendritischen Zellen in den Co-Kulturen eindeutig zu identifizieren, wurden sie vor der Auswertung mit einem PE-konjugierten anti-HLA-DR Antikörper angefärbt. Analysiert wurden diese Co-Kultur-Ansätze auf zwei unterschiedliche Arten, durch Fluoreszenzmikroskopie oder durchflusszytometrisch.

In der Abbildung 3.31 sieht man exemplarisch die rot-gefärbten unreifen Dendritischen Zellen. Tumorsphäroide bzw. Zellfragmente der Sphäroide der Zelllinie U251 werden aufgrund der CFDA-SE-Färbung grün dargestellt. Deutlich zu erkennen ist eine perinukleäre Lokalisation des Tumormaterials innerhalb der Dendritischen Zellen.

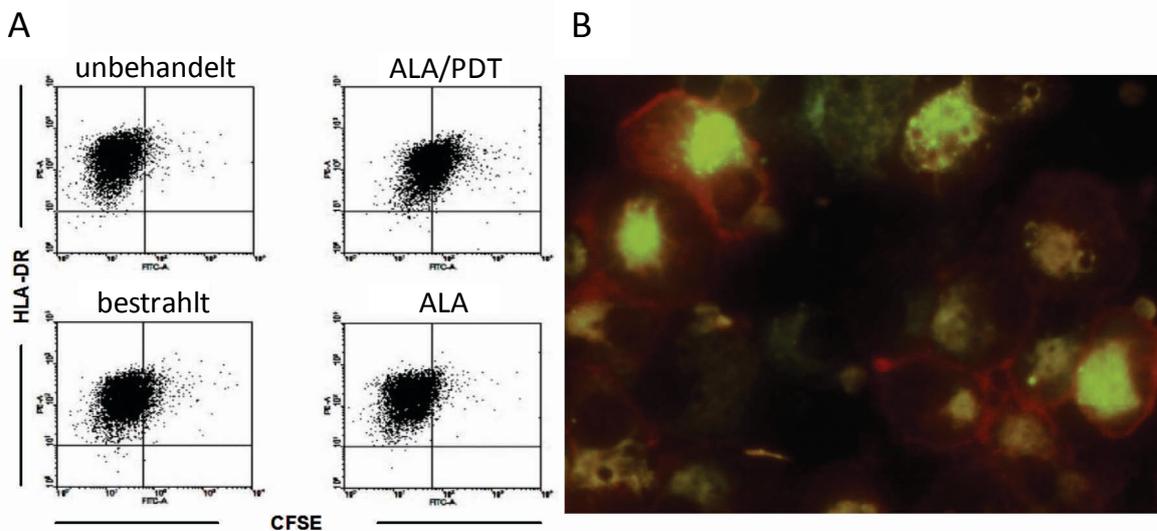


Abbildung 3.31: Aufnahme von Tumormaterial (U251) durch unreife Dendritische Zellen. Dargestellt sind eine durchflusszytometrische Analyse (A) sowie ein fluoreszenzmikroskopisches Bild einer repräsentativen Co-Kultur unreifer Dendritischer Zellen (rot) mit CFSE-markierten Tumorsphäroiden der Zelllinie U251 (grün) (B). Gut zu erkennen ist die Aufnahme des grünen Tumormaterials durch die Dendritischen Zellen (20-fache Vergrößerung).

Ob die Aufnahme von Tumormaterial durch die Dendritischen Zellen zwischen den verschiedenen Ansätzen variierte, sollte eine durchflusszytometrische Analyse klären. Als Maß für die Aufnahme von Tumormaterial diene die grüne MFI (aufgenommenes Tumormaterial) der rot-gefärbten Dendritischen Zellen (vgl. Abbildung 3.31).

Die ALA/PDT-Behandlung von Sphäroiden resultierte sowohl für die Linie U251 ($1324,05 \pm 297,6$ vs. $349,3 \pm 108,0$ MFI-FITC ; $n=4$; $p=0,022$) als auch für die Linie U87 ($794,3 \pm 172n1$ vs. $164,3 \pm 33,1$ MFI-FITC; $n=4$; $p=0,011$) in einer signifikant höheren Aufnahme von Tumormaterial durch unreife Dendritische Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollsphäroiden (vgl. Abbildung 3.32) Sphäroide, die nur mit ALA behandelt oder nur bestrahlt wurden, zeigten keine solche Aktivität oder sie war nur sehr schwach ausgeprägt. Die Ergebnisse für die Zelllinie U373 stellten sich ähnlich dar (Graphik nicht gezeigt). Abschließend kann zusammenfassend festgehalten werden, dass eine ALA/PDT der Gliomsphäroide eine Antigenaufnahme des geschädigten Tumormaterials durch unreife Dendritische Zellen stimulieren kann (vgl. Abbildung 3.33).

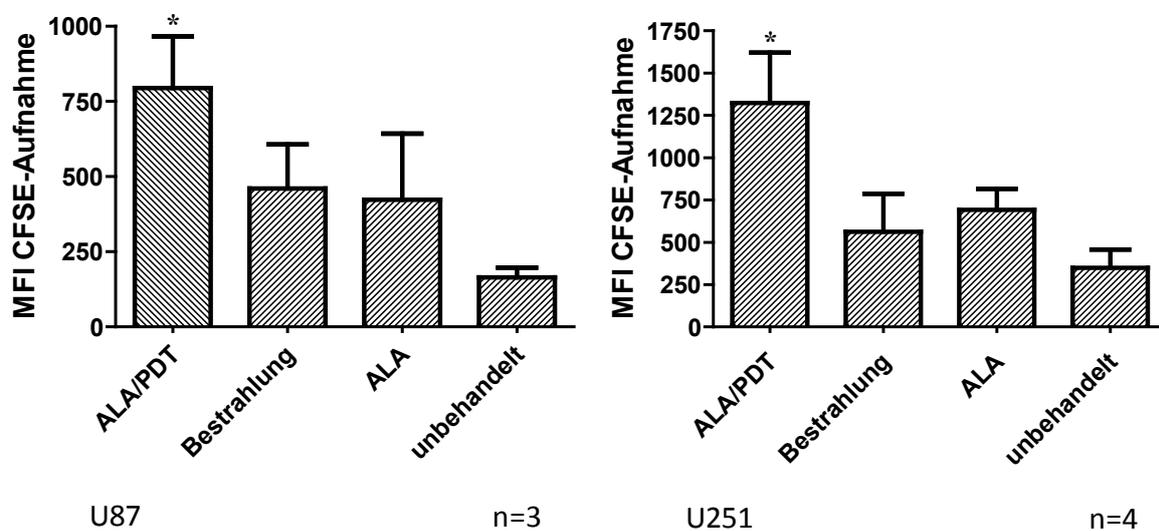


Abbildung 3.32: Aufnahme von Tumormaterial durch unreife Dendritische Zellen. Die Antigenaufnahme von Tumormaterial durch unreife Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit U87- oder U251-Sphäroiden wurde durchflusszytometrisch anhand der MFI-FITC (Tumormaterial) für rot gefärbte DC (anti-HLA-DR) bestimmt (statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Sphäroiden wurden kenntlich gemacht durch: * $-p \leq 0,05$). Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n=3$ (U87) und $n=4$ (U251).

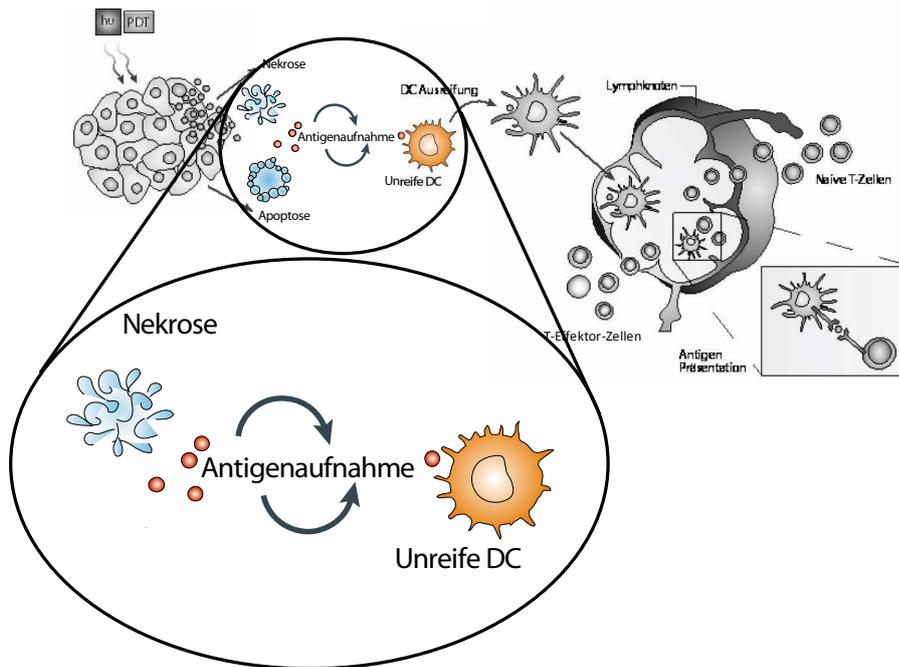


Abbildung 3.33: Stimulation der Aufnahme von Tumorantigenen durch unreife Dendritische Zellen.
(Abbildung modifiziert nach Castano et al. [148])

3.4.7 Einfluss von Glioblastom-Sphäroiden auf die Ausreifung unreifer Dendritischer Zellen

Da nur reife Dendritische Zellen befähigt sind, eine T-Zell-Antwort mit resultierender Eliminierung von Tumorzellen durch die gebildeten Effektorzellen zu initiieren, stellte sich die Frage, ob Tumorsphäroide die Ausreifung Dendritischer Zellen beeinflussen können, d.h. ob die als Danger-Signale fungieren können. Um diesen möglichen Einfluss von Tumorsphäroiden auf die Ausreifung Dendritischer Zellen zu untersuchen, erfolgte eine Co-Kultivierung unreifer Dendritischer Zellen mit Sphäroiden (ALA/PDT, ALA, Bestrahlung, unbehandelt) über einen Zeitraum von drei Tagen. Der Reifestatus der Dendritischen Zellen konnte anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD40, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR ermittelt werden.

CD83 ist ein charakteristischer Marker reifer Dendritischer Zellen und wurde daher zuerst näher analysiert. Dendritische Zellen, die ohne Sphäroide kultiviert wurden, dienten als Negativkontrolle. DC, die mit $\text{TNF-}\alpha$ als Reifungsfaktor stimuliert wurden, fungierten als Positivkontrolle. Wie in Abbildung 3.34 für Sphäroide der Zelllinie U87 zu sehen ist, wurde der Anteil CD83 positiver reifer Dendritischer Zellen durch eine Co-Kultur mit ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden signifikant gesteigert. Die Frequenz CD83-positiver Zellen lag bei $52,90\% \pm 17,41\%$ im Vergleich zu $3,77\% \pm 2,47\%$ für die Negativkontrolle ($p=0,049$ für $n=3$). Alle übrigen Sphäroid-Gruppen waren nicht in der Lage, eine Ausreifung der DC zu induzieren. Eine Co-Kultur mit ALA-behandelten Sphäroiden ergab $3,13\% \pm 1,04\%$ CD83 positiver Zellen; ähnliche Werte konnten auch für bestrahlte ($2,40\% \pm 1,30\%$) und unbehandelte U87-Tumorsphäroide ($3,37\% \pm 1,67\%$) vermerkt werden.

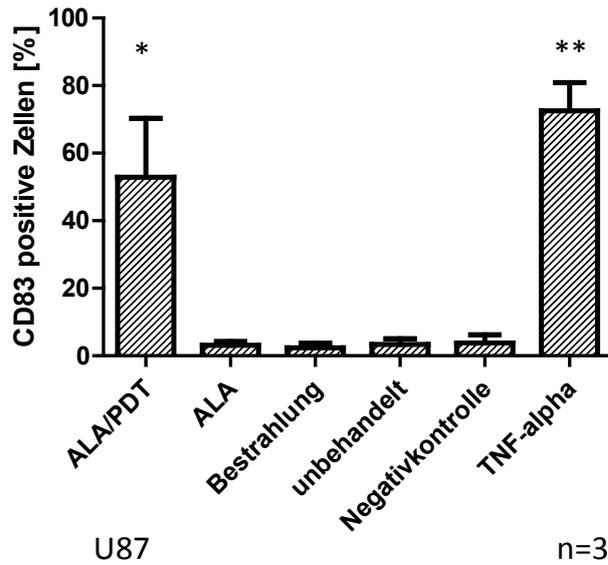


Abbildung 3.34: ALA/PDT-behandelte U87-Sphäroide induzieren die Ausreifung in Dendritischen Zellen. Durchflusszytometrische Analysen der Frequenz CD83+ reifer Dendritischer Zellen nach Co-Kultivierung mit U87-Tumorsphäroiden für einen Zeitraum von drei Tagen. Kontroll-DC wurden mit TNF- α stimuliert (statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle (DC, die in der Abwesenheit eines Reifungsstimulus für drei Tage kultiviert wurden) wurden kenntlich gemacht durch: **- $p \leq 0,01$, *- $p \leq 0,05$). Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n=3$.

Auch für Tumorsphäroide der Zelllinien U251 und U373 ergab sich ein vergleichbares Bild (vgl. Abbildung 3.35). ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide induzierten eine signifikante Ausreifung Dendritischer Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Werte lagen hier bei $62,30 \% \pm 10,00 \%$ vs. $5,03 \% \pm 2,55 \%$ für die Zelllinie U251 und bei $66,50 \% \pm 2,079 \%$ vs. $5,7 \% \pm 1,93 \%$ für die Zelllinie U373. In den Co-Kulturen mit anderen Sphäroid-Gruppen konnte kein Anstieg der CD83-Frequenz verzeichnet werden. Abbildung 3.35 stellt diese Daten dar.

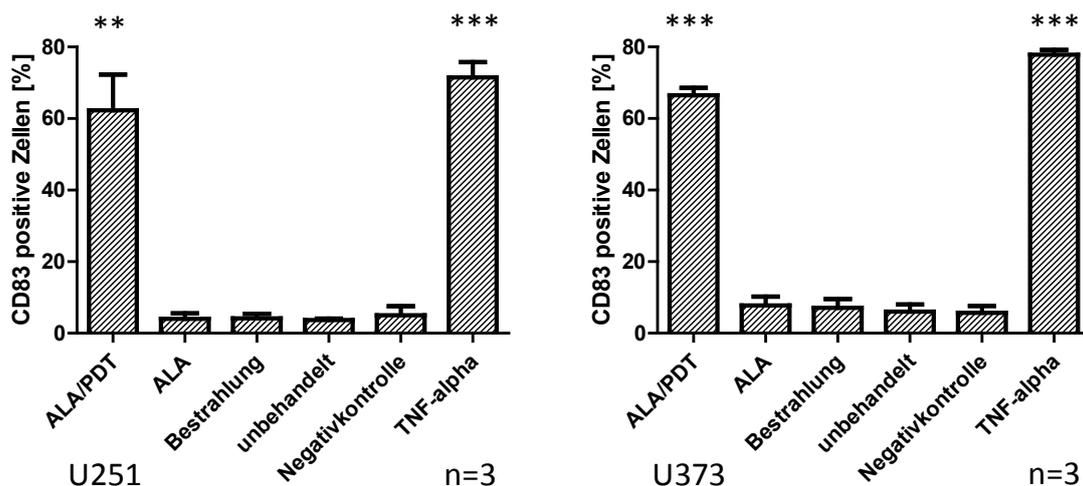


Abbildung 3.35: ALA/PDT-behandelte Sphäroide induzieren die Ausreifung in Dendritischen Zellen. Durchflusszytometrische Analysen der Frequenz CD83+ Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit U251- oder U373-Tumorsphäroiden für einen Zeitraum von drei Tagen. Kontroll-DC wurden mit TNF- α stimuliert, die Negativkontrolle repräsentiert DC ohne Reifungsstimulus (statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu unstimulierten DC wurden kenntlich gemacht durch: ***- $p \leq 0,001$, **- $p \leq 0,01$). Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n=3$.

Um eine Aktivierung naiver T-Zellen zu gewährleisten, müssen reife Dendritische Zellen die co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie HLA-DR mit hoher Dichte exprimieren. Deshalb wurde ihre Expression nach Co-Kulturen mit Tumorsphäroiden wie für CD83 beschrieben analysiert. Die mittlere Fluoreszenzintensität diente hierbei als Maß für die Stärke der Expression des jeweiligen Moleküls.

Für die Expressionsdichte von HLA-DR, das bereits auf nicht-stimulierten Dendritischen Zellen mit hoher Dichte exprimiert wurde, zeigte sich keine signifikante Veränderung durch eine Co-Kultur mit einer der Sphäroid-Präparationen. Auch TNF- α führte im Vergleich zu unstimulierten DC (Negativkontrolle) zu keiner erhöhten Expression von HLA-DR. Abbildung 3.36 fasst die Ergebnisse für die Zelllinien U251 und U87 graphisch zusammen. Vergleichbare Daten konnten nach Co-Kultur mit Tumorsphäroiden der Zelllinie U373 ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

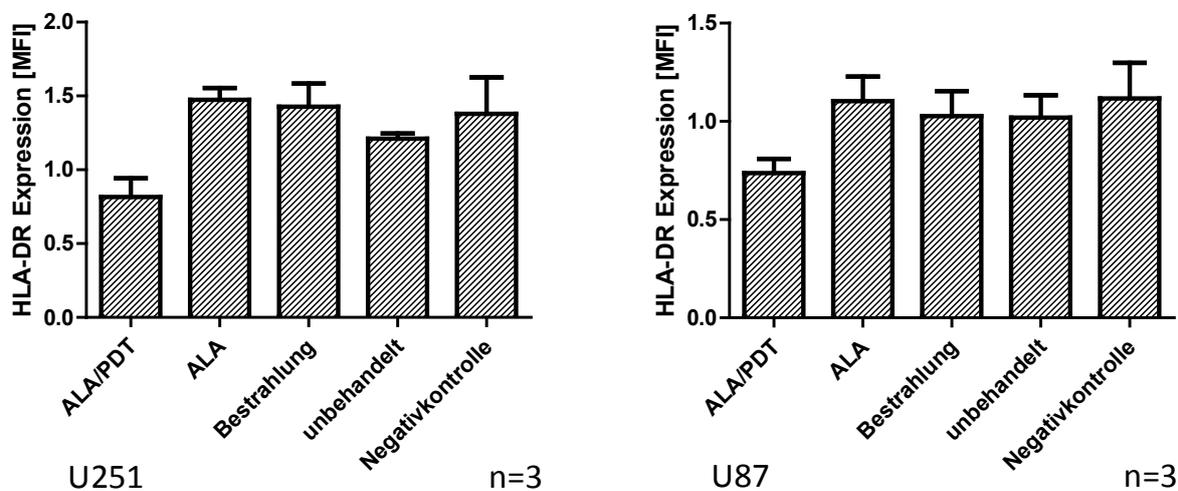


Abbildung 3.36: HLA-DR-Expression auf Dendritischen Zellen nach Co-Kultivierung mit Tumorsphäroiden der Zelllinien U251 und U87. Die Expression von HLA-DR auf Dendritischen Zellen nach Co-Kultur mit U87- oder U251-Tumorsphäroiden für einen Zeitraum von drei Tagen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Kontroll-DC wurden mit TNF- α stimuliert (Positivkontrolle), die Negativkontrolle repräsentieren DC ohne Reifungsstimulus. Die Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n=3; alle Werte wurden gegen die Positivkontrolle (=1) normiert.

Deutliche Unterschiede konnten hingegen durch Co-Kultivierung der Dendritischen Zellen mit Tumorsphäroiden aller Zelllinien für die Expressionsdichte der co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 beobachtet werden.

Nach Co-Kultivierung der unreifen Dendritischen Zellen mit ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden der Zelllinie U87 zeigte sich eine gesteigerte Expressionsdichte des Moleküls CD40 ($0,723 \pm 0,156$ MFI-FITC; n=3; p= 0,098) im Vergleich zu der Negativkontrolle ($0,353 \pm 0,072$ MFI-FITC; n=3), siehe Abbildung 3.37. Die übrigen Sphäroid-Präparationen der Linie U87 hatten dagegen keine nennenswerten Effekte, d.h. auch nach Co-Kulturen mit den Sphäroiden konnte keine signifikante Zunahme der Expressionsdichte im Vergleich zu unstimulierten Kontroll-DC (Negativkontrolle) nachgewiesen werden. (ALA: $0,377 \pm 0,064$ MFI-FITC; n=3; Bestrahlung: $0,327 \pm 0,055$ MFI-FITC; n=3; unbehandelt: $0,367 \pm 0,038$ MFI-FITC; n=3).

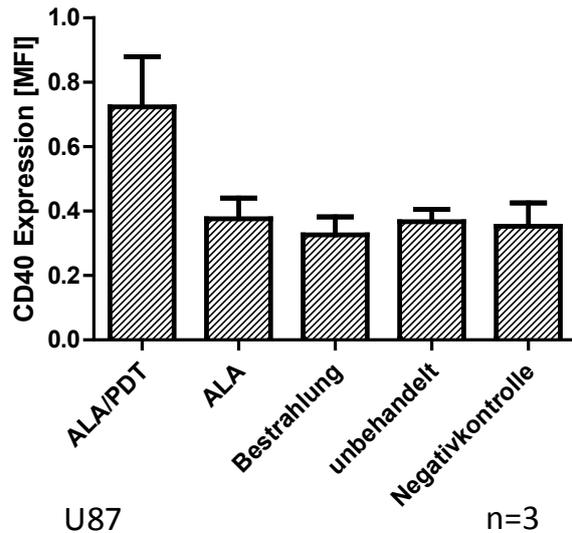


Abbildung 3.37: Expression des co-stimulatorischen Moleküls CD40 auf Dendritischen Zellen infolge einer Co-Kultur mit U87-Sphäroiden. Die Expression von CD40 auf Dendritischen Zellen nach Co-Kultur mit U87-Tumorsphäroiden für einen Zeitraum von drei Tagen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Kontroll-DC wurden mit TNF- α stimuliert (Positivkontrolle), die Negativkontrolle repräsentieren DC ohne Reifungsstimulus. Die Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n=3; alle Werte wurden gegen die Positivkontrolle (=1) normiert.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Co-Kultur mit U251- sowie U373-Sphäroiden (Abbildung 3.38) erzielt. Auch hier steigerten ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide die CD40-Expression (signifikant nach Co-Kultur mit U251-Sphäroiden), alle übrigen Sphäroid-Gruppen dagegen nicht.

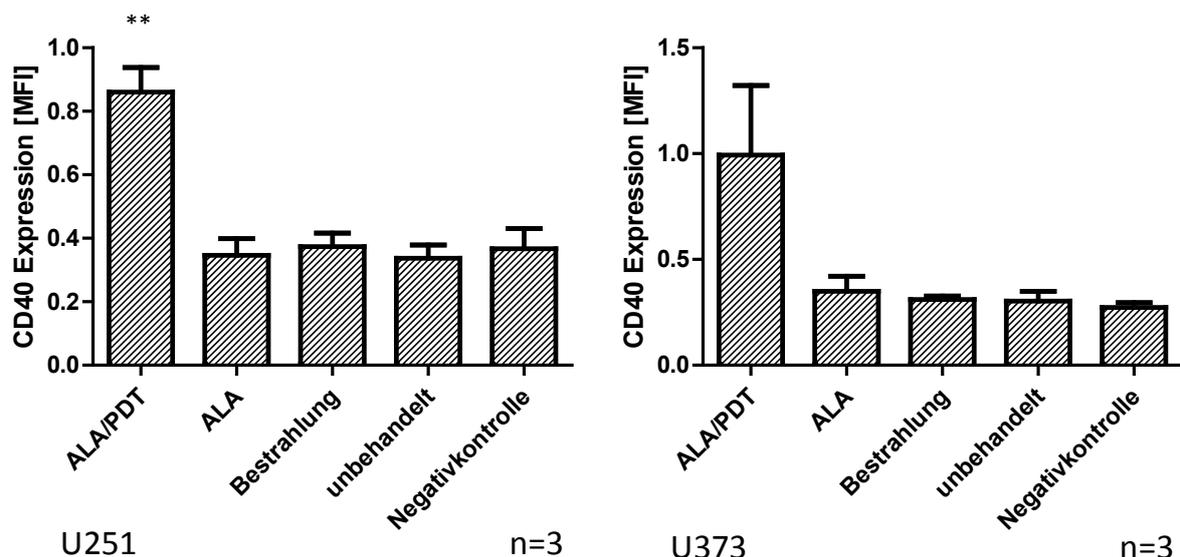


Abbildung 3.38: CD40-Expression Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit Gliomsphäroiden. Die Expression von CD40 auf Dendritischen Zellen nach Co-Kultur mit U251- oder U373-Tumorsphäroiden für einen Zeitraum von drei Tagen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Kontroll-DC wurden mit TNF- α stimuliert (Positivkontrolle), die Negativkontrolle repräsentieren DC ohne Reifungsstimulus. Die Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n=3; alle Werte wurden gegen die Positivkontrolle (=1) normiert. (statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu unstimulierten DC wurden kenntlich gemacht durch: **- $p \leq 0,01$).

Durch Co-Kulturen der unreifen Dendritischen Zellen mit ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden der Zelllinie U87 (vgl. Abbildung 3.39) wurde die Expressionsdichte des Moleküls CD80 im Vergleich zu der Negativkontrolle signifikant gesteigert ($1,103 \pm 0,113$ MFI-FITC; $n=3$; $p= 0,003$ vs. $0,35 \pm 0,044$ MFI-FITC; $n=3$). Die übrigen Sphäroid-Präparationen der Zelllinie U87 hatten dagegen keinen Effekt im Vergleich zu den unstimulierten Kontroll-DC. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch nach Co-Kultur mit U251- sowie U373-Sphäroiden (Abbildung 3.40) erzielt. Auch hier steigerten ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide die CD80-Expression signifikant, die übrigen Sphäroid-Präparationen der Linien U251 und U373 hatten dagegen keinen nennenswerten Effekt.

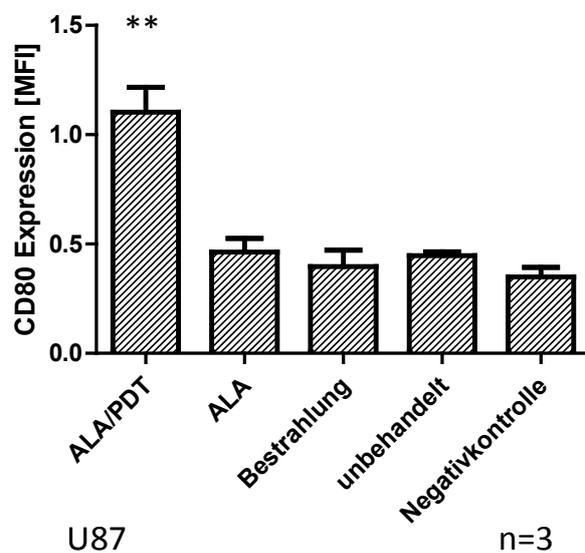


Abbildung 3.39: Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 auf Dendritischen Zellen als Konsequenz einer Co-Kultur mit Tumorsphäroiden (U87). Die Expression von CD80 auf Dendritischen Zellen nach Co-Kultur mit U87-Tumorsphäroiden für einen Zeitraum von drei Tagen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Kontroll-DC wurden mit TNF- α stimuliert (Positivkontrolle), die Negativkontrolle repräsentieren DC ohne Reifungsstimulus. Die Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n=3$; alle Werte wurden gegen die Positivkontrolle (=1) normiert (statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu unstimulierten DC wurden kenntlich gemacht durch: **- $p \leq 0,01$).

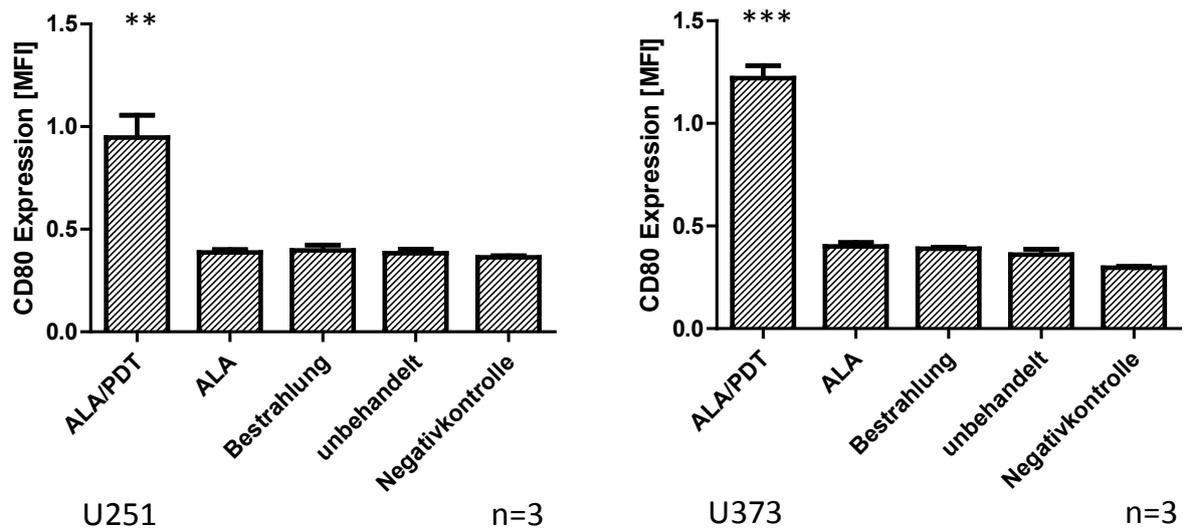


Abbildung 3.40: Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 auf Dendritischen Zellen als Konsequenz einer Co-Kultur mit Tumorsphäroiden (U251 oder U373). Die Expression von CD80 auf Dendritischen Zellen nach Co-Kultur mit U251- oder U373-Tumorsphäroiden für einen Zeitraum von drei Tagen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Kontroll-DC wurden mit TNF- α stimuliert (Positivkontrolle), die Negativkontrolle repräsentieren DC ohne Reifungsstimulus. Die Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n=3; alle Werte wurden gegen die Positivkontrolle (=1) normiert (statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu unstimulierten DC wurden kenntlich gemacht durch:***- $p \leq 0,001$, **- $p \leq 0,01$).

Auch nach Co-Kultivierung der unreifen Dendritischen Zellen mit ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden der Zelllinie U87 zeigte sich eine signifikant gesteigerte Expressionsdichte des Moleküls CD86 ($1,160 \pm 0,257$ MFI-FITC; n=3; $p = 0,038$) im Vergleich zu der Negativkontrolle ($0,350 \pm 0,066$ MFI-FITC; n=3). Die übrigen Sphäroid-Präparationen der Zelllinie U87 hatten dagegen im Vergleich zu unstimulierten Kontroll-DC (Negativkontrolle) keinen nennenswerten Effekt auf die Expressionsdichte des Moleküls CD86 (ALA: $0,313 \pm 0,064$ MFI-FITC; n=3; Bestrahlung: $0,32 \pm 0,074$ MFI-FITC; n=3; unbehandelt: $0,313 \pm 0,073$ MFI-FITC; n=3; siehe Abbildung 3.41).

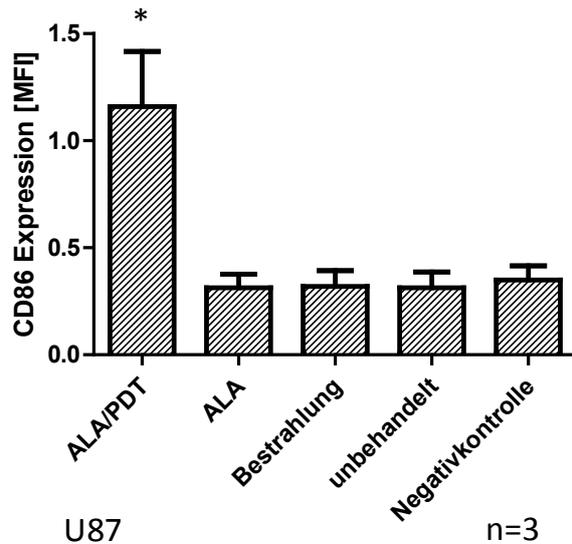


Abbildung 3.41: Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD86 auf reifen Dendritischen Zellen als Konsequenz einer Co-Kultur mit Tumorsphäroiden. Die Expression von CD86 auf Dendritischen Zellen nach Co-Kultur mit U87-Tumorsphäroiden für einen Zeitraum von drei Tagen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Kontroll-DC wurden mit TNF- α stimuliert (Positivkontrolle), die Negativkontrolle repräsentieren DC ohne Reifungsstimulus. Die Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n=3; alle Werte wurden gegen die Positivkontrolle (=1) normiert (statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu unstimulierten DC wurden kenntlich gemacht durch: *-p \leq 0,05).

Dieser Effekt auf die Expressionsdichte des Moleküls CD86 konnte auch nach Co-Kulturen mit Sphäroiden der Linien U251 und U373 detektiert werden. Auch hier steigerten ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide die CD86-Expression signifikant, alle übrigen Sphäroid-Präparationen dagegen nicht (vgl. Abbildung 3.42).

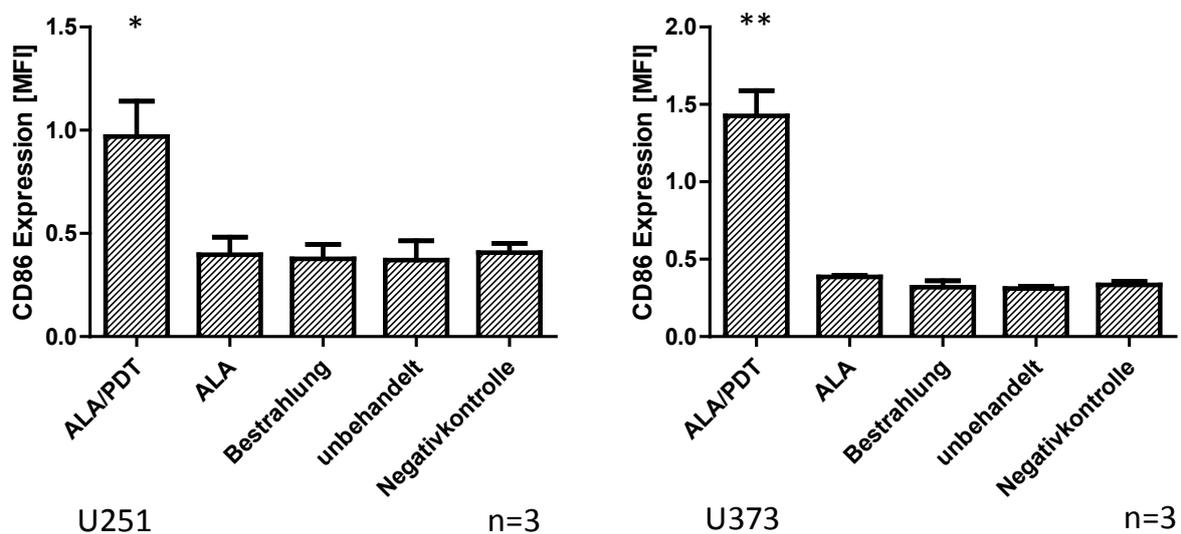


Abbildung 3.42: Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD86 auf reifen Dendritischen Zellen als Konsequenz einer Co-Kultur mit Tumorsphäroiden. Die Expression von CD86 auf Dendritischen Zellen nach Co-Kultur mit U251- oder U373-Tumorsphäroiden für einen Zeitraum von drei Tagen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Kontroll-DC wurden mit TNF- α stimuliert (Positivkontrolle), die Negativkontrolle repräsentieren DC ohne Reifungsstimulus. Die Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n=3; alle Werte wurden gegen die Positivkontrolle (=1) normiert (statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu unstimulierten DC wurden kenntlich gemacht durch: *-p \leq 0,05;**-p \leq 0,01).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Co-Kultivierung unreifer Dendritischer Zellen mit ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden der unterschiedlichen Zelllinien die Ausreifung der DC, nachgewiesen durch die Expression des charakteristischen Reifungsmarkers CD83 und die hohe Expressionsdichte co-stimulatorischer Moleküle, induziert. Damit ist ein weiterer wichtiger Schritt im Ablauf hin zu einer anti-tumoralen Immunantwort nachgewiesen worden (vgl. Abbildung 3.43).

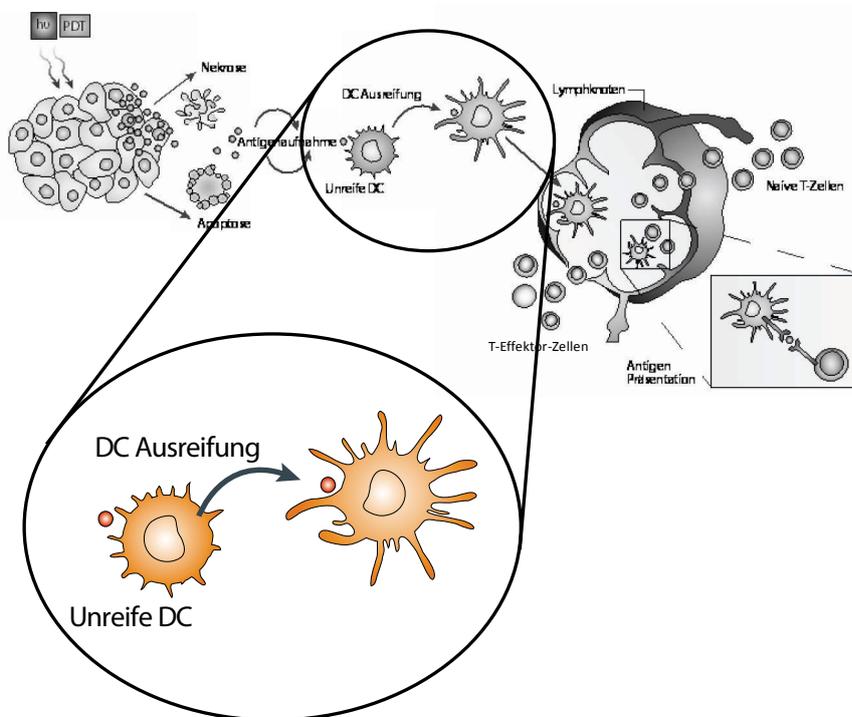


Abbildung 3.43: Ausreifung Dendritischer Zellen nach ALA/PDT-Behandlung. (Abbildung modifiziert nach Castano et al. [148])

3.4.8 T-Zell-stimulatorische Aktivität der Dendritischen Zellen nach Co-Kultur mit Gliomsphäroiden

Ob es sich bei diesen immunphänotypisch reifen Dendritischen Zellen um funktional aktive reife Dendritische Zellen handelt, sollte eine sogenannte allogene gemischte Leukozyten Kultur (MLC) klären. Aktive reife Dendritische Zellen zeichnen sich in einer solchen MLC durch ihre potente stimulatorische Aktivität für die Induktion einer proliferativen T-Zell-Antwort aus.

Unreife Dendritische Zellen, die für einen Zeitraum von drei Tagen in Gegenwart der unterschiedlichen Tumorsphäroid-Präparationen (ALA/PDT-behandelt; unbehandelt) kultiviert wurden, wurden anschließend in unterschiedlicher Zelldosis (0 – 5000 DC) mit 1×10^5 allogenen T-Zellen co-kultiviert. Nach fünf Tagen erfolgte die Erfassung der T-Zell-Proliferation über den Einbau des Basenanalogons BrdU. Dendritische Zellen, die mit TNF- α zu reifen DC ausgereift wurden, dienten als Positivkontrolle.

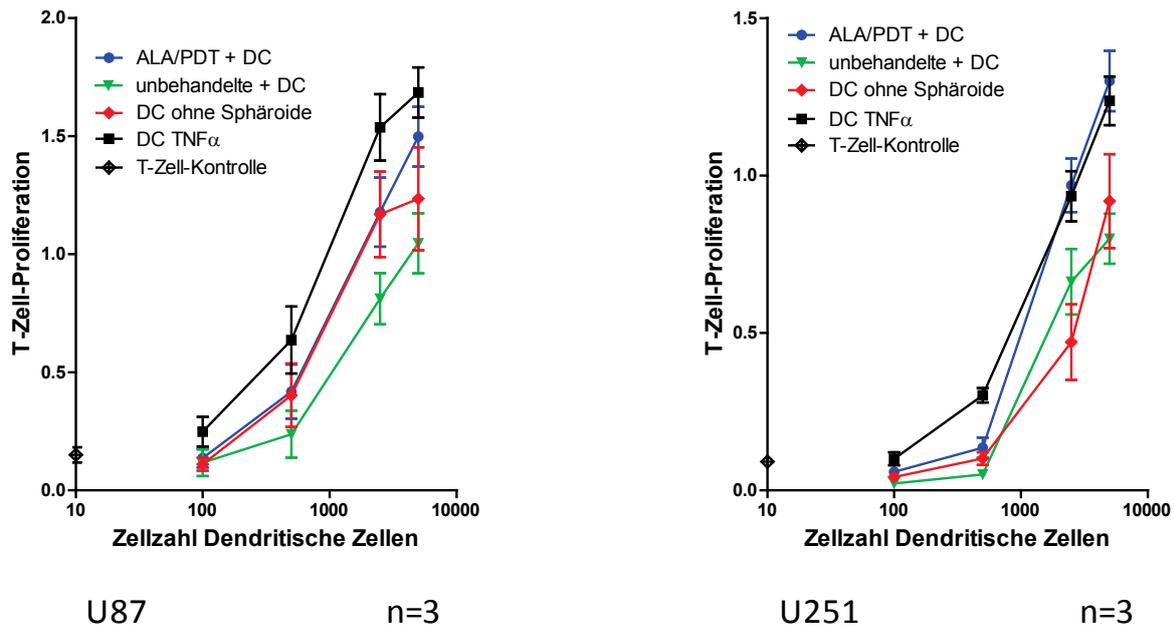


Abbildung 3.44: T-Zell-stimulatorische Aktivität Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit U87- oder U251-Sphäroiden. Verschiedene Zelldosen Dendritischer Zellen wurden nach drei-tägiger Co-Kultur mit ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden der Zelllinien U87 oder U251 geerntet und mit allogenen T-Zellen für fünf Tage co-kultiviert, bevor die T-Zell-Proliferation anhand des BrdU-Einbaus bestimmt wurde. Als Positivkontrolle dienten DC, die mit TNF- α zur Ausreifung gebracht wurden, unbehandelte DC und T-Zellen, die ohne Sphäroide kultiviert wurden als Negativkontrolle. Der Versuch wurde in drei unabhängigen Ansätzen jeweils als Triplikat durchgeführt. Die Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM.

Die Ergebnisse des BrdU-Einbaus als Maß für die Proliferation der T-Zellen sind in Abbildung 3.44 für den Versuchsansatz einer Co-Kultur mit Tumorsphäroiden der Zelllinien U87 und U251 dargestellt. Dendritische Zellen, die in Gegenwart von TNF- α kultiviert wurden, sind zu funktionalen T-Zellen ausgereift. Sie sind in der Lage, T-Zellen zu aktivieren und deren Proliferation zu stimulieren. Bereits geringe Zellzahlen (≥ 100 Zellen) reifer Dendritischer Zellen induzieren eine T-Zell-Proliferation. Steigende Zellzahlen Dendritischer Zellen ziehen einen Anstieg der T-Zell-Proliferation nach sich. Kontroll-DC, die weder mit Sphäroiden, noch mit TNF- α , als Reifungsstimulus kultiviert wurden, zeigten eine allostimulatorische Aktivität, die vergleichbar mit der allostimulatorischen Aktivität von DC aus Co-Kulturen mit unbehandelten Sphäroiden der Linie U251 war ($p > 0,05$ (ANOVA); $n = 3$). Für eine Co-Kultur mit unbehandelten Sphäroiden der Linie U87 konnte ein Trend in Richtung reduzierter allostimulatorischer Aktivität der DC im Vergleich zu den Kontroll-DC verzeichnet werden ($p = 0,064$; $n = 3$). Wenn die Ausreifung der Dendritischen Zellen durch Zugabe des Reifungsfaktors TNF- α erfolgte, konnte ein signifikanter Anstieg der allostimulatorischen Aktivität im Vergleich zu unreifen DC detektiert werden ($p = 0,009$; $n = 3$ für U87; $p = 0,0004$; $n = 3$, U251). Eine signifikante Steigerung der allostimulatorischen Aktivität der DC konnte auch nach Co-Kulturen mit ALA/PDT-behandelten Sphäroiden der Linie 87 ($p = 0,001$; $n = 3$) und U251 ($p > 0,0001$; $n = 3$) im Vergleich zu unbehandelten Sphäroiden verzeichnet werden. Die gesteigerte allostimulatorische Aktivität der DC nach Co-Kulturen mit ALA/PDT-behandelten U251-Sphäroiden erreichte ein vergleichbares Niveau, wie die Aktivität TNF- α stimulierter DC ($p > 0,05$; $n = 3$). Für U87-Sphäroide kompensierte die ALA/PDT-Behandlung die reduzierte T-Zell-stimulatorische Aktivität, die nach einer Co-Kultur mit unbehandelten Sphäroiden beobachtet worden war und es wurde ein Stimulationsniveau der Kontroll-DC erreicht ($p > 0,05$; $n = 3$). Für beide

Zelllinien konnte demnach, neben phänotypischen Veränderungen für reife DC, auch eine gesteigerte funktionelle Aktivität nach Co-Kulturen mit ALA/PDT-behandelten Sphäroiden beobachtet werden, die ebenfalls eine Ausreifung der DC impliziert (vgl. Abbildung 3.45).

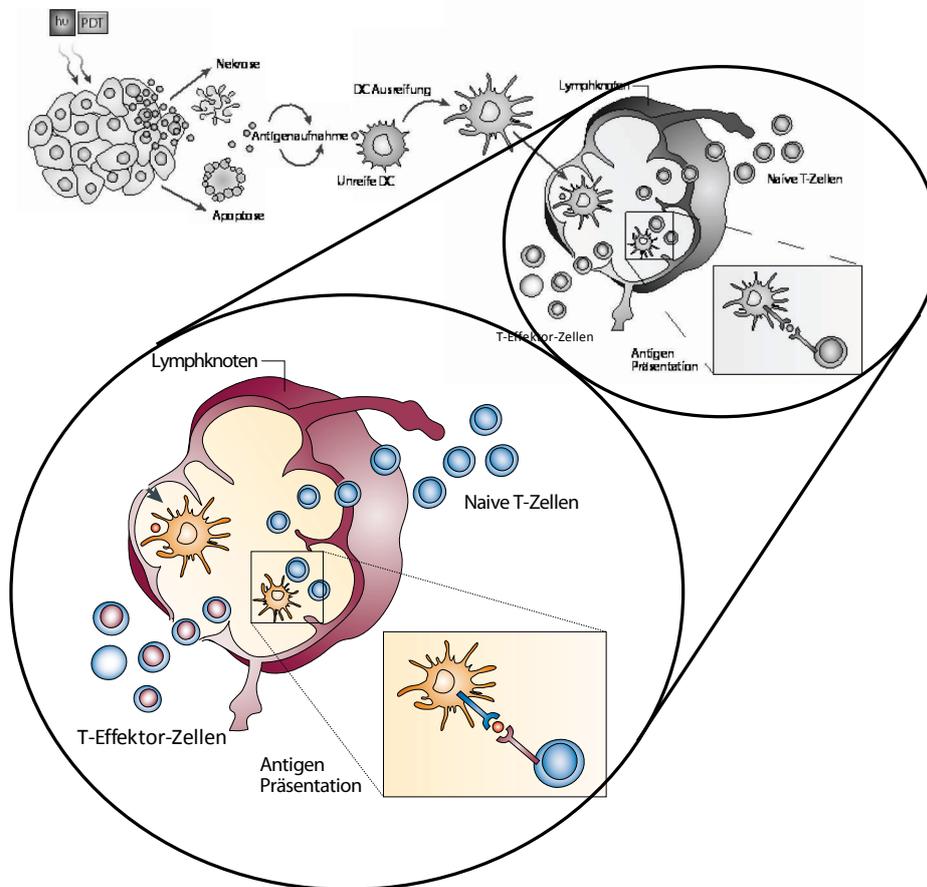


Abbildung 3.45: T-Zell-stimulatorische Aktivität der Dendritischen Zellen nach Co-Kultur mit Gliomsphäroiden. (Abbildung modifiziert nach Castano et al. [148])

3.5 HSP70 als potentes Danger-Signal?

Anhand der Daten, die in den vorherigen Experimenten gewonnen wurden, konnte die Hypothese eines immunologischen Effektes der ALA/PDT bestätigt werden. Nun sollten in einem weiteren Schritt Moleküle identifiziert werden, die für diese Effekte verantwortlich sind. Da HSP70 als potentes Danger-Signal agieren kann und im Maus-System bei einer Photofrin-vermittelten PDT mit immunologischen Effekten in Zusammenhang gebracht wurde [70, 100], wurde der Fokus weiterer Analysen auf diese Proteingruppe gelegt.

Zunächst wurde ermittelt, ob Glioblastom-Tumorsphäroide HSP70 exprimieren und ob diese mögliche Expression durch eine ALA/PDT-Behandlung beeinflusst werden kann. Als Ergebnis dieser Analysen ist zunächst einmal festzuhalten, dass unbehandelte Tumorsphäroide der Zelllinien U87 und U251 per se HSP70 auf ihrer Oberfläche exprimieren (vgl. Abbildung 3.46). Die Linie U251 exprimiert dieses Protein jedoch nur auf sehr niedrigem Niveau. Nach einer Behandlung der Sphäroide mit ALA/PDT kann für beide Zelllinien eine deutliche Zunahme der HSP70-Expression verzeichnet werden.

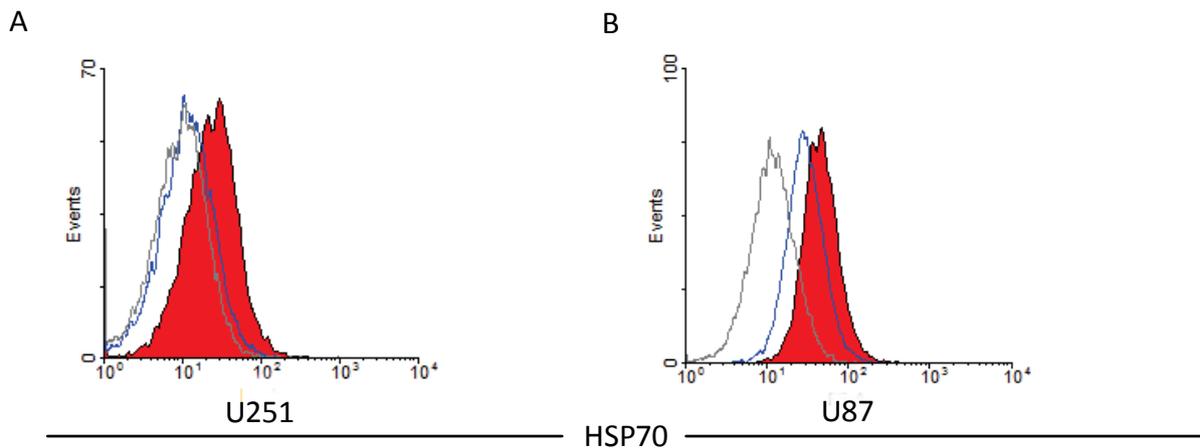


Abbildung 3.46: HSP70-Expression auf Tumorsphäroiden. Nachweis einer HSP70-Expression auf Gliomsphäroiden mittels Durchflusszytometrie. Das graue Histogramm stellt die Isotypkontrolle dar, blau repräsentiert die unbehandelten Sphäroide und rot symbolisiert die ALA/PDT-behandelten Zellen der Zelllinien U251 (A) und U87 (B). Dargestellt ist ein repräsentatives Einzelergebnis von drei unabhängigen Einzelergebnissen.

Für die Zelllinie U251 liegt die MFI der unbehandelten Zellen bei $434,0 \pm 9,292$ (MFI-PE) und wird durch eine ALA/PDT auf 800 ± 168 (MFI-PE) gesteigert ($p=0,05$; $n=3$). In Hinblick auf die HSP70 Expression kann ebenfalls eine deutliche Steigerung für U87-Zellen nach ALA/PDT verzeichnet werden. Die MFI liegt hier für die unbehandelten Sphäroide bei $604,7 \pm 144,9$ (MFI-PE) und steigt auf $978,3 \pm 207,4$ (MFI-PE) in ALA/PDT-behandelten Zellen an ($p=0,214$; $n=3$). Abbildung 3.47 fasst diese Daten zusammen.

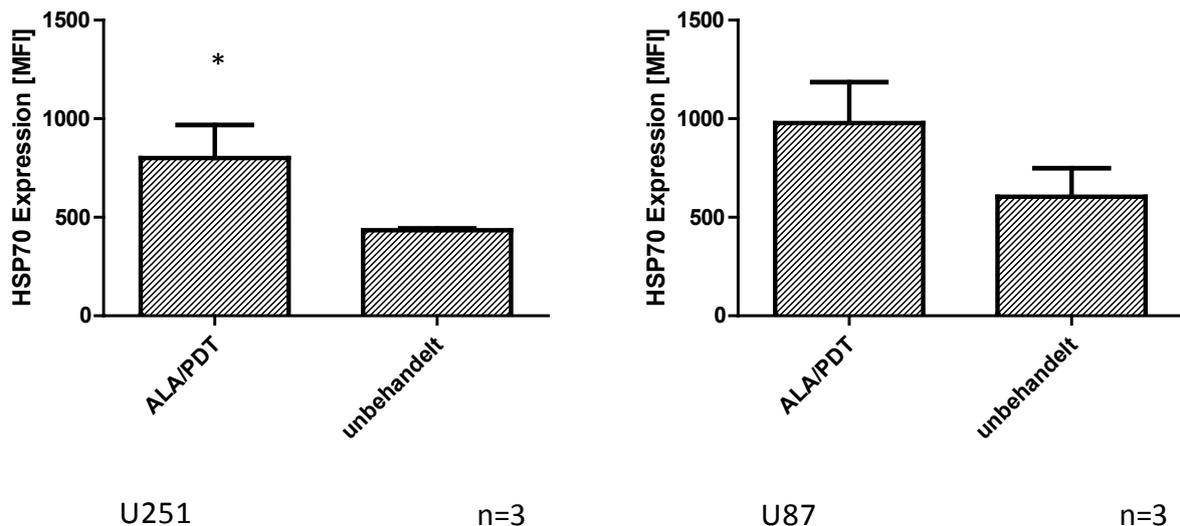


Abbildung 3.47: Induktion einer HSP70-Expression auf Gliomsphäroiden durch ALA/PDT-Behandlung. Gemessen wurde die HSP70 Expression auf unbehandelten sowie ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden der Linien U251 und U87 in drei unabhängigen Einzelergebnissen. (statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollzellen wurden kenntlich gemacht durch: * $p \leq 0,05$). Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM der MFI.

3.5.1 Reduzierte Antigenaufnahme nach HSP70-Blockierung

Da nachgewiesen werden konnte, dass die Oberflächenexpression von HSP70 auf Tumorzellen nach einer ALA/PDT-Behandlung zunimmt, sollten weitere Analysen Aufschluss darüber geben, ob HSP70 an der gesteigerten Aufnahme von Tumormaterial durch DC und die Induktion einer DC-Reifung durch ALA/PDT-behandelte Sphäroide beteiligt ist. Aufschluss hierüber sollten Blockierungsstudien geben, in denen HSP70 auf der Oberfläche der Sphäroide durch einen polyklonalen Antikörper neutralisiert wurde. Zunächst wurde die Aufnahme von Tumormaterial durch unreife Dendritische Zellen analysiert. Diese Versuche sind an die unter Abschnitt 3.4.6 beschriebenen Versuchsreihen angelehnt. Abweichend war lediglich eine Antikörper-vermittelte „Blockierung“ (Blocking) des HSP70-Moleküls auf ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden vor der Co-Kultur mit unreifen DC und der durchflusszytometrischen Bestimmung der Aufnahme von Tumormaterial durch die DC. Sphäroide beider Gruppen, die nicht mit dem Antikörper behandelt wurden, dienten als Kontrollen.

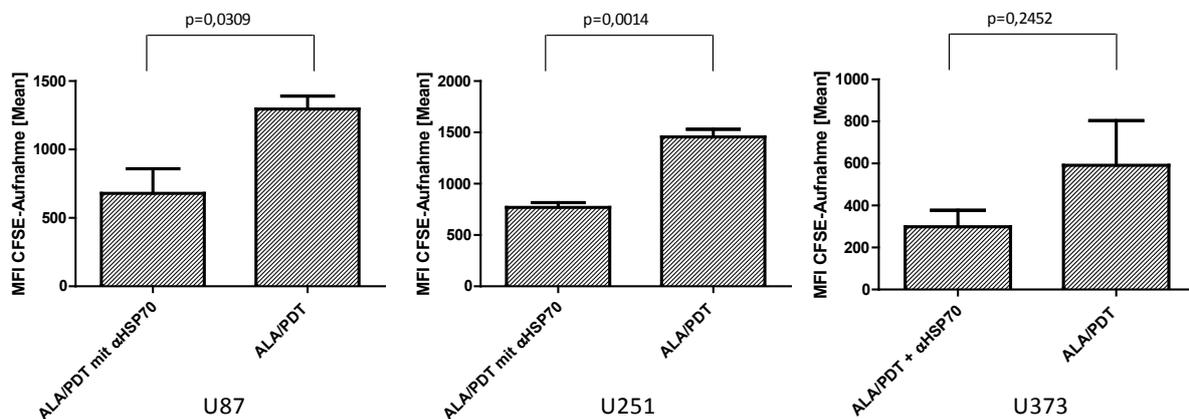


Abbildung 3.48: Reduktion der Aufnahme von Tumormaterial durch unreife Dendritische Zellen durch HSP70-Blockierung auf ALA/PDT-behandelten Sphäroiden. Ermittelt wurde die Antigenaufnahme unreifer Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit CFSE-markierten HSP70-blockierten (mit α HSP70) oder nicht blockierten ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden der Zelllinie U87, U251 und U373. Als Maß für die Aufnahme dienten die MFI-Werte (grün) der HLA-DR+ DC (rot). Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n=3$, p-Werte als Ergebnis der statistischen Überprüfung sind angegeben.

Wie Abbildung 3.48 zeigt wird durch eine Blockierung des HSP70-Moleküls eine Reduktion der Antigenaufnahme durch die Dendritischen Zellen erzielt. Nach Co-Kulturen mit ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden zeigte sich für alle Zelllinien (U87, U251 und U373) eine stärkere Antigenaufnahme durch die Dendritischen Zellen, als bei Co-Kultur mit unbehandelten Sphäroiden (Graphen der unbehandelten Sphäroide nicht gezeigt). Die ermittelten MFI-Werte dieser ALA/PDT-behandelten Sphäroide lagen bei $1295 \pm 95,27$ MFI-PE für $n=3$ (U87) und $1456 \pm 73,72$ MFI-PE für $n=3$ (U251). Durch eine Antikörper-vermittelte Blockierung des HSP70-Moleküls auf den Sphäroiden konnte eine signifikante Reduktion dieser Aufnahme von Tumormaterial verzeichnet werden. Die MFI-Werte sanken auf $679,0 \pm 180,5$ MFI-PE (U87) bzw. $769,7 \pm 46,26$ MFI-PE (U251). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die Sphäroide der Zelllinie U373 ermittelt (vgl. Abbildung 3.48). Es zeigte sich erneut, dass durch eine Blockierung von HSP70 auf den Tumorzellen die Aufnahme von Tumormaterial durch

Dendritische Zellen supprimiert wurde, auch wenn für U373-Sphäroide keine statistische Signifikanz für diesen Effekt nachgewiesen werden konnte.

Um sicher zu stellen, dass die vorangegangenen Effekte HSP70-spezifisch sind und nicht auf die Gegenwart eines Antikörpers im Versuch zurückzuführen sind, wurden die Untersuchungen um einen Kontrollversuch ergänzt. In diesem Kontrollversuch wurde die Antigenaufnahme in der Gegenwart und Abwesenheit eines irrelevanten Kontrollantikörpers verglichen.

Wie aus Abbildung 3.49 ersichtlich wird, hat die alleinige Gegenwart eines Antikörpers keinen Einfluss auf die Antigenaufnahme durch die Dendritischen Zellen. Die Aufnahme von Tumormaterial von ALA/PDT-behandelten Sphäroiden aller drei Zelllinien ist in der Anwesenheit oder Abwesenheit des Kontrollantikörpers vergleichbar.

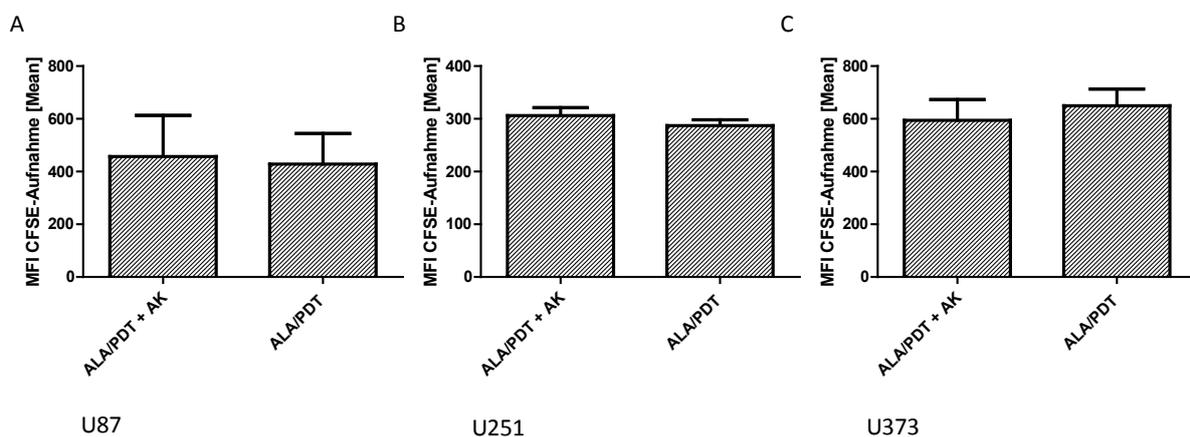


Abbildung 3.49: Aufnahme von Tumormaterial von ALA/PDT-behandelten Sphäroiden durch DC in der An- und Abwesenheit eines Kontrollantikörpers. Durchflusszytometrische Analyse der Antigenaufnahme Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden (U87 in A, U251 in B und U373 in C) in An- oder Abwesenheit eines polyklonalen Ziege-Kontrollantikörpers (+ AK). Dargestellt ist die Zusammenfassung zweier unabhängiger Einzelerperimente. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass durch die ALA/PDT-Behandlung HSP70 auf den Tumorzellen verstärkt exprimiert wird und als Opsonin für die verstärkte Aufnahme von Tumormaterial von Sphäroiden durch unreife Dendritische Zellen verantwortlich ist.

3.5.2 Inhibierung der DC-Ausreifung durch HSP70-Blockierung

Nach erfolgreicher Identifizierung von HSP70 als Opsonin für die Antigenaufnahme nach ALA/PDT-Behandlung schloss sich die Überlegung an, ob auch das durch die ALA/PDT-Behandlung generierte Reifungssignal mit HSP70 identisch ist. Folglich wurde analysiert, ob eine HSP70-Blockierung die durch ALA/PDT-Behandlung induzierte Ausreifung der DC inhibierte.

Das angewandte Prozedere glich dem in Abschnitt 3.4.7 beschriebenen Vorgehen zur Untersuchung der Ausreifung Dendritischer Zellen, einziger Unterschied war auch hier eine Antikörper-vermittelte Blockierung des Hitzeschockproteins. Nicht blockierte (ALA/PDT-behandelte) Sphäroide wurden zum Vergleich als Kontrollen herangezogen. Ansätze in der Gegenwart eines Kontrollantikörpers stellten sicher, dass mögliche Effekte der Blockierung nicht auf die alleinige Anwesenheit eines Antikörpers zurückzuführen sind.

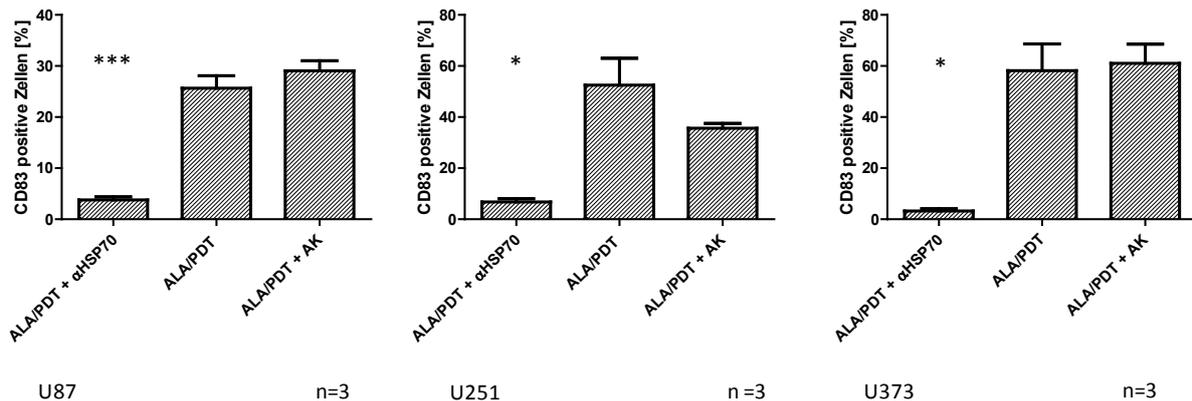


Abbildung 3.50: Hemmung der Ausreifung Dendritischer Zellen nach Co-Kulturen mit ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden durch die Blockierung von HSP70. Durchflusszytometrische Analysen Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit U87, U251 oder U373 Tumorsphäroiden (HSP70 blockiert (α HSP70), nicht blockiert sowie in Gegenwart eines Kontrollantikörpers (+ AK)) für einen Zeitraum von drei Tagen (statistisch signifikante Unterschiede zwischen HSP70-blockierten und nicht blockierten Sphäroiden wurden kenntlich gemacht durch: **- $p \leq 0,01$, *- $p \leq 0,05$). Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n=3$.

Wie aus Abbildung 3.50 ersichtlich wird, hemmt eine Blockierung des HSP70-Moleküls auf den ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden der Zelllinien U87, U251 und U373 signifikant die, durch die Sphäroide induzierte Ausreifung der Dendritischen Zellen. Dieses kann durch eine Minderung des prozentualen Anteils CD83-positiver Zellen nachgewiesen werden. Ein irrelevanter Kontrollantikörper hatte hingegen keinen Effekt auf die CD83-Frequenz der Dendritischen Zellen.

3.5.3 HSP70-Blockierung hemmt die Induktion der co-stimulatorischen Moleküle auf Dendritischen Zellen

Wie bereits erwähnt, ist nicht nur die CD83-Expression ein Indiz für die Ausreifung Dendritischer Zellen, sondern auch die Hochregulation der co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 wie sie nach Co-Kultur von unreifen Dendritischen Zellen mit ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden induziert wird.

Entsprechend wurde untersucht, ob auch die Induktion der co-stimulatorischen Moleküle durch Blockierung von HSP70 auf ALA/PDT-behandelten Sphäroiden der Zelllinien U87, U251 und U373 gehemmt werden kann. Die MFI diente hierbei als Maß der Expressionsstärke des jeweiligen co-stimulatorischen Moleküls.

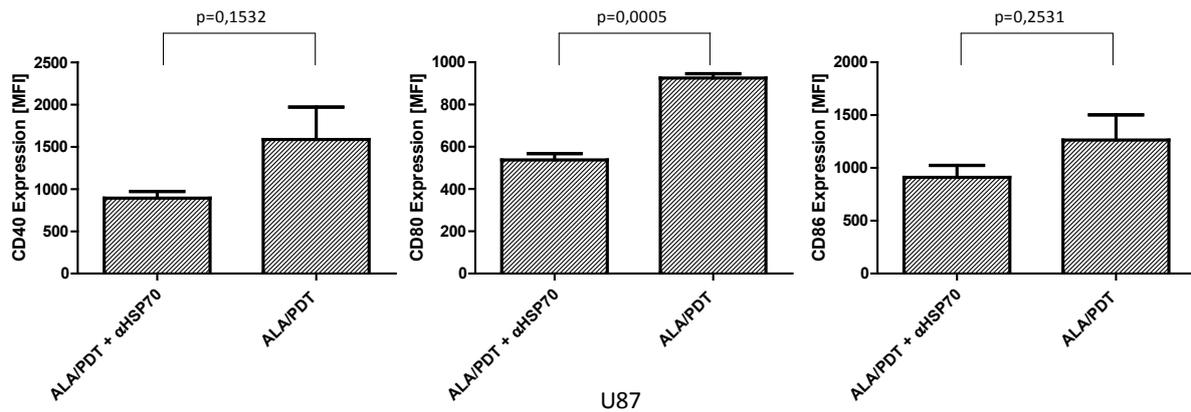


Abbildung 3.51: Hemmung der Expression co-stimulatorischer Moleküle auf Dendritischen Zellen durch Blockierung von HSP70 auf ALA/PDT-behandelten U87-Sphäroiden. Durchflusszytometrische Analysen co-stimulatorischer Moleküle auf Dendritischen Zellen nach Co-Kultur mit U87-Tumorsphäroiden (HSP70 blockiert und nicht blockiert) für einen Zeitraum von drei Tagen. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n=3$, p-Werte als Ergebnis der statistischen Überprüfung sind angegeben.

Nach der Co-Kultivierung unreifer Dendritischer Zellen mit ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden der Zelllinie U87 über einen Zeitraum von drei Tagen konnte eine deutliche Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 nachgewiesen werden. Durch eine Antikörpervermittelte Blockierung des HSP70-Moleküls auf den Tumorsphäroiden wird diese deutlich gehemmt, wenn auch nur für CD80 statistische Signifikanz erreicht wurde (vgl. Abbildung 3.51).

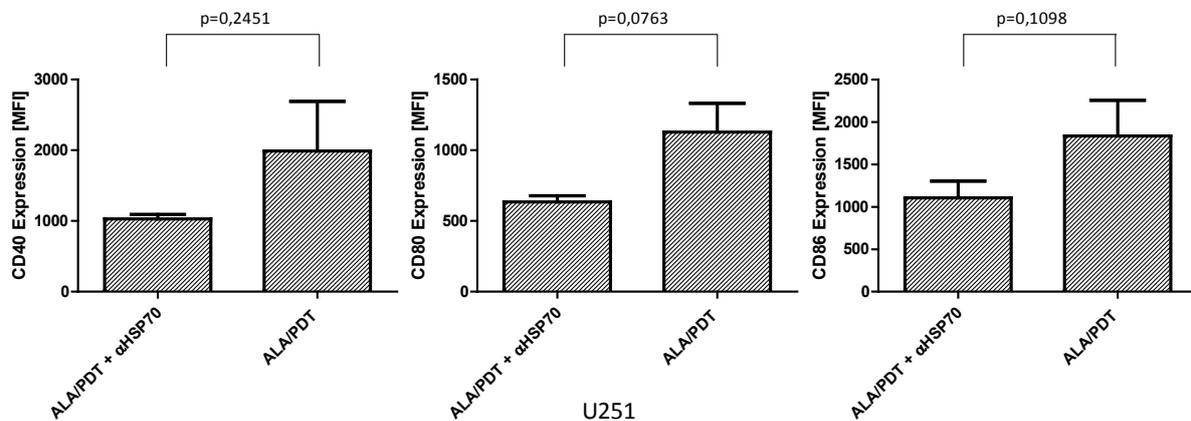


Abbildung 3.52: Hemmung der Expression co-stimulatorischer Moleküle auf Dendritischen Zellen durch Blockierung von HSP70 auf ALA/PDT-behandelten U251-Sphäroiden. Durchflusszytometrische Analysen co-stimulatorischer Moleküle auf Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit U251-Tumorsphäroiden (HSP70 blockiert und nicht blockiert) für einen Zeitraum von drei Tagen. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n=3$, p-Werte als Ergebnis der statistischen Überprüfung sind angegeben.

Nach Co-Kultivierung der Dendritischen Zellen mit ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden der Zelllinien U251 ergab sich ein vergleichbares Bild. Die bereits für U87-Sphäroide beobachtete Hemmung der Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 nach HSP70-Blockierung konnte hier erneut nachgewiesen werden. Abermals wird nicht immer statistische Signifikanz er-

reicht. Abbildung 3.52 zeigt graphisch die Zusammenfassung der drei unabhängigen Einzelexperimente nach einer Co-Kultur der DC mit U251-Tumorsphäroiden.

Abbildung 3.53 stellt die Ergebnisse nach Co-Kultur mit U373-Sphäroiden dar. Hier kann nach HSP70-Blockierung für alle analysierten co-stimulatorischen Moleküle eine signifikante Reduktion der Expressionsstärke nach Blockierung von HSP70 auf den ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden nachgewiesen werden.

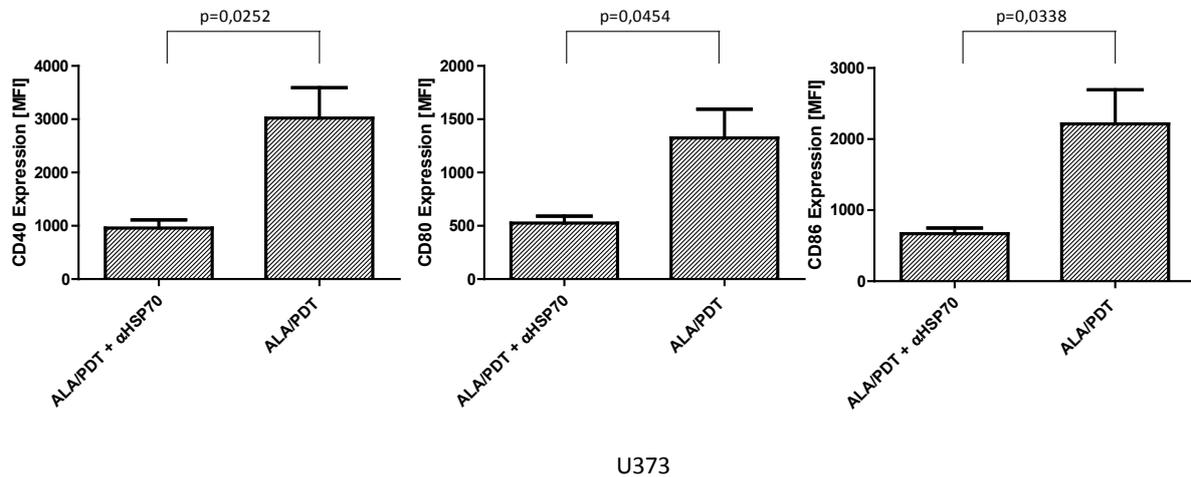


Abbildung 3.53: Hemmung der Expression co-stimulatorischer Moleküle auf Dendritischen Zellen durch Blockierung von HSP70 auf ALA/PDT-behandelten U373-Sphäroiden. Durchflusszytometrische Analysen co-stimulatorischer Moleküle auf Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit U373-Tumorsphäroiden (HSP70 blockiert und nicht blockiert) für einen Zeitraum von drei Tagen. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n=3$.

Somit konnte für alle drei Zelllinien gezeigt werden, dass auch an der Hochregulation der co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 die Induktion von HSP70 auf den Gliomzellen durch die ALA/PDT-Behandlung beteiligt ist.

4 Diskussion

4.1 Einfluss der ALA/PDT-Behandlung auf das Migrationsverhalten von Gliomsphäroiden

Trotz optimaler klinischer Betreuung und fortschrittlicher Therapiekonzepte ist die Prognose für Glioblastom-Patienten äußerst schlecht. Als ausgesprochen problematisch erweist sich vor allem das invasive Wachstumsverhalten der Glioblastomzellen, welche gesundes Gehirngewebe infiltrieren. Dieses invasive Wachstum macht eine vollständige Resektion eines Glioblastoms praktisch unmöglich. Invasives Wachstum entsteht in Folge einer kontinuierlichen Interaktion zwischen Tumorzellen und einem großen Netzwerk Tumor-assoziiierter Wirtszellen. Weitreichende molekulare sowie zelluläre Veränderungen, einschließlich der Tumorzell-Interaktion mit ECM-Liganden (Adhäsionsmoleküle), der hydrolytischen Zerstörung der Matrix durch die Freisetzung proteolytischer Enzyme sowie Migration der Tumorzellen durch die zerstörten Areale, ermöglichen letztendlich die Invasion [149].

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass eine ALA-basierte photodynamische Behandlung der Tumorsphäroide das Migrationsverhalten der Tumorzellen signifikant hemmt. Vergangene Studien in unserem Labor verdeutlichten weiter, dass das Invasionsverhalten der ALA/PDT-behandelten Sphäroide ebenfalls beeinträchtigt wird. Die Invasion der Zellen in eine Collagen-Matrix war nach ALA/PDT-Behandlung signifikant reduziert [147].

Diese Ergebnisse gehen mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen konform. Jiang et al. zeigten, dass eine Photofrin-basierte photodynamische Therapie die Invasivität von U87- und U251-Tumorzellen signifikant inhibiert [150]. Auch für andere Tumorentitäten konnte dieses belegt werden. Die ALA/PDT führte sowohl in Adenokarzinomzellen der Lunge (CL1-5), Melanomzellen (A375), Brustkarzinomzellen (MDA-MB-231) [151], als auch in der humanen Gliomzelllinie ACBT zu einer signifikanten Reduktion der Invasivität [152]. Der Mechanismus hinter dieser reduzierten Invasivität nach ALA/PDT konnte bislang noch nicht vollständig geklärt werden.

4.1.1 Matrix Metalloproteine

Der Prozess der Invasion, in den zahlreiche Moleküle wie Adhäsionsmoleküle, Proteasen, kleine G-Proteine, Wachstumsfaktoren sowie Zytoskelett-Proteine involviert sind, kann in mehrere Schritte unterteilt werden [153]. Hierzu zählen Zell-Adhäsion, Disadhäsion und vorrangig die enzymatische Degradierung der ECM-Komponenten.

Eine essentielle Gruppe proteolytischer Enzyme, die maßgeblich an der Invasion beteiligt sind, stellen die Matrix Metalloproteinasen dar. Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass MMP in humanen Glioblastom-Zelllinien exprimiert werden.

Nuttall et al. wiesen bereits 2003 die Expression zahlreicher MMPs in 21 Glioblastom-Zelllinien, darunter U87, U251 und U373, mittels quantitativer Real-Time PCR nach [154].

Eine Veröffentlichung von Hagemann et al. im Jahr 2010 fasst das Expressionsmuster von Matrix Metalloproteinasen in humanen Glioblastom-Zelllinien, aber auch in Primärkulturen anschaulich zusammen [18].

Die Expressionsdaten der MMPs in U373 Glioblastomzellen in der Arbeit von Hagemann et al. entsprechen weitestgehend den Ergebnissen, die in dieser Dissertation gewonnen werden konnten. So berichtet die Gruppe unter anderem von einer Expression von MMP-1, -2, -3, -7, -11 und 13 wogegen MMP-12 nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse decken sich mit den hier erhaltenen Ergebnissen für unbehandelte Glioblastom-Sphäroide. Unterschiedliche Daten wurden jedoch für die MMPs -8 und -9 beobachtet. Hagemann et al. zeigten in ihrer Arbeit keine Expression von MMP-8. Für die Matrix Metalloproteinase-9 waren die Angaben heterogen – nicht immer konnte MMP-9 detektiert werden [155-157]. In der vorliegenden Arbeit war MMP-8 nachweisbar, nicht jedoch MMP-9. Möglicherweise lässt sich diese Diskrepanz dadurch erklären, dass die Expression von MMPs abhängig von der Anzahl der Passage einer Zellkultur sein kann. Dieser Zusammenhang wurde bereits in der Literatur beschrieben. MMPs, die in frühen Passagen detektiert werden konnten, erwiesen sich mit zunehmender Passagenzahl als nicht mehr nachweisbar [158]. Möglicherweise beeinflusst aber auch das Kulturverfahren, Monolayer bzw. Sphäroid-Kulturen, das MMP-Expressionsprofil.

Zwei MMPs werden in direkten Zusammenhang mit dem invasiven Verhalten von Gliomen genannt. Bei diesen beiden Vertretern handelt es sich um MMP-2 und MMP-9, deren Aktivität mit einer Gliominvasion korreliert [159, 160]. Daher waren diese MMPs von gesteigertem Interesse im Kontext unserer Analysen. Au et al. zeigten eine PDT-vermittelte Reduktion dieser Matrix Metalloproteinasen, die auch von einer weiteren Arbeitsgruppe für eine andere Tumorentität, dem Medullablastom, bestätigt werden konnte. Verwendet wurden unterschiedliche Photosensitizer, darunter ALA, Photofrin und Calphostin C [161, 162]. Die Herunterregulation der MMPs als Konsequenz einer PDT-Behandlung könnte möglicherweise maßgeblich an der beschriebenen Hemmung der Invasivität nach PDT beteiligt sein.

Eine ALA/PDT-Behandlung der Gliomsphäroide der Linien A172 und U373 resultierte in unseren Experimenten in einer Herunterregulation von MMP-7 und -8. Dazu finden sich in der Literatur bislang keine weiteren Analysen. Eine Veränderung von MMP -2 und -9 wurde nicht beobachtet. Ob eine funktionelle Beteiligung der MMPs -7 und -8, ähnlich der, für die MMPs-2 und -9 bereits nachgewiesenen, an der Invasivität von Gliomzellen vorliegt, muss durch weiterführende Analysen geklärt werden.

4.1.2 Morphologische Veränderungen nach ALA/PDT-Behandlung

Eine weitere Voraussetzung für die Invasion und Migration von Tumorzellen ist die Fortbewegungsfähigkeit der einzelnen Zellen. Um diese zu gewährleisten, sind einige Veränderungen der Zelle unerlässlich. Modifikationen des Zytoskeletts und assoziierter Proteine, wie Aktin, sind essentiell für die Zellmigration. Interaktionen zwischen Aktin und Integrinen sowie anderen Adhäsionskomplexen initiieren hierbei die Umgestaltung des Zytoskeletts [163].

Nach der Ermittlung des Status quo in unbehandelten Tumorsphäroiden der Zelllinien A172 und U373 konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Behandlung dieser Zellen mit ALA/PDT eine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts induziert. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen verdeutlichten eine Umlagerung bzw. Reduktion des Aktins in den Zell-Ausläufern, in den sogenannten „Growth Cones“. Diese Beobachtungen stimmen mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen überein. Uzdensky et al. zeigten eine Abnahme des Aktin-Gehaltes, einschließlich morphologischer Veränderungen durch Rückbildung der Zell-Ausläufer, nach ALA/PDT-Behandlung von D54Mg

Glioblastomzellen [164]. Tsai et al. beschrieben eine Umorganisation des Zytoskeletts von longitudinalen Aktin-Fasern zu kortikalem Aktin nach ALA/PDT in Lungenadenokarzinomzellen, Melanomzellen und Brustkarzinomzellen [151]. Zusätzlich konnte auch in diesen eine Änderung der Morphologie der Zellen beobachtet werden.

Auch hier wurde eine Veränderung der Morphologie bestätigt. Vor allem für U373-Zellen trat eine starke Veränderung der Morphologie auf, insbesondere, wenn die Zellen mehreren Behandlungszyklen unterworfen wurden. Auch nach mehrfacher ALA/PDT-Behandlung schienen sich dabei keine Resistenzmechanismen gegenüber der ALA/PDT-Behandlung auszubilden. Diese Beobachtung wird durch die Arbeit anderer Arbeitsgruppen gestützt. So führten beispielsweise Madsen et al. repetitive ALA/PDT-Behandlungszyklen an humanen Glioblastomsphäroiden durch. Dabei simulierten sie die Konditionen, die typischerweise in 1 – 2 cm Entfernung vom Haupttumor anzutreffen sind. Nach multipler PDT-Behandlung wiesen sie eine signifikante Inhibierung des Tumorwachstums nach. Es konnte kein Indiz für eine Resistenz gegenüber den photodynamischen Effekten ermittelt werden [165]. Im Kontext dieser Dissertation wurde eine Veränderung der Morphologie von einem eher spindelförmigen Erscheinungsbild mit länglichen Ausläufern der unbehandelten Zellen zu einem nahezu epithelialen Erscheinungsbild nach der Behandlung festgestellt. Diese Veränderungen schienen längerfristiger Natur zu sein, da sie sich über einen Zeitraum von mindestens 10 Tagen als stabil erwiesen. Auch Tsai et al. konnten dauerhafte morphologische Veränderungen in Lungen-Adenokarzinomzellen (CL1-5), Melanomzellen (A375) und Brustkarzinomzellen (MDA-MB-231) nach multipler ALA/PDT-Behandlung nachweisen. Im Vergleich zu der fibroblastoiden Morphologie der Parentalzellen wiesen die behandelten Zellen ein polygonales Erscheinungsbild auf [151].

4.1.3 EMT im Kontext invasiver Prozesse

Ein Prozess, der im Zusammenhang mit der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen immer weiter in den Fokus der Forschung rückt, ist die sogenannte Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT). Dieser temporäre und reversible Mechanismus kann neben der Tumordinvasion und -metastasierung auch in physiologischen Entwicklungsschritten, wie der Gastrulation, beobachtet werden und zeichnet sich durch weitreichende molekulare Veränderungen aus. Ein Attribut dieses Prozesses ist beispielsweise der „Cadherin-Switch“, der sich durch den Verlust des epithelialen Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin sowie der Induktion des mesenchymalen Adhäsionsmoleküls N-Cadherin auszeichnet [166-170]. Im Kontext dieser Dissertation konnte eine konträre Entwicklung, entsprechend des umgekehrten MET-Prozesses, verzeichnet werden. Besonders die Zellen der Linie U373 zeigten nach einer ALA/PDT-Behandlung eine deutliche Veränderung, von einem eher mesenchymalen zu einem fast epithelialen Erscheinungsbild. Zusätzlich konnte in U87-Tumorsphäroiden eine Induktion der E-Cadherin-Expression nach ALA/PDT nachgewiesen werden. Auch für die Linien U251 und U373 war eine solche Induktion, wenn auch schwächer ausgeprägt, nachweisbar. Auf die Expression von N-Cadherin und Vimentin, einem mesenchymalen Adhäsionsmolekül sowie einem Zytoskelettprotein mesenchymaler Zellen, hatte die Photodynamische Therapie mit ALA keinen Einfluss. Somit konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals MET-ähnliche Veränderungen beschrieben werden, die mit einer reduzierten Migration und Invasivität der Zellen einherging. Interessanterweise ist bei Karzinomen der umgekehrte Prozess, die EMT, mit der Metastasierung assoziiert.

In wieweit unsere Beobachtungen aber funktionell mit einer reduzierten Migration bzw. Invasion nach photodynamischer Therapie mit ALA assoziiert werden kann, müssen zusätzliche Experimente klären.

4.1.4 Unverändertes Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen nach Photodynamischer Therapie der Glioblastomzellen

Einen weiteren wichtigen Stellenwert im Hinblick auf die Invasivität nehmen Adhäsionsmoleküle ein. Daher wurde eine Analyse der Expression von Integrinen durchgeführt. Im Gegensatz zu Au et al., die eine reduzierte Expression von CD29, CD44 und CD49c in Glioblastomzellen (U87 und GB6840) nach photodynamischer Therapie mit diversen Photosensitizern zeigen konnten [161] gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht eine signifikante Veränderung der Expression nach ALA/PDT nachzuweisen. Möglicherweise scheinen hier andere Prozesse involviert zu sein, die einer weiterführenden Analyse bedürfen oder die jeweils gewählten experimentellen Bedingungen sind für die Unterschiede verantwortlich.

4.2 Immunogenes Potential der ALA/PDT

Die Photodynamische Therapie wurde zunächst als ein Verfahren mit lokaler Wirkung angesehen, die eine inflammatorische Antwort vor Ort generiert. Erst nachfolgende Studien gaben Aufschluss über das eigentliche Potential der PDT und identifizierten diese als eine Therapie, die sich, über lokale Effekte hinausgehend, durch eine systemische Wirkung auszeichnet.

Zahlreiche Anhaltspunkte deuten darauf hin, dass eine immunologische Komponente an der Wirkung der PDT bei extrakraniellen Tumoren maßgeblich beteiligt zu sein scheint [148]. Im Rahmen zahlreicher Studien konnte gezeigt werden, dass unmittelbar nach einer PDT-Behandlung eine Infiltration neutrophiler Granulozyten, Mastzellen, Monozyten und Makrophagen in das Tumorgewebe erfolgt. Verdeutlicht wurde dies anhand von Maus-Modellen, die beispielsweise mit einem Mammaskarzinom (EMT6) oder Plattenepithelkarzinom (SCCVII) beimpft wurden. Nach anschließender PDT-Behandlung mit Photosensitizern wie Photofrin oder mTHPC konnte eine sofortige Invasion neutrophiler Granulozyten, gefolgt von Mastzellen, Monozyten und Makrophagen dokumentiert werden [68, 171-173].

Weiterhin wurde berichtet, dass eine Antikörper-vermittelte Depletion von Neutrophilen sowie eine Inaktivierung von Makrophagen in Tumor-beimpften Mäusen und Ratten die tumorale Antwort nach PDT merklich reduziert [174, 175]. Diese Resultate weisen darauf hin, dass eine Beteiligung der angeborenen Immunität unerlässlich für die Effizienz einer PDT-Behandlung zu sein scheint.

Nun ist die Frage naheliegend, wodurch diese Invasion der Immuneffektor-Zellen der angeborenen Immunität in das Tumorgewebe verursacht wird. PDT induziert inflammatorische Veränderungen, die durch eine erhöhte Expression zahlreicher pro-inflammatorischer Zytokine charakterisiert sind. Zu diesen zählen unter anderem Interleukin-1 β , Tumornekrosefaktor-alpha, Interleukin-6, Interleukin-10 sowie das Chemokin Interleukin-8 (oder MIP-2 (*macrophage inflammatory protein*)) [67-69, 176-178]. Diese Faktoren sind auch bei Entzündungsreaktionen im Rahmen der frühen induzierten Immunantwort, wie sie beispielsweise bei Infektionen auftreten, beteiligt. Sie bewirken, dass Effektor-

zellen vermehrt zum Infektionsort rekrutiert werden, in dem u.a. Veränderungen an Gefäßen induziert werden, die einen vermehrten Übertritt der Zellen aus dem Blut in das Gewebe nach sich ziehen, und Gradienten aufbauen, an denen entlang die Zellen zum Infektionsort migrieren.

Die Analysen im Kontext der vorliegenden Dissertation beschränkten sich auf die Analysen von Chemokinen und identifizierte IL-8, nicht jedoch zahlreiche andere Chemokine, im Kulturüberstand der Sphäroide. Da jedoch kein Unterschied zwischen unbehandelten und ALA/PDT-behandelten Sphäroiden der Zelllinien U251 und U373 auftrat, müssen andere Faktoren an solchen Effekten beteiligt sein.

4.2.1 Beteiligung des adaptiven Immunsystems

Die angeborene Immunität ist jedoch nicht die einzige Komponente des Immunsystems, die durch eine PDT-Behandlung angesprochen wird. So zeigten sich bedeutende Unterschiede zwischen der anti-tumoralen Antwort, die durch PDT induziert wurde, in immunkompetenten Mäusen im Vergleich zu immundefizienten Mäusen. Korbely et al. beimpften immunkompetente BALB/c Mäuse und immundefiziente NOD/SCID- und Nude-Mäuse mit EMT6 Tumorzellen. Nude-Mäuse sind durch das Fehlen des Thymus und damit einhergehenden der T-Zellen charakterisiert. NOD/SCID-Mäuse zeichnen sich aufgrund eines Rekombinase mangels durch ein vollständiges Fehlen von T- und B-Zellen aus. Nach einer Photofrin-vermittelten Photodynamischen Therapie konnte in allen Maus-Modellen ein vergleichbares Niveau des akkumulierten Photosensitizers festgestellt werden. Innerhalb der immunkompetenten Maus-Gruppe wurde eine hohe Ansprechrate auf die PDT-Behandlung und die Induktion anti-tumoraler Effekte nachgewiesen. Gegensätzlich hierzu gestalteten sich die Resultate der immundefizienten Mäuse, die sich durch das Ausbleiben anti-tumoraler Effekte auszeichneten [63]. Auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen [179, 180] stimmen mit der Beobachtung überein, dass die adaptive Immunität und insbesondere T-Zellen eine essentielle Rolle bei PDT-induzierten anti-tumoralen Effekten spielen.

Bevor es jedoch zu einer Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunantwort kommt, müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein. Generell bedarf es einer Aktivierung der Dendritischen Zellen. Unreife Dendritische Zellen müssen in der afferenten Phase der Immunantwort für das Geschehen sensibilisiert werden. Eine Migration der Dendritischen Zellen in Richtung des Tumors ist ein erster elementarer Schritt. Ihm muss eine Aufnahme von Tumormaterial durch die Dendritischen Zellen folgen. Durch lokale Danger-Signale muss anschließend die Ausreifung der Dendritischen Zellen induziert werden, welche letztlich in einer Migration der Dendritischen Zellen in nahegelegene Lymphknoten und einer Präsentation von Tumorantigenen in Form von Peptiden über HLA-Klasse I und II Molekülen im Kontext von Adhäsions- und co-stimulatorischen Molekülen resultiert. Diese Präsentation ist die Basis für die Erkennung durch Peptid-spezifische T-Zellen und ihre Aktivierung, Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen, die dann die spezifische anti-tumorale Immunantwort vermitteln. Nur wenn eine PDT-Behandlung diese initialen Schritte einer DC-Aktivierung in der afferenten Phase induzieren kann, kann sie zu einer anti-tumoralen T-Zell-Antwort führen [71, 181-183]. Dieser Zusammenhang wird insbesondere durch die Arbeit von Preise et al. bestätigt, die zeigen konnten, dass eine Depletion von Dendritischen Zellen vor einer WST11-vermittelten PDT in einem CT26 Kolonkarzinommodell zu einer erhöhten Rezidivrate nach PDT führt [180].

4.2.2 Induktion der Migration von Dendritischen Zellen und der Antigenaufnahme infolge einer ALA/PDT

Fraglich war zunächst, ob Tumorsphäroide bzw. ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide chemoattraktiv für unreife Dendritische Zellen sind. Folglich wurden verschiedene Sphäroid-Präparationen als „Target“ für die Migration unreifer Dendritischer Zellen eingesetzt. Zwar konnte für alle Sphäroid-Präparationen (ALA/PDT, nur ALA, nur bestrahlt, unbehandelt) beobachtet werden, dass eine Migration der Dendritischen Zellen in Richtung „Target“ stattfand, diese war für ALA/PDT-behandelte Sphäroide jedoch signifikant stärker ausgeprägt.

Diese Ergebnisse passen gut zu den eingangs erwähnten Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. Diese konnten anhand von Maus-Modellen, die beispielsweise mit einem Mammaskarzinom (EMT6) oder Plattenepithelkarzinom (SCCVII) beimpft wurden, zeigen, dass unmittelbar nach einer PDT-Behandlung eine Infiltration neutrophiler Granulozyten, Mastzellen, Monozyten und Makrophagen in das Tumorgewebe erfolgt [68, 171-173], d.h. auch für andere Zellen wurde nach PDT eine erhöhte Chemoattraktion nachgewiesen.

Weitere Daten über PDT-behandelte Tumorzellen, die als Vakzine dienen, die anhand von Plattenepithelkarzinom- (SCCVII) sowie Lewis Lungenkarzinom-Modellen gewonnen werden konnten, bestätigen auch für Dendritische Zellen die Beobachtungen, die in der vorliegenden Arbeit gemacht wurden. So zeigten Korbely et al., dass es *in vivo* zu einer aktiven Migration der Dendritischen Zellen in Richtung der Tumorzellen kommt. Eine Stunde nach der Vakzinierung konnten an den Vakzinierungsstellen neben den Tumorzellen eine große Anzahl Dendritischer Zellen nachgewiesen werden [100].

Die durch die ALA/PDT gesteigerte Attraktivität des Tumorgewebes für Dendritische Zellen führt somit zu einer Anreicherung von Dendritischen Zellen in der Nähe des Tumors. Der nächste Schritt der afferenten Phase der adaptiven Immunantwort ist nun die Aufnahme von Tumorantigenen. Zunächst wurde deshalb geprüft, ob die Nähe der Tumorzellen möglicherweise mit der funktionellen Aktivität von unreifen Dendritischen Zellen interferiert und ob die ALA/PDT-Behandlung gegebenenfalls hierauf einen Einfluss hat.

Alle unreifen Dendritischen Zellen, die in der Gegenwart der verschiedenen Sphäroid-Präparationen generiert wurden, können als funktionell kompetent betrachtet werden, da sie die für unreife DC charakteristische Pinozytoseaktivität besaßen. Ein Unterschied in der Antigenaufnahmeaktivität der Dendritischen Zellen, in Abhängigkeit von der Behandlung der Sphäroide, konnte dagegen nicht festgestellt werden. Tumoren beeinflussen die anti-tumorale Immunantwort auf vielfältige Weise und können sich durch sogenannte Immune Escape Mechanismen einer gegen sie gerichteten Immunantwort entziehen [184-186]. Ein Effekt der Tumorzellen auf die Antigenaufnahmeaktivität unreifer DC und deren funktionelle Kompetenz konnte nicht festgestellt werden.

Im folgenden Schritt galt es nun zu klären, ob auch Tumormaterial von den Sphäroiden aufgenommen wird und ob die Behandlung der Sphäroide diese Aufnahme beeinflusst, d.h. ob es einen Effekt der ALA/PDT-Behandlung auf die Attraktivität der Tumorzellen für eine Aufnahme durch unreife Dendritische Zellen gibt.

Die Dendritischen Zellen zeigten nach Co-Kultur mit Tumorsphäroiden der Zelllinien U87, U251 und U373 eine Aufnahme von Tumormaterial. Das Maß der Aufnahme erwies sich jedoch als unterschied-

lich. Für alle drei Zelllinien zeigte sich, dass die unreifen DC im Vergleich aller Sphäroid-Präparationen mehr Tumorantigenen aufnahmen, wenn sie mit ALA/PDT-behandelten Sphäroiden co-kultiviert worden waren. Diese gesteigerte Aufnahme von Tumormaterial von ALA/PDT-behandelten Sphäroiden ist nicht auf eine erhöhte Antigenaufnahmeaktivität der DC nach Co-Kultur zurückzuführen, wie die zuvor beschriebenen Experimente belegen. Vielmehr scheinen die Sphäroide durch die ALA/PDT-Behandlung attraktiver für eine Aufnahme zu werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass durch eine ALA/PDT-Behandlung Nekrose induziert wurde und nekrotische Zellen über Rezeptoren wie CD36 und CD91 auf Dendritischen Zellen erkannt und bevorzugt aufgenommen werden [187-189].

Auch die Arbeit von Gollnick et al. weist in die Richtung, dass PDT-behandelte Tumorzellen attraktiver für Dendritische Zellen werden. Sie zeigten, dass Lysate von Photofrin-PDT-behandelten Mausemumorzellen als prophylaktische Vakzine eingesetzt werden können, um die Mäuse vor der Entstehung eines Tumors zu schützen. Dazu inkubierten sie EMT6-Zellen (Mammasarkom) oder P815-Zellen (Mastozytom) mit Photofrin, bestrahlten sie und gewannen ein Lysat, mit dem sie anschließend Mäuse impften. Diese Impfung führte zu einem signifikanten Schutz der Tiere vor tumorigenen Dosen an EMT6- sowie P815-Zellen [190]. Für einen solchen Schutz, mussten die DC in vivo vom Lysat Tumorantigene aufgenommen haben. Gleiches gilt für entsprechende Vakzinestudien an Plattenepithelkarzinom- (SCCVII) sowie Lewis Lungenkarzinom-Modellen. Auch hier impliziert die Induktion einer Immunantwort die vorangegangene Aufnahme von Tumorantigenen durch DC [100].

Hinweise für eine Aufnahme von Tumorantigenen durch DC nach PDT kommen auch von Studien, in denen DC nach einer PDT-Behandlung in den Tumor injiziert wurden. So konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte Immuntherapie, bestehend aus PDT-Behandlung und folgender intratumoraler Injektion von Dendritischen Zellen, eine anti-tumorale Immunantwort induzieren kann. Dieses wurde für unterschiedliche Photosensitizer, darunter ALA, Photofrin und ATX-S10Na(II), unterschiedliche Maus- und Rattenmodelle sowie verschiedene Tumorentitäten, einschließlich Kolorektalkarzinom, Melanom und Mammakarzinom beschrieben [71, 191, 192].

Diese Daten belegen für andere Tumorentitäten und andere Photosensitizer, insbesondere im Mausmodell, die Beobachtungen der vorliegenden Dissertation, dass ALA/PDT-behandelte humane Glioblastom-Sphäroide eine Attraktanz für die Migration Dendritischer Zellen darstellen und Tumorantigene von derart behandelten Sphäroiden effizient aufgenommen werden. Allerdings reichen gerichtete Migration sowie Antigenaufnahme durch Dendritische Zellen nicht zwangsläufig aus, um eine Immunantwort zu initiieren. Es kann sogar zur Ausbildung immunologischer Toleranz kommen, wenn eine weitere Aktivierung der unreifen Dendritischen Zellen unterbleibt [193-196].

4.2.3 ALA/PDT-behandelte Gliomzellen induzieren die Ausreifung Dendritischer Zellen

Durch sogenannte Danger-Signale wird die Ausreifung der Dendritischen Zellen induziert, die nachfolgend als reife Dendritische Zellen eine T-Zell-Aktivierung initiieren können. Ob diese Schritte auch durch ALA/PDT-behandelte Gliomsphäroide induziert werden, wurde in weiteren Analysen geklärt.

Durch Co-Kultivierung von unreifen Dendritischen Zellen mit den unterschiedlichen Sphäroid-Präparationen konnte in der vorliegenden Arbeit die Erkenntnis gewonnen werden, dass ALA/PDT-

behandelte Tumorsphäroide aller Zelllinie einen deutlichen Ausreifungsstimulus darstellen. Es konnte neben einer gesteigerten Expression des Ausreifungsmarkers CD83 eine deutliche Zunahme der Expressionsdichte der co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 nachgewiesen werden. Diese phänotypischen Merkmale reifer Dendritischer Zellen wurden weiter dadurch bestätigt, dass die Dendritischen Zellen auch eine gesteigerte T-Zell-stimulatorische Aktivität aufwiesen und somit auch funktionell reifen Dendritischen Zellen entsprachen. Keine der anderen Sphäroid-Präparationen resultierte in der Induktion des Ausreifungsmarkers CD83 sowie einer höheren Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86.

Dass PDT-behandelte Tumorzellen die Ausreifung Dendritischer Zellen stimulieren können, zeigten auch andere Arbeitsgruppen. So wurde beschrieben, dass PDT-behandelte Tumorzellen eine Sekretion des Zytokins IL-12 durch Dendritische Zellen nachgewiesen werden konnte. Hierbei handelt es sich um ein Zytokin, welches von aktivierten Dendritischen Zellen sezerniert wird und eine zentrale Rolle in der Entwicklung einer T_{H1} -Antwort und damit der zellulären Immunität spielt. Dazu wurden unreife Dendritische Zellen mit PDT-behandelten C-26-Zellen (Kolonadenokarzinom) co-kultiviert. Als Photosensitizer wurde Photofrin genutzt [71]. Auch Gollnick et al. beschrieben im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen eine Sekretion von Interleukin-12 durch DC sowie eine Expression von CD86 und HLA-Klasse-II auf der Oberfläche der DC nach Co-Kulturen mit EMT6- (Mammasarkom) und P815-Zellen (Mastozytom), die einer Photofrin-vermittelten PDT-Behandlung unterzogen worden waren [190].

Die bereits im Zusammenhang mit einer gerichteten Migration der unreifen Dendritischen Zellen in Richtung des Tumors und der Aufnahme des Tumormaterials nach PDT beschriebenen Daten, können hier erneut aufgegriffen werden, da in diesen Studien deutlich herausgestellt werden konnte, dass PDT-behandelte Tumorzellen als Vakzine eine anti-tumorale Immunität induzieren. Die Induktion von Immunität beinhaltet nämlich nicht nur die Migration Dendritischer Zellen und die Aufnahme des Tumormaterials durch Dendritische Zellen, sondern sie impliziert auch die Ausreifung der Dendritischen Zellen, da nur hierdurch die Voraussetzungen für die Induktion einer T-Zell-Antwort erfüllt sind [71, 100, 190-192].

4.2.4 Zelltod infolge einer Photodynamischen Therapie

Die Mechanismen nach einer PDT-Behandlung von Tumorzellen, die in Chemoattraktivität für DC sowie Antigenaufnahme und Ausreifung resultieren, sind noch nicht vollständig geklärt. Zelltod könnte jedoch eine zentrale Rolle spielen. O'Connor et al. beschäftigten sich näher mit der Generierung von ROS nach PDT. Anhand von MDA-MB-231, einer Brustkarzinom-Zelllinie, konnte nachgewiesen werden, dass nach einer ADPM06-vermittelten Photodynamischen Therapie Zelltod durch ROS induziert wird [197].

Die im Rahmen dieser Dissertation erhaltenen Ergebnisse spiegeln diese Beobachtung wider. Im Kontext der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine ALA/PDT ROS in Gliomsphäroiden induzierte. Interessanterweise konnten ROS ebenfalls in unbehandelten Tumorzellen nachgewiesen werden, jedoch auf einem sehr geringen Niveau. Vermutlich lässt sich dieses dadurch erklären, dass in der Atmungskette ebenfalls ROS gebildet werden können und somit, aufgrund der Sensitivität des Nachweisverfahrens, in jeder Zelle ROS auf einem geringen Niveau nachweisbar sind.

Konventionelle zytotoxische Substanzen, die im Rahmen einer Gliomtherapie eingesetzt werden, induzieren Zelltod durch Apoptose. Eine PDT-Behandlung und die in ihrem Verlauf gebildeten ROS hingegen resultieren in einer ungewöhnlichen Mischung aus apoptotischen sowie nekrotischen Zellen, wobei die eine oder andere Form des Zelltods überwiegen kann [56]. Die Balance zwischen Apoptose und Nekrose als Konsequenz einer PDT *in vitro* ist von verschiedenen Parametern abhängig. So sind neben dem Photosensitizer sowie seiner intrazellulären Lokalisation auch Faktoren wie PDT-Dosis, Sauerstoffkonzentration und Zelltyp entscheidend [148]. Anhand von CV-1-Zellen, einer Nieren-Zelllinie aus der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), konnte gezeigt werden, dass die zeitabhängige intrazelluläre Lokalisation des Photosensitizers in einer Induktion von Apoptose oder Nekrose resultiert. Bestrahlung nach 1-stündiger Inkubation, in der Photofrin lediglich in die Plasmamembran der Zellen vorgedrungen war, führte zu Nekrose der Zellen. Im Gegensatz dazu induzierte eine Bestrahlung nach 24-stündiger Inkubation Apoptose [198].

In Vorversuchen zu der vorliegenden Arbeit konnte anhand einer TUNEL-Färbung gezeigt werden, dass die ALA/PDT-Behandlung der Gliomsphäroide Apoptose induziert [147]. Im Kontext der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch, dass mittels Annexin-Färbungen und durchflusszytometrischer Analysen überwiegend Nekrose nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise spielte hierbei eine zeitabhängige Komponente eine Rolle, da die Zellen unmittelbar nach der Bestrahlung analysiert wurden. Unter Umständen ist ein längerer Zeitraum notwendig, um ALA in den Mitochondrien zu lokalisieren und die vollständige Apoptose-Kaskade zu initiieren. Interessanterweise konnte auch in unbehandelten Tumorsphäroiden Nekrose detektiert werden. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass ein Tumorsphäroid in drei unterschiedliche Zonen eingeteilt werden kann. Eine periphere Zone, die sich durch proliferierende Zellen auszeichnet, schwach proliferierende Zellen in der mittleren Zone sowie nekrotische Zellen im Zentrum des Sphäroides [29].

4.3 Induktion von Danger-Signalen als Konsequenz einer ALA/PDT

Wenn Zellen sterben, so können sie zahlreiche Faktoren freisetzen, die als Danger-Signale erkannt werden und professionelle Antigen-präsentierende Zellen anlocken. Zu diesen Faktoren zählen Nukleotide, die durch aktive Exozytose-ähnliche Prozesse freigesetzt werden können oder nach Integritätsverlust der Zelle passiv durch die Plasmamembran gelangen [199]. Desweiteren können dieses Lipide wie Lysophosphatidylcholin sein. Karmakar et al. zeigten 2007, dass eine ALA-vermittelte PDT Apoptose in humanen U87-Zellen induziert. Als Hauptmechanismen konnten eine Unterdrückung von Überlebens-Faktoren (survival factor) wie Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) oder BIRC-3 (*baculovirus inhibitor-of-apoptosis repeat containing-3*) sowie eine Aktivierung Caspase-abhängiger wie auch – unabhängiger Apoptosekaskaden identifiziert werden [200]. Apoptotische wie auch nekrotische Prozesse zeichnen sich durch eine veränderte Morphologie der Zellen aus. Apoptose kann durch Abrundung der Zelle, Kondensation des Chromatins und anschließendem Zerfall in Fragmente sowie einer Ausbildung der sogenannten „apoptotic bodies“ charakterisiert werden. Nekrose hingegen führt zu einem gesteigerten Zellvolumen und einem Anschwellen der Organellen, was schlussendlich zu einer Ruptur der Plasmamembran führt. Diese Veränderungen der Zelloberfläche, zu denen darüber hinaus auch die Translokation von Calreticulin aus dem Lumen des endoplasmatischen Retikulums auf die

Zelloberfläche gehört, ermöglichen eine Erkennung der geschädigten Zellen durch Immunzellen [195, 201, 202].

Von zentraler Bedeutung scheint die Möglichkeit nekrotischer Zellen zu sein, lösliche Proteine mit pro-inflammatorischer Aktivität, sogenannte Alarmine, sowie Hitzeschockproteine freizusetzen. Eine transkriptionelle Hochregulation von Hitzeschockproteinen ist Teil einer generellen Antwort auf zellulären Stress. Durch eine Translokation auf die Zelloberfläche können HSPs, wie HSP70 oder HSP90, ebenfalls als Danger-Signale wahrgenommen werden. Dendritische Zellen exprimieren Rezeptoren für HSPs und werden durch HSPs aktiviert, so dass HSP70 als Danger-Signal eine Ausreifung unreifer Dendritischer Zellen induzieren kann [203, 204].

Ein Erkennen solcher Danger-Signale ist somit entscheidend bei der Erkennung gestresster oder sterbender Zellen. Eine PDT-Behandlung von Tumorzellen verursacht beides, zellulären Stress und die Induktion von Zelltod [182, 205].

Darüber hinaus geht eine PDT-Behandlung mit einer akuten inflammatorischen Antwort einher. Diese kann durch eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer Moleküle, einschließlich IL-1 β , TNF- α , Prostaglandin und IL-6, der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1 sowie verschiedener HSPs und Glukose-regulierter Proteine (GRP) charakterisiert werden [42, 68-71, 148, 176, 177, 206, 207]. Vermutlich sind es solche Faktoren, die die Aktivierung der Dendritischen Zellen durch PDT-behandelte Tumorsphäroide verursachen [148, 208-210]. Deshalb wurden in einem weiteren Schritt Moleküle untersucht, die als potentielle Danger-Signale nach ALA/PDT-Behandlung induziert werden und die bereits beschriebenen Effekte auf die afferente Phase der adaptiven Immunität vermitteln könnten. Die Gruppe der HSPs erwies sich hier als vielversprechend, da diese bereits im direkten Zusammenhang mit einer PDT beschrieben wurden [70, 73, 211, 212].

Die Analysen der vorliegenden Arbeit ergaben eine gesteigerte HSP70 Expression auf der Zelloberfläche der Gliomsphäroide nach ALA/PDT. Durch eine Antikörper-vermittelte Blockierung von HSP70 konnte gezeigt werden, dass eine Antigenaufnahme und Ausreifung Dendritischer Zellen, die durch ALA/PDT-behandelte Sphäroide induziert wurde, nahezu vollständig gehemmt wurde. Diese Resultate sprechen dafür, dass HSP70 für die Aktivierung der afferenten Phase der Immunantwort durch ALA/PDT von entscheidender Bedeutung ist.

Die im Rahmen dieser Dissertation erhaltenen Daten ergänzen sich gut mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Zhou et al. zeigten an einer murinen Mammakarzinomzelllinie (C127), dass Makrophagen, die mit PDT-behandelten Tumorzellen co-kultiviert wurden, TNF- α auf einem hohen Level sezernierten. Makrophagen, die mit HSP70-blockierten Tumorzellen co-kultiviert wurden, zeigten eine signifikante Reduktion der TNF- α -Produktion. Darüber hinaus inhibierte eine HSP70-Blockierung eine Interaktion zwischen Tumorzellen und Makrophagen sowie eine Antigenaufnahme des Tumormaterials durch die immunrelevanten Zellen, so dass Zhou et al. von einer ausschlaggebenden Beteiligung von HSP70 an einer Immunantwort nach PDT ausgehen [212]. Die Toll-like-Rezeptoren TLR2 und TLR4 konnten unter anderem als Rezeptoren für HSPs identifiziert werden [213]. Außerdem konnte herausgestellt werden, dass eine HSP70-stimulierte Makrophagen-Antwort TLR2 abhängig ist [212]. Auch Korbelik et al. vermuteten, dass HSP70 eine zentrale Rolle bei der anti-tumoralen Immunantwort nach PDT einnimmt. Sie zeigten, dass eine Blockierung von HSP70 oder der Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 sowohl eine Freisetzung von TNF- α hemmt, als auch eine Aktivierung von Makrophagen nach Photofrin-vermittelter PDT von SCCVII-Zellen [70, 100]. Die gesteigerte Oberflächen-

expression von HSP70 nach ALA/PDT-Behandlung auf geschädigten Gliomzellen sowie dessen Bedeutung für die Antigenaufnahme und Ausreifung der Dendritischen Zellen deuten darauf hin, dass auch im Humansystem und für das Glioblastom, HSP70 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems durch die PDT spielt.

Jedoch ist ein Teil dieser Zusammenhänge Gegenstand kontroverser Diskussionen. Tsan et al. schließen nicht aus, dass die Sezernierung der pro-inflammatorischen Zytokine kein Effekt ist, der allein den HSP-Molekülen zuzuschreiben ist, sondern dass andere Moleküle maßgeblich beteiligt sind. Kandidaten hierfür sieht die Arbeitsgruppe in Molekülen, die mit den HSPs in ihrer Funktion als Chaperone interagieren [214]. Daher müssen nachfolgende Studien ihren Fokus darauf richten, in wieweit die beobachteten Effekte tatsächlich durch HSP70 induziert werden bzw. welche anderen Moleküle, möglicherweise an die HSPs gebunden, darüber hinaus beteiligt sind.

4.4 Gehirn als Immunfreie Zone?

Lange Zeit wurde generell angenommen, dass sich Immunreaktionen nicht im Gehirn ereignen. Als Gründe hierfür wurden einige charakteristische Merkmale des Gehirns, wie die Blut-Hirn-Schranke, das Fehlen konventioneller Lymphgefäße, geringer „T-Zell-Verkehr“ sowie schwache Expression von HLA-Klasse II Molekülen angeführt [215].

Stand der heutigen Forschung ist jedoch, dass das Zentralnervensystem durchaus mit dem Immunsystem vernetzt ist. Unter physiologischen Bedingungen beinhaltet das Gehirn unterschiedliche Populationen immunrelevanter Zellen. Mikrogliale Zellen hämatopoetischen Ursprungs stellen eine erste Verteidigungsbarriere dar. Sie können in eine inflammatorische Zone einwandern und besitzen, nach Aktivierung, phagozytische Fähigkeiten. Des Weiteren synthetisieren diese Zellen verschiedene Zytokine sowie Chemokine, mit Hilfe derer weitere immunrelevante Zellen an den Inflammationsort gelockt werden können [216]. Makrophagen und Dendritische Zellen zirkulieren im Blutstrom. Von dort aus kann eine Infiltration in das Zentralnervensystem erfolgen [217, 218]. Während entzündlicher Prozesse kann die Blut-Hirnschranke kompromittiert werden. So wird der zelluläre Verkehr in Form von Makrophagen, DC und Lymphozyten in das Gehirn ermöglicht [219-222]. Darüber hinaus können aktivierte Effektor-T-Zellen in das Gehirn einwandern.

Die Tatsache, dass immer mehr Arbeitsgruppen unterschiedliche Zell-Vakzine-Konzepte für Glioblastompatienten entwickeln, liefert zusätzliche Erkenntnisse, dass immunologisch relevante Prozesse auch im Gehirn stattfinden können [223-229]. Die Ergebnisse dieser Studien implizieren, dass systemische Immunität auch das „immunologisch privilegierte“ Zentralnervensystem betreten kann sowie eine selektive Aufnahme der Tumor-assoziierten Antigene, mit anschließender Zerstörung der Gehirntumorzellen, möglich ist [230-236].

Dass dieses Konzept nicht nur nach reinen Inflammationsprozessen im Gehirn greift, konnte die Arbeitsgruppe von Karman et al. zeigen. Anhand eines Maus-Modells konnte gezeigt werden, dass eine Mikroinjektion von Proteinen in das Gehirn zu einer Akkumulation Dendritischer Zellen führt. Diese Ergebnisse wiesen zusätzlich darauf hin, dass die immunrelevanten Zellen zur Aufnahme der Antigene angeregt wurden und die Prozessierung der Antigene erfolgte. Auch eine spezifische Immunantwort wurde eingeleitet. Hierfür konnte die Migration der Dendritischen Zellen aus dem Gehirn in die zervikalen Lymphknoten verantwortlich gemacht werden, in denen die T-Zell-Stimulation erfolgte [237, 238]. Somit scheinen auch für das Gehirn Bedingungen gewährleistet zu sein, die eine normale

Immunantwort, ähnlich der in peripheren Geweben, erlaubt. Daher sind die hier *in vitro* beschriebenen Effekte auch *in vivo* im *Gehirn* vorstellbar.

In dieser Arbeit wurden sämtliche Experimente anhand dreidimensionaler Tumorsphäroide durchgeführt. Vorteil dieses Modells ist die Vergleichbarkeit der physiologischen, histomorphologischen sowie der biochemischen Charakteristika im Hinblick auf die „realen“ Bedingungen in humanen Tumoren *in vivo*. Mit Hilfe der dreidimensionalen Zellkultur kann im Vergleich zu Monolayerkulturen oder Suspensionszellen das *in vivo* Verhalten der Tumorzellen besser nachgestellt werden, so dass sich dieses Modell als hochentwickeltes Werkzeug der Tumorforschung etabliert hat und in zahlreichen Forschungsgebieten Anwendung findet [24, 239-241]. Inwieweit die Erkenntnisse über das immunogene Potential der Photodynamischen Therapie in humanen Glioblastomen, welche hier mit diesem Modell gewonnen wurden, jedoch auf eine *in vivo* Situation übertragen werden können, ist noch nicht abschließend geklärt. Daher empfiehlt es sich, weitere Versuchsreihen an anderen Modellsystemen durchzuführen, bevorzugt in einem *in vivo* System.

Dennoch kann herausgestellt werden, dass eine ALA/PDT-Behandlung in gerichteter Migration der DC zum Tumor, der Aufnahme von Tumorantigenen durch DC, gefolgt von der Ausreifung der DC resultiert. Die Photodynamische Therapie besitzt folglich immunogenes Potential und kann die afferente Phase einer anti-tumoralen Immunantwort induzieren, wodurch möglicherweise die therapeutische Wirksamkeit der ALA/PDT erklärt werden kann, die über einen reinen phototoxischen Effekt hinaus gehen muss.

5 Zusammenfassung

Glioblastome zählen zu den häufigsten und aggressivsten primären Gehirntumoren. Gegenwärtig liegt das mediane Überleben der Patienten bei 14,6 Monaten. Daher werden neue Therapien dringend benötigt. Die 5-Aminolävulinsäure (ALA)-vermittelte Photodynamische Therapie (ALA/PDT) stellt einen vielversprechenden Therapieansatz dar. Sie beruht auf der Tumor-selektiven Akkumulation des Photosensitizers Protoporphyrin IX, der in den Tumorzellen aus ALA metabolisiert wird. Durch Anregung des Photosensitizers mit Laserlicht einer Wellenlänge von 635 nm, kommt es innerhalb der Tumorzellen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, wodurch diese abgetötet werden.

Erste Studien sind vielversprechend, weisen jedoch aufgrund der geringen Eindringtiefe des Laserlichtes im Gehirn darauf hin, dass andere Mechanismen neben der direkten Phototoxizität an der Wirksamkeit der ALA/PDT beteiligt sein müssen. Als mögliche Mechanismen wurden bei extrakraniellen Tumoren insbesondere in Mausmodellen die Induktion anti-tumoraler Immunität und Effekte auf das den Tumor versorgende Blutgefäßsystem sowie auf das Migrations- und Invasionsverhalten der Tumorzellen nach PDT-Behandlung identifiziert. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit an einem dreidimensionalen Sphäroid-Modell für verschiedene humane Glioblastomzelllinien untersucht, ob einerseits Effekte auf die Tumorzellmigration und andererseits eine Induktion der durch Dendritische Zellen vermittelten afferenten Phase einer adaptiven Immunantwort nach ALA/PDT-Behandlung nachgewiesen werden können.

Die ALA/PDT-Behandlung der Gliomsphäroide führte zu einer länger anhaltenden, fast vollständigen Suppression der Migrationsfähigkeit der Tumorzellen. Diese war assoziiert mit Veränderungen der Morphologie und des Aktin-Zytoskeletts. Nach der Behandlung zeigten die Gliomzellen ein polygones, fast epitheliales Erscheinungsbild, das mit der Induktion des epithelialen E-Cadherins einherging. Darüber hinaus konnten in ALA/PDT-behandelten Gliomzellen keine Expression der an Invasionsvorgängen beteiligten Matrix Metalloproteinasen MMP-7 und -8 mehr nachgewiesen werden. Somit induzierte die ALA/PDT zahlreiche Veränderungen in Gliomzellen, welche in einem reduzierten Migrations- und Invasionspotential resultieren können.

Die Untersuchung der immunologischen Konsequenzen einer ALA/PDT-Behandlung von Gliomsphäroiden ergab, dass durch die Behandlung eine Migration unreifer Dendritischer Zellen auf die behandelten Sphäroide zu induziert wird. Unreife Dendritische Zellen nahmen dann effektiv Tumorantigenen von den behandelten Sphäroiden auf, ein Prozess für den die Hochregulation von HSP70 auf der Oberfläche der Sphäroide verantwortlich gemacht werden konnte. Ferner führte der Kontakt der ALA/PDT-behandelten Sphäroide mit den unreifen Dendritischen Zellen zu deren Aktivierung und Ausreifung, was durch die Induktion des Reifungsmarkers CD83 und der co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie einer gesteigerten T-Zell-stimulatorischen Aktivität der Dendritischen Zellen nachgewiesen werden konnte. Als Reifungsstimulus, der durch die ALA/PDT-Behandlung in den Sphäroiden induziert wurde, konnte abermals HSP70 verantwortlich gemacht werden. Somit induziert die ALA/PDT-Behandlung von Gliomsphäroiden alle initialen Schritte der afferenten Phase einer adaptiven Immunantwort, eine Voraussetzung für die Entwicklung einer spezifischen anti-tumoralen Immunität, die die direkte Phototoxizität als Wirkmechanismus der ALA/PDT-Behandlung vermutlich ergänzt.

6 Summary

Glioblastoma is the most frequent and aggressive primary brain tumor. Median survival of patients is 14.6 months. Therefore, novel therapies are urgently needed. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy (ALA/PDT) is a promising therapeutic approach. It is based on the selective accumulation of the photosensitizer protoporphyrin IX, which is metabolized in the tumor cells from the pro-drug ALA. Excitation of the photosensitizer with laser light of 635 nm wave length, results in the generation of reactive oxygen species in the tumor cells, which cause cell death.

Results from initial studies are promising. However, the limited depth of penetration of the laser light in the cranial tissue implicates that other mechanisms besides direct phototoxicity contribute to efficacy of ALA/PDT. Possible mechanisms which have been identified for extracranial tumors, particularly in mouse models, include induction of anti-tumoral immunity, effects on tumor vasculature as well as effects on the migratory and invasive behaviour of tumor cells after PDT treatment. Therefore, a three-dimensional spheroid model of several human glioblastoma cell lines has been used to study whether there are effects of ALA/PDT on tumor cell migration or induction of the dendritic cell-based afferent phase of adaptive immunity after ALA/PDT treatment.

ALA/PDT treatment of glioma spheroids resulted in a long-lasting, nearly complete suppression of tumor cell migration, which was associated with changes in morphology and the actin cytoskeleton. Following treatment, glioma cells showed a polygonal, epithelial-like appearance, which coincided with induction of the epithelial E-cadherin. Moreover, ALA/PDT-treated glioma cells had lost expression of matrix metalloproteinases MMP-7 und -8, which are involved in invasion processes. Thus, ALA/PDT induces several changes in glioma cells which can result in a reduced migratory and invasive potential.

The studies on the immunological consequences of ALA/PDT treatment of glioma spheroids revealed that the treatment induced migration of immature dendritic cells towards the treated spheroids. Next, immature dendritic cells acquired tumor antigens from these treated spheroids efficiently, a process which was dependent on ALA/PDT-induced upregulation of surface HSP70 on the tumor cells. Moreover, contact of ALA/PDT-treated spheroids with immature dendritic cells resulted in dendritic cell activation and maturation as indicated by the up-regulation of the dendritic cell maturation marker CD83 and the co-stimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 as well as an increased T-cell-stimulatory activity of the dendritic cells. HSP70 was identified as the maturation stimulus induced by ALA/PDT in the tumor cells. Thus, ALA/PDT treatment of glioma spheroids induces all initial steps of the afferent phase of an adaptive immune response, a pre-requisite for the development of specific anti-tumoral immunity which probably complements direct phototoxicity as active principle of ALA/PDT.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen herzlich bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, und ohne die diese Arbeit niemals in der jetzigen Form zustande gekommen wäre.

An erster Stelle gilt mein Dank PD Dr. Rüdiger Sorg für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meine Dissertation anzufertigen und dafür, dass ich an diesem spannenden Projekt mitarbeiten durfte. Er hat mich stets ermutigt, Problemlösungen selbstständig zu erarbeiten und stand immer für Fragen, Anregungen, Diskussionen und konstruktive Kritik zur Verfügung. Besonders danke ich ihm dafür, dass er sich in einigen „Engpässen“ für mich eingesetzt hat und mir somit die Fertigstellung der Arbeit ermöglichte.

Prof. Dieter Willbold danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Auch Dr. Nima Etminan und Prof. Dr. Hans-Jakob Steiger möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Neurochirurgischen Klinik danken. Nima danke ich besonders für seine freundschaftliche Unterstützung und für die Hilfe gerade in den letzten Monaten sowie für sein neurochirurgisches Fachwissen.

Ein großer Dank gilt Verena und Dalila, die mir die Irrungen und Wirrungen der Durchflusszytometrie sowie das Geheimnis der Sphäroide näher brachten und immer mit Rat und Tat sowie vielen helfenden Händen zur Seite standen. Verena, vielen Dank für das „Hirn-Leihen“.

Erich Bünemann aus der AG Homey der Hautklinik möchte ich besonders für seine tatkräftige Unterstützung danken und dafür, dass er sein unglaubliches Fachwissen über die Fluoreszenzmikroskopie stets mit mir teilte.

Ein besonderer Dank gilt auch Heike, die mir jederzeit tatkräftig zur Seite stand, mich vor allem in stressigen Zeiten mit vielen helfenden Handgriffen unterstützte und mir oft meine Mittagspause versüßte. Mir werden nicht nur unsere Sushi-Besuche fehlen!

Dr. Tanja Brüning danke ich für die schöne Zeit im NC-Labor und ihrer Bereitschaft zum Ideenaustausch sowie für unsere Plaudereien auch abseits der Laborthematik.

Michael, Kasia, Fredi, Sebastian, Julia und Anastasia, den Kögler-Mädels (und ihren Quotenmännern) und dem gesamten Team des ITZ möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die schönen Stunden im Labor danken. Michael, Dir besonders für Deinen Einsatz an den WE, Kasia für unsere „pferdigen“ Mittagspausen und Fredi für unsere wunderbaren Selbstgesprächdialoge.

Meinen besten und engsten Freunden, besonders Katharina, Elke und Steffi, möchte ich dafür danken, dass sie mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben.

Mein besonderer Dank gilt allerdings meinem Freund Thorsten, der mich immer und überall tatkräftig unterstützt (zu jeder Tages- und vor allem Nachtzeit), stets motiviert und an mich geglaubt hat. Für seine unermüdlichen Anregungen, Tipps und Tricks und Bereitschaft, mir gerade in der letzten Phase, den Rücken frei zu halten. Ohne Dich, wäre diese Dissertation nie so geworden, wie sie jetzt ist!

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich unermüdlich liebevoll unterstützt und ermutigt haben meinen Weg zu gehen. Durch Euch wurde mir mein Studium und damit der Grundstein zu dieser Dissertation erst ermöglicht.

Vielen Dank an Euch alle!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Corinna Peters
Geburtsdatum: 04.11.1979
Geburtsort: Mönchengladbach
Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1990 – 06/1999 Gymnasium Rheindahlen, Mönchengladbach
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

08/1999 – 06/2001 Tierarztpraxis Rita Otten, Mönchengladbach
Ausbildung zur Tierarzhelferin

Akademische Ausbildung

10/2001 – 09/2007 Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Studium zum Diplom-Biologen

Diplomarbeit: „Resistenz gegen Tubulin-bindende
Zytostatika im humanen Nierenzellkarzinom“

Berufserfahrung

- 01/2003 – 12/2005 Studentische Mitarbeiterin,
Reiter Software-Organisations-GmbH, Mönchengladbach
- 02/2006 – 12/2006 Studentische Mitarbeiterin,
Institut für Pathologie, Düsseldorf
- 06/2001 – 05/2007 Teilzeitkraft,
Tierarztpraxis Rita Otten, Mönchengladbach
- 11/2007 – 04/2008 Mitarbeiterin,
Reiter Software-Organisations-GmbH, Mönchengladbach
- 05/2008 – heute Wissenschaftliche Mitarbeiterin,
Institut für Transplantationsdiagnostik und
Zelltherapeutika (ITZ), Universitätsklinikum Düsseldorf

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1.1: Genetische Veränderungen in malignen Gliomen..... | 3 |
| Abbildung 1.2: MRT eines Glioblastom-Patienten. | 4 |
| Abbildung 1.3: Fluoreszenzgestützte Resektion eines Glioblastoms. | 5 |
| Abbildung 1.4: Die Geschichte der Photodynamischen Therapie | 9 |
| Abbildung 1.5: Prinzip der Photodynamischen Therapie..... | 10 |
| Abbildung 1.6: Anti-apoptotische Wirkung von HSP70..... | 15 |
| Abbildung 1.7: Immunologische Synapse..... | 24 |
| Abbildung 2.1: Darstellung einer Neubauer Zählkammer. | 33 |
| Abbildung 2.2: Aufbau des Lasergerätes zur Bestrahlung der Gliomsphäroide. | 34 |
| Abbildung 2.3: Verteilung der verschiedene Phasen vor und nach der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation..... | 36 |
| Abbildung 2.4: Prinzip der Durchflusszytometrie..... | 40 |
| Abbildung 2.5: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). | 47 |
| Abbildung 3.1: Generierung von Gliomsphäroiden aus Monolayer-Kulturen. | 52 |
| Abbildung 3.2: Reduktion der Zellproliferationsrate von Gliomsphäroiden nach ALA/PDT-Behandlung | 53 |
| Abbildung 3.3: Inhibierung des Migrationsverhaltens von Zellen der Linie U251 nach Photodynamischer Therapie | 55 |
| Abbildung 3.4: Inhibition der Migration von U373-Zellen nach ALA/PDT-Behandlung..... | 56 |
| Abbildung 3.5: Inhibierung des Migrationsverhaltens von U373-Zellen nach ALA/PDT-Behandlung...57 | 57 |
| Abbildung 3.6: Inhibierung des Migrationsverhaltens von U87- und A172-Zellen nach ALA/PDT-Behandlung..... | 58 |
| Abbildung 3.7: Inhibition der Migration von A172-Zellen nach ALA/PDT-Behandlung | 59 |
| Abbildung 3.8: Morphologische Veränderungen infolge einer ALA/PDT-Behandlung | 60 |
| Abbildung 3.9: Morphologische Veränderungen infolge einer ALA/PDT-Behandlung. | 61 |
| Abbildung 3.10: Stabile morphologische Veränderungen nach ALA/PDT-Behandlung..... | 62 |
| Abbildung 3.11: E-Cadherin-Expression der Gliomsphäroide der Linie U87..... | 63 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 3.12: E-Cadherin-Expression der U373-Tumorsphäroide | 63 |
| Abbildung 3.13: N-Cadherin- und Vimentin-Expression nach Photodynamischer Therapie | 64 |
| Abbildung 3.14: Umorganisation des Aktinzytoskeletts nach Photodynamischer Therapie. | 65 |
| Abbildung 3.15: Umorganisation des Aktinzytoskeletts infolge einer ALA/PDT-Behandlung | 66 |
| Abbildung 3.16: Expressionsprofil der Matrix Metalloproteinasen in Gliomsphäroiden der Linie A172 | 67 |
| Abbildung 3.17: Expressionsprofil der Matrix Metalloproteinasen in U373-Sphäroiden | 68 |
| Abbildung 3.18: Expression verschiedener Integrine auf U251-Sphäroiden | 69 |
| Abbildung 3.19: Expressionsprofil unterschiedlicher Zelladhäsionsmoleküle auf U251-Tumorsphäroiden | 70 |
| Abbildung 3.20: Expressionsprofil von unterschiedlichen Zelladhäsionsmoleküle auf U87-Gliomsphäroiden | 70 |
| Abbildung 3.21: Induktion einer anti-tumoralen Immunantwort nach PDT | 71 |
| Abbildung 3.22: Induktion von ROS in Tumorsphäroiden als Konsequenz einer Photodynamischen Therapie | 72 |
| Abbildung 3.23: Nachweis nekrotischer Zellen | 73 |
| Abbildung 3.24: Zellschädigung durch Nekrose nach ALA/PDT-Behandlung als erster Schritt einer anti-tumoralen Immunantwort | 74 |
| Abbildung 3.25: Expression der charakteristischen Oberflächenmarker CD14 und CD83 während der Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen | 75 |
| Abbildung 3.26: ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide induzieren die Migration von unreifen Dendritischen Zellen | 76 |
| Abbildung 3.27: ALA/PDT-behandelte Tumorsphäroide induzieren die Migration unreifer Dendritischer Zellen | 77 |
| Abbildung 3.28: Chemokinsezernierung durch Gliomsphäroide infolge einer ALA/PDT-Behandlung . | 78 |
| Abbildung 3.29: Pinozytoseaktivität unreifer Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit U251-Sphäroiden | 79 |
| Abbildung 3.30: Pinozytoseaktivität unreifer Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit U87-Sphäroiden | 79 |
| Abbildung 3.31: Aufnahme von Tumormaterial (U251) durch unreife Dendritische Zellen | 80 |
| Abbildung 3.32: Aufnahme von Tumormaterial durch unreife Dendritische Zellen | 81 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 3.33: Stimulation der Aufnahme von Tumorantigenen durch unreife Dendritische Zellen. (Abbildung modifiziert nach Castano et al. [148]) | 82 |
| Abbildung 3.34: ALA/PDT-behandelte U87-Sphäroide induzieren die Ausreifung in Dendritischen Zellen. | 83 |
| Abbildung 3.35: ALA/PDT-behandelte Sphäroide induzieren die Ausreifung in Dendritischen Zellen. | 83 |
| Abbildung 3.36: HLA-DR-Expression auf Dendritischen Zellen nach Co-Kultivierung mit Tumorsphäroiden der Zelllinien U251 und U87 | 84 |
| Abbildung 3.37: Expression des co-stimulatorischen Moleküls CD40 auf Dendritischen Zellen infolge einer Co-Kultur mit U87-Sphäroiden..... | 85 |
| Abbildung 3.38: CD40-Expression Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit Gliomsphäroiden..... | 85 |
| Abbildung 3.39: Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 auf Dendritischen Zellen als Konsequenz einer Co-Kultur mit Tumorsphäroiden (U87)..... | 86 |
| Abbildung 3.40: : Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 auf Dendritischen Zellen als Konsequenz einer Co-Kultur mit Tumorsphäroiden (U251 oder U373)..... | 87 |
| Abbildung 3.41: Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD86 auf reifen Dendritischen Zellen als Konsequenz einer Co-Kultur mit Tumorsphäroiden | 88 |
| Abbildung 3.42: Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD86 auf reifen Dendritischen Zellen als Konsequenz einer Co-Kultur mit Tumorsphäroiden | 88 |
| Abbildung 3.43: Ausreifung Dendritischer Zellen nach ALA/PDT-Behandlung | 89 |
| Abbildung 3.44: T-Zell-stimulatorische Aktivität Dendritischer Zellen nach Co-Kultur mit U87- oder U251-Sphäroiden..... | 90 |
| Abbildung 3.45: T-Zell-stimulatorische Aktivität der Dendritischen Zellen nach Co-Kultur mit Gliomsphäroiden | 91 |
| Abbildung 3.46: HSP70-Expression auf Tumorsphäroiden. Nachweis einer HSP70-Expression auf Gliomsphäroiden mittels Durchflusszytometrie. | 92 |
| Abbildung 3.47: Induktion einer HSP70-Expression auf Gliomsphäroiden durch ALA/PDT-Behandlung | 92 |
| Abbildung 3.48: Reduktion der Aufnahme von Tumormaterial durch unreife Dendritische Zellen durch HSP70-Blockierung auf ALA/PDT-behandelten Sphäroiden | 93 |
| Abbildung 3.49: Aufnahme von Tumormaterial von ALA/PDT-behandelten Sphäroiden durch DC in der An- und Abwesenheit eines Kontrollantikörpers..... | 94 |
| Abbildung 3.50: Hemmung der Ausreifung Dendritischer Zellen nach Co-Kulturen mit ALA/PDT-behandelten Tumorsphäroiden durch die Blockierung von HSP70 | 95 |

Abbildung 3.51: Hemmung der Expression co-stimulatorischer Moleküle auf Dendritischen Zellen durch Blockierung von HSP70 auf ALA/PDT-behandelten U87-Sphäroiden 96

Abbildung 3.52: Hemmung der Expression co-stimulatorischer Moleküle auf Dendritischen Zellen durch Blockierung von HSP70 auf ALA/PDT-behandelten U251-Sphäroiden 96

Abbildung 3.53: Hemmung der Expression co-stimulatorischer Moleküle auf Dendritischen Zellen durch Blockierung von HSP70 auf ALA/PDT-behandelten U373-Sphäroiden 97

Literaturverzeichnis

- [1] A. Claes, A. J. Idema, and P. Wesseling, "Diffuse glioma growth: a guerilla war," *Acta Neuropathol*, vol. 114, pp. 443-58, Nov 2007.
- [2] R. Stupp, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, and R. O. Mirimanoff, "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma," *N Engl J Med*, vol. 352, pp. 987-96, Mar 10 2005.
- [3] P. Y. Wen and S. Kesari, "Malignant gliomas in adults," *N Engl J Med*, vol. 359, pp. 492-507, Jul 31 2008.
- [4] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer, and P. Kleihues, "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system," *Acta Neuropathol*, vol. 114, pp. 97-109, Aug 2007.
- [5] A. Behin, K. Hoang-Xuan, A. F. Carpentier, and J. Y. Delattre, "Primary brain tumours in adults," *Lancet*, vol. 361, pp. 323-31, Jan 25 2003.
- [6] G. Jones, J. Machado, Jr., M. Tolnay, and A. Merlo, "PTEN-independent induction of caspase-mediated cell death and reduced invasion by the focal adhesion targeting domain (FAT) in human astrocytic brain tumors which highly express focal adhesion kinase (FAK)," *Cancer Res*, vol. 61, pp. 5688-91, Aug 1 2001.
- [7] H. Ohgaki and P. Kleihues, "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma," *Am J Pathol*, vol. 170, pp. 1445-53, May 2007.
- [8] J. Rees, "Advances in magnetic resonance imaging of brain tumours," *Curr Opin Neurol*, vol. 16, pp. 643-50, Dec 2003.
- [9] S. Cha, "Update on brain tumor imaging: from anatomy to physiology," *AJNR Am J Neuroradiol*, vol. 27, pp. 475-87, Mar 2006.
- [10] A. R. Asthagiri, N. Pouratian, J. Sherman, G. Ahmed, and M. E. Shaffrey, "Advances in brain tumor surgery," *Neurol Clin*, vol. 25, pp. 975-1003, viii-ix, Nov 2007.
- [11] W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O. D. Wiestler, F. Zanella, and H. J. Reulen, "Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial," *Lancet Oncol*, vol. 7, pp. 392-401, May 2006.
- [12] D. Krex, B. Klink, C. Hartmann, A. von Deimling, T. Pietsch, M. Simon, M. Sabel, J. P. Steinbach, O. Heese, G. Reifenberger, M. Weller, and G. Schackert, "Long-term survival with glioblastoma multiforme," *Brain*, vol. 130, pp. 2596-606, Oct 2007.
- [13] R. Stupp and F. Roila, "Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up," *Ann Oncol*, vol. 20 Suppl 4, pp. 126-8, May 2009.
- [14] R. Jelsma and P. C. Bucy, "The treatment of glioblastoma multiforme of the brain," *J Neurosurg*, vol. 27, pp. 388-400, Nov 1967.
- [15] R. Stupp, M. E. Hegi, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. J. Taphoorn, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A. A. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C. J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J. G. Cairncross, and R. O. Mirimanoff, "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial," *Lancet Oncol*, vol. 10, pp. 459-66, May 2009.
- [16] H. Nagase and J. F. Woessner, Jr., "Matrix metalloproteinases," *J Biol Chem*, vol. 274, pp. 21491-4, Jul 30 1999.
- [17] M. D. Sternlicht and Z. Werb, "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior," *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 17, pp. 463-516, 2001.

- [18] C. Hagemann, J. Anacker, S. Haas, D. Riesner, B. Schomig, R. I. Ernestus, and G. H. Vince, "Comparative expression pattern of Matrix-Metalloproteinases in human glioblastoma cell-lines and primary cultures," *BMC Res Notes*, vol. 3, p. 293, 2010.
- [19] K. Lampert, U. Machein, M. R. Machein, W. Conca, H. H. Peter, and B. Volk, "Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors," *Am J Pathol*, vol. 153, pp. 429-37, Aug 1998.
- [20] M. F. van der Jagt, T. Wobbes, L. J. Strobbe, F. C. Sweep, and P. N. Span, "Metalloproteinases and their regulators in colorectal cancer," *J Surg Oncol*, vol. 101, pp. 259-69, Mar 1 2010.
- [21] M. C. Pazos and H. B. Nader, "Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components," *Braz J Med Biol Res*, vol. 40, pp. 1025-35, Aug 2007.
- [22] W. R. Inch, J. A. McCredie, and R. M. Sutherland, "Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture," *Growth*, vol. 34, pp. 271-82, Sep 1970.
- [23] R. M. Sutherland, J. A. McCredie, and W. R. Inch, "Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas," *J Natl Cancer Inst*, vol. 46, pp. 113-20, Jan 1971.
- [24] R. M. Sutherland, "Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model," *Science*, vol. 240, pp. 177-84, Apr 8 1988.
- [25] L. A. Kunz-Schughart, J. P. Freyer, F. Hofstaedter, and R. Ebner, "The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model," *J Biomol Screen*, vol. 9, pp. 273-85, Jun 2004.
- [26] B. Desoize, D. Gimonet, and J. C. Jardiller, "Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance," *Anticancer Res*, vol. 18, pp. 4147-58, Nov-Dec 1998.
- [27] B. Desoize and J. Jardillier, "Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?," *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 36, pp. 193-207, Nov-Dec 2000.
- [28] C. Dubessy, J. M. Merlin, C. Marchal, and F. Guillemin, "Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy," *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 36, pp. 179-92, Nov-Dec 2000.
- [29] W. Mueller-Klieser, "Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications," *Am J Physiol*, vol. 273, pp. C1109-23, Oct 1997.
- [30] P. L. Olive and R. E. Durand, "Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics," *Cancer Metastasis Rev*, vol. 13, pp. 121-38, Jun 1994.
- [31] M. T. Santini and G. Rainaldi, "Three-dimensional spheroid model in tumor biology," *Pathobiology*, vol. 67, pp. 148-57, May-Jun 1999.
- [32] A. M. Ballangrud, W. H. Yang, D. E. Charlton, M. R. McDevitt, K. A. Hamacher, K. S. Panageas, D. Ma, N. H. Bander, D. A. Scheinberg, and G. Sgouros, "Response of LNCaP spheroids after treatment with an alpha-particle emitter (²¹³Bi)-labeled anti-prostate-specific membrane antigen antibody (J591)," *Cancer Res*, vol. 61, pp. 2008-14, Mar 1 2001.
- [33] M. Boyd, S. C. Mairs, K. Stevenson, A. Livingstone, A. M. Clark, S. C. Ross, and R. J. Mairs, "Transfectant mosaic spheroids: a new model for evaluation of tumour cell killing in targeted radiotherapy and experimental gene therapy," *J Gene Med*, vol. 4, pp. 567-76, Sep-Oct 2002.
- [34] R. E. Durand and P. L. Olive, "Resistance of tumor cells to chemo- and radiotherapy modulated by the three-dimensional architecture of solid tumors and spheroids," *Methods Cell Biol*, vol. 64, pp. 211-33, 2001.
- [35] M. Essand, C. Gronvik, T. Hartman, and J. Carlsson, "Radioimmunotherapy of prostatic adenocarcinomas: effects of ¹³¹I-labelled E4 antibodies on cells at different depth in DU 145 spheroids," *Int J Cancer*, vol. 63, pp. 387-94, Nov 3 1995.
- [36] T. Nederman, B. Norling, B. Glimelius, J. Carlsson, and U. Brunk, "Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids," *Cancer Res*, vol. 44, pp. 3090-7, Jul 1984.
- [37] W. Mueller-Klieser, "Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research," *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 113, pp. 101-22, 1987.
- [38] D. Nowis, M. Makowski, T. Stoklosa, M. Legat, T. Issat, and J. Golab, "Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy," *Acta Biochim Pol*, vol. 52, pp. 339-52, 2005.

- [39] O. Raab, "Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien," *Zeitung Biol.*, vol. 39, 1900.
- [40] R. L. Lipson and E. J. Baldes, "The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative," *Arch Dermatol*, vol. 82, pp. 508-16, Oct 1960.
- [41] T. J. Dougherty, G. B. Grindey, R. Fiel, K. R. Weishaupt, and D. G. Boyle, "Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light," *J Natl Cancer Inst*, vol. 55, pp. 115-21, Jul 1975.
- [42] D. E. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Photodynamic therapy for cancer," *Nat Rev Cancer*, vol. 3, pp. 380-7, May 2003.
- [43] J. Moan and K. Berg, "The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen," *Photochem Photobiol*, vol. 53, pp. 549-53, Apr 1991.
- [44] A. Juzeniene, Q. Peng, and J. Moan, "Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 6, pp. 1234-45, Dec 2007.
- [45] R. Ritz, H. T. Wein, K. Dietz, M. Schenk, F. Roser, M. Tatagiba, and W. S. Strauss, "Photodynamic therapy of malignant glioma with hypericin: comprehensive in vitro study in human glioblastoma cell lines," *Int J Oncol*, vol. 30, pp. 659-67, Mar 2007.
- [46] A. Orenstein, G. Kostenich, L. Roitman, Y. Shechtman, Y. Kopolovic, B. Ehrenberg, and Z. Malik, "A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e6, Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model," *Br J Cancer*, vol. 73, pp. 937-44, Apr 1996.
- [47] H. Liang, D. S. Shin, Y. E. Lee, D. C. Nguyen, T. C. Trang, A. H. Pan, S. L. Huang, D. H. Chong, and M. W. Berns, "Subcellular phototoxicity of 5-aminolaevulinic acid (ALA)," *Lasers Surg Med*, vol. 22, pp. 14-24, 1998.
- [48] M. Olivo and B. C. Wilson, "Mapping ALA-induced PPIX fluorescence in normal brain and brain tumour using confocal fluorescence microscopy," *Int J Oncol*, vol. 25, pp. 37-45, Jul 2004.
- [49] J. M. Gaullier, M. Geze, R. Santus, T. Sa e Melo, J. C. Maziere, M. Bazin, P. Morliere, and L. Dubertret, "Subcellular localization of and photosensitization by protoporphyrin IX human keratinocytes and fibroblasts cultivated with 5-aminolevulinic acid," *Photochem Photobiol*, vol. 62, pp. 114-22, Jul 1995.
- [50] K. P. Uberriegler, E. Baniaghbal, and B. Krammer, "Subcellular damage kinetics within co-cultivated WI38 and VA13-transformed WI38 human fibroblasts following 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX formation," *Photochem Photobiol*, vol. 62, pp. 1052-7, Dec 1995.
- [51] M. L. Agarwal, M. E. Clay, E. J. Harvey, H. H. Evans, A. R. Antunez, and N. L. Oleinick, "Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells," *Cancer Res*, vol. 51, pp. 5993-6, Nov 1 1991.
- [52] P. Zelenkov, R. Baumgartner, K. Bise, M. Heide, R. Meier, S. Stocker, R. Sroka, R. Goldbrunner, and W. Stummer, "Acute morphological sequelae of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the C6 spheroid model," *J Neurooncol*, vol. 82, pp. 49-60, Mar 2007.
- [53] W. Stummer, T. Beck, W. Beyer, J. H. Mehrkens, A. Obermeier, N. Etminan, H. Stepp, J. C. Tonn, R. Baumgartner, J. Herms, and F. W. Kreth, "Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report," *J Neurooncol*, vol. 87, pp. 103-9, Mar 2008.
- [54] E. Buytaert, M. Dewaele, and P. Agostinis, "Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1776, pp. 86-107, Sep 2007.
- [55] B. W. Henderson, S. M. Waldow, T. S. Mang, W. R. Potter, P. B. Malone, and T. J. Dougherty, "Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy," *Cancer Res*, vol. 45, pp. 572-6, Feb 1985.

- [56] N. L. Oleinick, R. L. Morris, and I. Belichenko, "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 1, pp. 1-21, Jan 2002.
- [57] D. Kessel and M. Castelli, "Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response," *Photochem Photobiol*, vol. 74, pp. 318-22, Aug 2001.
- [58] N. Vanlangenakker, T. Vanden Berghe, D. V. Krysko, N. Festjens, and P. Vandenabeele, "Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death," *Curr Mol Med*, vol. 8, pp. 207-20, May 2008.
- [59] V. H. Fingar, P. K. Kik, P. S. Haydon, P. B. Cerrito, M. Tseng, E. Abang, and T. J. Wieman, "Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD)," *Br J Cancer*, vol. 79, pp. 1702-8, Apr 1999.
- [60] B. W. Henderson and V. H. Fingar, "Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor," *Cancer Res*, vol. 47, pp. 3110-4, Jun 15 1987.
- [61] Q. Chen, H. Chen, and F. W. Hetzel, "Tumor oxygenation changes post-photodynamic therapy," *Photochem Photobiol*, vol. 63, pp. 128-31, Jan 1996.
- [62] D. E. Dolmans, A. Kadambi, J. S. Hill, C. A. Waters, B. C. Robinson, J. P. Walker, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy," *Cancer Res*, vol. 62, pp. 2151-6, Apr 1 2002.
- [63] M. Korbelik, G. Kros, J. Kros, and G. J. Dougherty, "The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy," *Cancer Res*, vol. 56, pp. 5647-52, Dec 15 1996.
- [64] T. M. Busch, S. M. Hahn, S. M. Evans, and C. J. Koch, "Depletion of tumor oxygenation during photodynamic therapy: detection by the hypoxia marker EF3 [2-(2-nitroimidazol-1[H]-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)acetamide]," *Cancer Res*, vol. 60, pp. 2636-42, May 15 2000.
- [65] J. Kuhlicke, J. S. Frick, J. C. Morote-Garcia, P. Rosenberger, and H. K. Eltzschig, "Hypoxia inducible factor (HIF)-1 coordinates induction of Toll-like receptors TLR2 and TLR6 during hypoxia," *PLoS One*, vol. 2, p. e1364, 2007.
- [66] J. Jantsch, D. Chakravorty, N. Turza, A. T. Prechtel, B. Buchholz, R. G. Gerlach, M. Volke, J. Glasner, C. Warnecke, M. S. Wiesener, K. U. Eckardt, A. Steinkasserer, M. Hensel, and C. Willam, "Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function," *J Immunol*, vol. 180, pp. 4697-705, Apr 1 2008.
- [67] W. J. de Vree, M. C. Essers, J. F. Koster, and W. Sluiter, "Role of interleukin 1 and granulocyte colony-stimulating factor in photofrin-based photodynamic therapy of rat rhabdomyosarcoma tumors," *Cancer Res*, vol. 57, pp. 2555-8, Jul 1 1997.
- [68] S. O. Gollnick, X. Liu, B. Owczarczak, D. A. Musser, and B. W. Henderson, "Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo," *Cancer Res*, vol. 57, pp. 3904-9, Sep 15 1997.
- [69] S. O. Gollnick, S. S. Evans, H. Baumann, B. Owczarczak, P. Maier, L. Vaughan, W. C. Wang, E. Unger, and B. W. Henderson, "Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation," *Br J Cancer*, vol. 88, pp. 1772-9, Jun 2 2003.
- [70] M. Korbelik, J. Sun, and I. Cecic, "Photodynamic therapy-induced cell surface expression and release of heat shock proteins: relevance for tumor response," *Cancer Res*, vol. 65, pp. 1018-26, Feb 1 2005.
- [71] A. Jalili, M. Makowski, T. Switaj, D. Nowis, G. M. Wilczynski, E. Wilczek, M. Chorazy-Massalska, A. Radzikowska, W. Maslinski, L. Bialy, J. Sienko, A. Sieron, M. Adamek, G. Basak, P. Mroz, I. W. Krasnodebski, M. Jakobisiak, and J. Golab, "Effective photoimmunotherapy of murine colon carcinoma induced by the combination of photodynamic therapy and dendritic cells," *Clin Cancer Res*, vol. 10, pp. 4498-508, Jul 1 2004.
- [72] H. M. Beere, "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis," *J Cell Sci*, vol. 117, pp. 2641-51, Jun 1 2004.

- [73] A. D. Garg, D. Nowis, J. Golab, P. Vandenabeele, D. V. Krysko, and P. Agostinis, "Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1805, pp. 53-71, Jan 2010.
- [74] A. Tissieres, H. K. Mitchell, and U. M. Tracy, "Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs," *J Mol Biol*, vol. 84, pp. 389-98, Apr 15 1974.
- [75] D. Lanneau, G. Wettstein, P. Bonniaud, and C. Garrido, "Heat shock proteins: cell protection through protein triage," *ScientificWorldJournal*, vol. 10, pp. 1543-52, 2010.
- [76] D. Lanneau, M. Brunet, E. Frisan, E. Solary, M. Fontenay, and C. Garrido, "Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation," *J Cell Mol Med*, vol. 12, pp. 743-61, Jun 2008.
- [77] R. J. Ellis and S. M. van der Vies, "Molecular chaperones," *Annu Rev Biochem*, vol. 60, pp. 321-47, 1991.
- [78] M. W. Head, E. Corbin, and J. E. Goldman, "Coordinate and independent regulation of alpha B-crystallin and hsp27 expression in response to physiological stress," *J Cell Physiol*, vol. 159, pp. 41-50, Apr 1994.
- [79] S. M. Todryk, M. J. Gough, and A. G. Pockley, "Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential," *Immunology*, vol. 110, pp. 1-9, Sep 2003.
- [80] C. Jantschitsch and F. Trautinger, "Heat shock and UV-B-induced DNA damage and mutagenesis in skin," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 2, pp. 899-903, Sep 2003.
- [81] K. Richter, M. Haslbeck, and J. Buchner, "The heat shock response: life on the verge of death," *Mol Cell*, vol. 40, pp. 253-66, Oct 22 2010.
- [82] U. Feige and B. S. Polla, "Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications," *Experientia*, vol. 50, pp. 979-86, Nov 30 1994.
- [83] H. M. Beere and D. R. Green, "Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis," *Trends Cell Biol*, vol. 11, pp. 6-10, Jan 2001.
- [84] M. P. Mayer and B. Bukau, "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism," *Cell Mol Life Sci*, vol. 62, pp. 670-84, Mar 2005.
- [85] A. Mathew, S. K. Mathur, C. Jolly, S. G. Fox, S. Kim, and R. I. Morimoto, "Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2," *Mol Cell Biol*, vol. 21, pp. 7163-71, Nov 2001.
- [86] C. Jolly, L. Konecny, D. L. Grady, Y. A. Kutsikova, J. J. Cotto, R. I. Morimoto, and C. Vourc'h, "In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress," *J Cell Biol*, vol. 156, pp. 775-81, Mar 4 2002.
- [87] R. A. Stuart, D. M. Cyr, and W. Neupert, "Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation," *Experientia*, vol. 50, pp. 1002-11, Nov 30 1994.
- [88] K. Helmbrecht, E. Zeise, and L. Rensing, "Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review," *Cell Prolif*, vol. 33, pp. 341-65, Dec 2000.
- [89] L. Ravagnan, S. Gurbuxani, S. A. Susin, C. Maise, E. Daugas, N. Zamzami, T. Mak, M. Jaattela, J. M. Penninger, C. Garrido, and G. Kroemer, "Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor," *Nat Cell Biol*, vol. 3, pp. 839-43, Sep 2001.
- [90] M. Jaattela, "Escaping cell death: survival proteins in cancer," *Exp Cell Res*, vol. 248, pp. 30-43, Apr 10 1999.
- [91] Y. Q. Wei, X. Zhao, Y. Kariya, K. Teshigawara, and A. Uchida, "Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells," *Cancer Immunol Immunother*, vol. 40, pp. 73-8, Feb 1995.
- [92] V. L. Gabai, A. B. Meriin, J. A. Yaglom, V. Z. Volloch, and M. Y. Sherman, "Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging," *FEBS Lett*, vol. 438, pp. 1-4, Oct 30 1998.
- [93] A. Asea, S. K. Kraeft, E. A. Kurt-Jones, M. A. Stevenson, L. B. Chen, R. W. Finberg, G. C. Koo, and S. K. Calderwood, "HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant

- pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine," *Nat Med*, vol. 6, pp. 435-42, Apr 2000.
- [94] A. Asea, M. Rehli, E. Kabingu, J. A. Boch, O. Bare, P. E. Auron, M. A. Stevenson, and S. K. Calderwood, "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4," *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 15028-34, Apr 26 2002.
- [95] S. Basu, R. J. Binder, T. Ramalingam, and P. K. Srivastava, "CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin," *Immunity*, vol. 14, pp. 303-13, Mar 2001.
- [96] S. Basu, R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson, and P. K. Srivastava, "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway," *Int Immunol*, vol. 12, pp. 1539-46, Nov 2000.
- [97] H. Singh-Jasuja, H. U. Scherer, N. Hilf, D. Arnold-Schild, H. G. Rammensee, R. E. Toes, and H. Schild, "The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor," *Eur J Immunol*, vol. 30, pp. 2211-5, Aug 2000.
- [98] S. B. Flohe, J. Bruggemann, S. Lendemans, M. Nikulina, G. Meierhoff, S. Flohe, and H. Kolb, "Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype," *J Immunol*, vol. 170, pp. 2340-8, Mar 1 2003.
- [99] C. J. Gomer, S. W. Ryter, A. Ferrario, N. Rucker, S. Wong, and A. M. Fisher, "Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins," *Cancer Res*, vol. 56, pp. 2355-60, May 15 1996.
- [100] M. Korbelik and J. Sun, "Photodynamic therapy-generated vaccine for cancer therapy," *Cancer Immunol Immunother*, vol. 55, pp. 900-9, Aug 2006.
- [101] B. Stott and M. Korbelik, "Activation of complement C3, C5, and C9 genes in tumors treated by photodynamic therapy," *Cancer Immunol Immunother*, vol. 56, pp. 649-58, May 2007.
- [102] J. C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, "Immunobiology 6th ed.," *Garland, London*, 2005.
- [103] C. A. Janeway, Jr. and R. Medzhitov, "Innate immune recognition," *Annu Rev Immunol*, vol. 20, pp. 197-216, 2002.
- [104] R. Medzhitov and C. A. Janeway, Jr., "Innate immunity: impact on the adaptive immune response," *Curr Opin Immunol*, vol. 9, pp. 4-9, Feb 1997.
- [105] P. Matzinger, "Tolerance, danger, and the extended family," *Annu Rev Immunol*, vol. 12, pp. 991-1045, 1994.
- [106] P. Matzinger, "The danger model: a renewed sense of self," *Science*, vol. 296, pp. 301-5, Apr 12 2002.
- [107] L. J. McHeyzer-Williams and M. G. McHeyzer-Williams, "Antigen-specific memory B cell development," *Annu Rev Immunol*, vol. 23, pp. 487-513, 2005.
- [108] F. Sallusto, J. Geginat, and A. Lanzavecchia, "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance," *Annu Rev Immunol*, vol. 22, pp. 745-63, 2004.
- [109] R. M. Steinman and Z. A. Cohn, "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution," *J Exp Med*, vol. 137, pp. 1142-62, May 1 1973.
- [110] C. Caux, C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, and J. Banchereau, "GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells," *Nature*, vol. 360, pp. 258-61, Nov 19 1992.
- [111] F. Sallusto and A. Lanzavecchia, "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha," *J Exp Med*, vol. 179, pp. 1109-18, Apr 1 1994.
- [112] K. Schlienger, N. Craighead, K. P. Lee, B. L. Levine, and C. H. June, "Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells," *Blood*, vol. 96, pp. 3490-8, Nov 15 2000.

- [113] A. Mondino, A. Khoruts, and M. K. Jenkins, "The anatomy of T-cell activation and tolerance," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, pp. 2245-52, Mar 19 1996.
- [114] S. Vandenabeele and L. Wu, "Dendritic cell origins: puzzles and paradoxes," *Immunol Cell Biol*, vol. 77, pp. 411-9, Oct 1999.
- [115] L. Wu and Y. J. Liu, "Development of dendritic-cell lineages," *Immunity*, vol. 26, pp. 741-50, Jun 2007.
- [116] J. Banchereau, F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka, "Immunobiology of dendritic cells," *Annu Rev Immunol*, vol. 18, pp. 767-811, 2000.
- [117] M. Lopez-Bravo and C. Ardavin, "In vivo induction of immune responses to pathogens by conventional dendritic cells," *Immunity*, vol. 29, pp. 343-51, Sep 19 2008.
- [118] C. Caux, S. Ait-Yahia, K. Chemin, O. de Bouteiller, M. C. Dieu-Nosjean, B. Homey, C. Massacrier, B. Vanbervliet, A. Zlotnik, and A. Vicari, "Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines," *Springer Semin Immunopathol*, vol. 22, pp. 345-69, 2000.
- [119] H. Yoneyama, K. Matsuno, and K. Matsushimaa, "Migration of dendritic cells," *Int J Hematol*, vol. 81, pp. 204-7, Apr 2005.
- [120] A. Macagno, G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, "Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation," *Trends Immunol*, vol. 28, pp. 227-33, May 2007.
- [121] F. Martinon and J. Tschopp, "NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens," *Trends Immunol*, vol. 26, pp. 447-54, Aug 2005.
- [122] S. J. Turley, K. Inaba, W. S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R. M. Steinman, and I. Mellman, "Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells," *Science*, vol. 288, pp. 522-7, Apr 21 2000.
- [123] B. de Saint-Vis, I. Fugier-Vivier, C. Massacrier, C. Gaillard, B. Vanbervliet, S. Ait-Yahia, J. Banchereau, Y. J. Liu, S. Lebecque, and C. Caux, "The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation," *J Immunol*, vol. 160, pp. 1666-76, Feb 15 1998.
- [124] L. J. Sigal, S. Crotty, R. Andino, and K. L. Rock, "Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen," *Nature*, vol. 398, pp. 77-80, Mar 4 1999.
- [125] C. C. Norbury, B. J. Chambers, A. R. Prescott, H. G. Ljunggren, and C. Watts, "Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells," *Eur J Immunol*, vol. 27, pp. 280-8, Jan 1997.
- [126] E. Pamer and P. Cresswell, "Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing," *Annu Rev Immunol*, vol. 16, pp. 323-58, 1998.
- [127] E. S. Trombetta and I. Mellman, "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo," *Annu Rev Immunol*, vol. 23, pp. 975-1028, 2005.
- [128] E. Palmer, "Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire," *Nat Rev Immunol*, vol. 3, pp. 383-91, May 2003.
- [129] J. M. Curtsinger, D. C. Lins, and M. F. Mescher, "Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function," *J Exp Med*, vol. 197, pp. 1141-51, May 5 2003.
- [130] A. Lanzavecchia and F. Sallusto, "Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells," *Science*, vol. 290, pp. 92-7, Oct 6 2000.
- [131] A. Lanzavecchia and F. Sallusto, "From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation," *Curr Opin Immunol*, vol. 12, pp. 92-8, Feb 2000.
- [132] J. Banchereau and R. M. Steinman, "Dendritic cells and the control of immunity," *Nature*, vol. 392, pp. 245-52, Mar 19 1998.
- [133] M. F. Lipscomb and B. J. Masten, "Dendritic cells: immune regulators in health and disease," *Physiol Rev*, vol. 82, pp. 97-130, Jan 2002.

- [134] J. T. Pribila, A. C. Quale, K. L. Mueller, and Y. Shimizu, "Integrins and T cell-mediated immunity," *Annu Rev Immunol*, vol. 22, pp. 157-80, 2004.
- [135] B. M. Carreno and M. Collins, "The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses," *Annu Rev Immunol*, vol. 20, pp. 29-53, 2002.
- [136] C. Orabona, U. Grohmann, M. L. Belladonna, F. Fallarino, C. Vacca, R. Bianchi, S. Bozza, C. Volpi, B. L. Salomon, M. C. Fioretti, L. Romani, and P. Puccetti, "CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86," *Nat Immunol*, vol. 5, pp. 1134-42, Nov 2004.
- [137] A. D. McLellan, R. V. Sorg, L. A. Williams, and D. N. Hart, "Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway," *Eur J Immunol*, vol. 26, pp. 1204-10, Jun 1996.
- [138] M. Moser and K. M. Murphy, "Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development," *Nat Immunol*, vol. 1, pp. 199-205, Sep 2000.
- [139] S. J. Szabo, B. M. Sullivan, S. L. Peng, and L. H. Glimcher, "Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses," *Annu Rev Immunol*, vol. 21, pp. 713-58, 2003.
- [140] K. A. Mowen and L. H. Glimcher, "Signaling pathways in Th2 development," *Immunol Rev*, vol. 202, pp. 203-22, Dec 2004.
- [141] Y. Ohshima and G. Delespesse, "T cell-derived IL-4 and dendritic cell-derived IL-12 regulate the lymphokine-producing phenotype of alloantigen-primed naive human CD4 T cells," *J Immunol*, vol. 158, pp. 629-36, Jan 15 1997.
- [142] C. A. Wenner, M. L. Guler, S. E. Macatonia, A. O'Garra, and K. M. Murphy, "Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development," *J Immunol*, vol. 156, pp. 1442-7, Feb 15 1996.
- [143] C. Hardt, "Angeborene Immunität," 2009.
- [144] R. V. Sorg, S. Andres, G. Kogler, J. Fischer, and P. Wernet, "Phenotypic and functional comparison of monocytes from cord blood and granulocyte colony-stimulating factor-mobilized apheresis products," *Exp Hematol*, vol. 29, pp. 1289-94, Nov 2001.
- [145] M. Winter, X. N. Wang, W. Daubener, A. Eyking, M. Rae, A. M. Dickinson, P. Wernet, G. Kogler, and R. V. Sorg, "Suppression of cellular immunity by cord blood-derived unrestricted somatic stem cells is cytokine-dependent," *J Cell Mol Med*, vol. 13, pp. 2465-75, Aug 2009.
- [146] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *J Immunol Methods*, vol. 65, pp. 55-63, Dec 16 1983.
- [147] N. Ertinç, C. Peters, J. Ficnar, S. Anlasik, E. Bunemann, P. J. Slotty, D. Hanggi, H. J. Steiger, R. V. Sorg, and W. Stummer, "Modulation of migratory activity and invasiveness of human glioma spheroids following 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment," *J Neurosurg*, Apr 22 2011.
- [148] A. P. Castano, P. Mroz, and M. R. Hamblin, "Photodynamic therapy and anti-tumour immunity," *Nat Rev Cancer*, vol. 6, pp. 535-45, Jul 2006.
- [149] D. K. Binder and M. S. Berger, "Proteases and the biology of glioma invasion," *J Neurooncol*, vol. 56, pp. 149-58, Jan 2002.
- [150] F. Jiang, M. Chopp, M. Katakowski, K. K. Cho, X. Yang, N. Hochbaum, L. Tong, and T. Mikkelsen, "Photodynamic therapy with photofrin reduces invasiveness of malignant human glioma cells," *Lasers Med Sci*, vol. 17, pp. 280-8, 2002.
- [151] T. Tsai, H. T. Ji, P. C. Chiang, R. H. Chou, W. S. Chang, and C. T. Chen, "ALA-PDT results in phenotypic changes and decreased cellular invasion in surviving cancer cells," *Lasers Surg Med*, vol. 41, pp. 305-15, Apr 2009.
- [152] H. Hirschberg, C. H. Sun, T. Krasieva, and S. J. Madsen, "Effects of ALA-mediated photodynamic therapy on the invasiveness of human glioma cells," *Lasers Surg Med*, vol. 38, pp. 939-45, Dec 2006.
- [153] A. Giese, M. A. Loo, M. D. Rief, N. Tran, and M. E. Berens, "Substrates for astrocytoma invasion," *Neurosurgery*, vol. 37, pp. 294-301; discussion 301-2, Aug 1995.

- [154] R. K. Nuttall, C. J. Pennington, J. Taplin, A. Wheal, V. W. Yong, P. A. Forsyth, and D. R. Edwards, "Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells," *Mol Cancer Res*, vol. 1, pp. 333-45, Mar 2003.
- [155] J. H. Hur, M. J. Park, I. C. Park, D. H. Yi, C. H. Rhee, S. I. Hong, and S. H. Lee, "Matrix metalloproteinases in human gliomas: activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) may be correlated with membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) expression," *J Korean Med Sci*, vol. 15, pp. 309-14, Jun 2000.
- [156] S. Wagner, C. Stegen, H. Bouterfa, C. Huettner, S. Kerkau, W. Roggendorf, K. Roosen, and J. C. Tonn, "Expression of matrix metalloproteinases in human glioma cell lines in the presence of IL-10," *J Neurooncol*, vol. 40, pp. 113-22, Nov 1998.
- [157] C. Wild-Bode, M. Weller, and W. Wick, "Molecular determinants of glioma cell migration and invasion," *J Neurosurg*, vol. 94, pp. 978-84, Jun 2001.
- [158] M. Rossi, H. K. Rooprai, S. L. Maidment, G. J. Rucklidge, and G. J. Pilkington, "The influence of sequential, in vitro passage on secretion of matrix metalloproteinases by human brain tumour cells," *Anticancer Res*, vol. 16, pp. 121-8, Jan-Feb 1996.
- [159] P. A. Forsyth, T. D. Laing, A. W. Gibson, N. B. Rewcastle, P. Brasher, G. Sutherland, R. N. Johnston, and D. R. Edwards, "High levels of gelatinase-B and active gelatinase-A in metastatic glioblastoma," *J Neurooncol*, vol. 36, pp. 21-9, Jan 1998.
- [160] P. A. Forsyth, H. Wong, T. D. Laing, N. B. Rewcastle, D. G. Morris, H. Muzik, K. J. Leco, R. N. Johnston, P. M. Brasher, G. Sutherland, and D. R. Edwards, "Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas," *Br J Cancer*, vol. 79, pp. 1828-35, Apr 1999.
- [161] C. M. Au, S. K. Luk, C. J. Jackson, H. K. Ng, C. M. Yow, and S. S. To, "Differential effects of photofrin, 5-aminolevulinic acid and calphostin C on glioma cells," *J Photochem Photobiol B*, vol. 85, pp. 92-101, Nov 1 2006.
- [162] E. S. Chu, T. K. Wong, and C. M. Yow, "Photodynamic effect in medulloblastoma: downregulation of matrix metalloproteinases and human telomerase reverse transcriptase expressions," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 7, pp. 76-83, Jan 2008.
- [163] S. L. Maidment, "The cytoskeleton and brain tumour cell migration," *Anticancer Res*, vol. 17, pp. 4145-9, Nov-Dec 1997.
- [164] A. Uzdensky, E. Kolpakova, A. Juzeniene, P. Juzenas, and J. Moan, "The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1722, pp. 43-50, Feb 11 2005.
- [165] S. J. Madsen, C. H. Sun, B. J. Tromberg, and H. Hirschberg, "Repetitive 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on human glioma spheroids," *J Neurooncol*, vol. 62, pp. 243-50, May 2003.
- [166] M. Yilmaz and G. Christofori, "EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion," *Cancer Metastasis Rev*, vol. 28, pp. 15-33, Jun 2009.
- [167] K. Polyak and R. A. Weinberg, "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits," *Nat Rev Cancer*, vol. 9, pp. 265-73, Apr 2009.
- [168] M. Yilmaz and G. Christofori, "Mechanisms of motility in metastasizing cells," *Mol Cancer Res*, vol. 8, pp. 629-42, May 2010.
- [169] J. P. Thiery, H. Acloque, R. Y. Huang, and M. A. Nieto, "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease," *Cell*, vol. 139, pp. 871-90, Nov 25 2009.
- [170] R. Kalluri and R. A. Weinberg, "The basics of epithelial-mesenchymal transition," *J Clin Invest*, vol. 119, pp. 1420-8, Jun 2009.
- [171] I. Cecic, C. S. Parkins, and M. Korbelik, "Induction of systemic neutrophil response in mice by photodynamic therapy of solid tumors," *Photochem Photobiol*, vol. 74, pp. 712-20, Nov 2001.

- [172] J. Sun, I. Cecic, C. S. Parkins, and M. Korbely, "Neutrophils as inflammatory and immune effectors in photodynamic therapy-treated mouse SCCVII tumours," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 1, pp. 690-5, Sep 2002.
- [173] G. Krosli, M. Korbely, and G. J. Dougherty, "Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy," *Br J Cancer*, vol. 71, pp. 549-55, Mar 1995.
- [174] M. Korbely and I. Cecic, "Contribution of myeloid and lymphoid host cells to the curative outcome of mouse sarcoma treatment by photodynamic therapy," *Cancer Lett*, vol. 137, pp. 91-8, Mar 22 1999.
- [175] W. J. de Vree, M. C. Essers, H. S. de Bruijn, W. M. Star, J. F. Koster, and W. Sluiter, "Evidence for an important role of neutrophils in the efficacy of photodynamic therapy in vivo," *Cancer Res*, vol. 56, pp. 2908-11, Jul 1 1996.
- [176] S. Evans, W. Matthews, R. Perry, D. Fraker, J. Norton, and H. I. Pass, "Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages," *J Natl Cancer Inst*, vol. 82, pp. 34-9, Jan 3 1990.
- [177] G. Kick, G. Messer, A. Goetz, G. Plewig, and P. Kind, "Photodynamic therapy induces expression of interleukin 6 by activation of AP-1 but not NF-kappa B DNA binding," *Cancer Res*, vol. 55, pp. 2373-9, Jun 1 1995.
- [178] S. S. Yom, T. M. Busch, J. S. Friedberg, E. P. Wileyto, D. Smith, E. Glatstein, and S. M. Hahn, "Elevated serum cytokine levels in mesothelioma patients who have undergone pleurectomy or extrapleural pneumonectomy and adjuvant intraoperative photodynamic therapy," *Photochem Photobiol*, vol. 78, pp. 75-81, Jul 2003.
- [179] J. A. Hendrzak-Henion, T. L. Knisely, L. Cincotta, E. Cincotta, and A. H. Cincotta, "Role of the immune system in mediating the antitumor effect of benzophenothiazine photodynamic therapy," *Photochem Photobiol*, vol. 69, pp. 575-81, May 1999.
- [180] D. Preise, R. Oren, I. Glinert, V. Kalchenko, S. Jung, A. Scherz, and Y. Salomon, "Systemic antitumor protection by vascular-targeted photodynamic therapy involves cellular and humoral immunity," *Cancer Immunol Immunother*, vol. 58, pp. 71-84, Jan 2009.
- [181] H. Ueno, N. Schmitt, E. Klechevsky, A. Pedroza-Gonzalez, T. Matsui, G. Zurawski, S. Oh, J. Fay, V. Pascual, J. Banachereau, and K. Palucka, "Harnessing human dendritic cell subsets for medicine," *Immunol Rev*, vol. 234, pp. 199-212, Mar 2010.
- [182] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbely, J. Moan, and Q. Peng, "Photodynamic therapy," *J Natl Cancer Inst*, vol. 90, pp. 889-905, Jun 17 1998.
- [183] G. Canti, D. Lattuada, A. Nicolini, P. Taroni, G. Valentini, and R. Cubeddu, "Antitumor immunity induced by photodynamic therapy with aluminum disulfonated phthalocyanines and laser light," *Anticancer Drugs*, vol. 5, pp. 443-7, Aug 1994.
- [184] G. Pawelec, "Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing?," *Cancer Immunol Immunother*, vol. 53, pp. 262-74, Mar 2004.
- [185] G. Pawelec, "Immunotherapy and immunoselection -- tumour escape as the final hurdle," *FEBS Lett*, vol. 567, pp. 63-6, Jun 1 2004.
- [186] T. L. Whiteside, "Immune responses to malignancies," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 125, pp. S272-83, Feb 2010.
- [187] M. L. Albert, S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein, and N. Bhardwaj, "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes," *J Exp Med*, vol. 188, pp. 1359-68, Oct 5 1998.
- [188] M. L. Albert, B. Sauter, and N. Bhardwaj, "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs," *Nature*, vol. 392, pp. 86-9, Mar 5 1998.
- [189] J. Dalgaard, K. J. Beckstrom, F. L. Jahnsen, and J. E. Brinchmann, "Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets," *J Leukoc Biol*, vol. 77, pp. 689-98, May 2005.
- [190] S. O. Gollnick, L. Vaughan, and B. W. Henderson, "Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy," *Cancer Res*, vol. 62, pp. 1604-8, Mar 15 2002.

- [191] H. Saji, W. Song, K. Furumoto, H. Kato, and E. G. Engleman, "Systemic antitumor effect of intratumoral injection of dendritic cells in combination with local photodynamic therapy," *Clin Cancer Res*, vol. 12, pp. 2568-74, Apr 15 2006.
- [192] B. W. Sur, P. Nguyen, C. H. Sun, B. J. Tromberg, and E. L. Nelson, "Immunophototherapy using PDT combined with rapid intratumoral dendritic cell injection," *Photochem Photobiol*, vol. 84, pp. 1257-64, Sep-Oct 2008.
- [193] M. Chen and J. Wang, "Programmed cell death of dendritic cells in immune regulation," *Immunol Rev*, vol. 236, pp. 11-27, Jul 2010.
- [194] R. Tisch, "Immunogenic versus tolerogenic dendritic cells: a matter of maturation," *Int Rev Immunol*, vol. 29, pp. 111-8, Apr 2010.
- [195] D. R. Green, T. Ferguson, L. Zitvogel, and G. Kroemer, "Immunogenic and tolerogenic cell death," *Nat Rev Immunol*, vol. 9, pp. 353-63, May 2009.
- [196] R. M. Steinman, D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig, "Tolerogenic dendritic cells," *Annu Rev Immunol*, vol. 21, pp. 685-711, 2003.
- [197] A. E. O'Connor, M. M. McGee, Y. Likar, V. Ponomarev, J. J. Callanan, F. O'Shea D, A. T. Byrne, and W. M. Gallagher, "Mechanism of cell death mediated by a BF(2) -chelated tetraryl-azadipyromethene photodynamic therapeutic: Dissection of the apoptotic pathway in vitro and in vivo," *Int J Cancer*, Mar 16 2011.
- [198] M. Dellinger, "Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol," *Photochem Photobiol*, vol. 64, pp. 182-7, Jul 1996.
- [199] F. Ghiringhelli, L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J. L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Genin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. Andre, R. Lidereau, N. M. McLaughlin, N. M. Haynes, M. J. Smyth, G. Kroemer, and L. Zitvogel, "Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors," *Nat Med*, vol. 15, pp. 1170-8, Oct 2009.
- [200] S. Karmakar, N. L. Banik, S. J. Patel, and S. K. Ray, "5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells," *Neurosci Lett*, vol. 415, pp. 242-7, Mar 30 2007.
- [201] L. Zitvogel, O. Kepp, and G. Kroemer, "Decoding cell death signals in inflammation and immunity," *Cell*, vol. 140, pp. 798-804, Mar 19 2010.
- [202] T. Panaretakis, O. Kepp, U. Brockmeier, A. Tesniere, A. C. Bjorklund, D. C. Chapman, M. Durchschlag, N. Joza, G. Pierron, P. van Endert, J. Yuan, L. Zitvogel, F. Madeo, D. B. Williams, and G. Kroemer, "Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death," *EMBO J*, vol. 28, pp. 578-90, Mar 4 2009.
- [203] R. J. Binder, D. K. Han, and P. K. Srivastava, "CD91: a receptor for heat shock protein gp96," *Nat Immunol*, vol. 1, pp. 151-5, Aug 2000.
- [204] R. Spisek, A. Charalambous, A. Mazumder, D. H. Vesole, S. Jagannath, and M. V. Dhodapkar, "Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications," *Blood*, vol. 109, pp. 4839-45, Jun 1 2007.
- [205] N. L. Oleinick and H. H. Evans, "The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms," *Radiat Res*, vol. 150, pp. S146-56, Nov 1998.
- [206] A. K. Verrico, A. K. Haylett, and J. V. Moore, "In vivo expression of the collagen-related heat shock protein HSP47, following hyperthermia or photodynamic therapy," *Lasers Med Sci*, vol. 16, pp. 192-8, 2001.
- [207] J. G. Hanlon, K. Adams, A. J. Rainbow, R. S. Gupta, and G. Singh, "Induction of Hsp60 by Photofrin-mediated photodynamic therapy," *J Photochem Photobiol B*, vol. 64, pp. 55-61, Nov 1 2001.
- [208] G. Canti, A. De Simone, and M. Korbely, "Photodynamic therapy and the immune system in experimental oncology," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 1, pp. 79-80, Jan 2002.

- [209] S. O. Gollnick, B. Owczarczak, and P. Maier, "Photodynamic therapy and anti-tumor immunity," *Lasers Surg Med*, vol. 38, pp. 509-15, Jun 2006.
- [210] P. S. Thong, K. W. Ong, N. S. Goh, K. W. Kho, V. Manivasager, R. Bhuvaneswari, M. Olivo, and K. C. Soo, "Photodynamic-therapy-activated immune response against distant untreated tumours in recurrent angiosarcoma," *Lancet Oncol*, vol. 8, pp. 950-2, Oct 2007.
- [211] A. D. Garg, D. Nowis, J. Golab, and P. Agostinis, "Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity," *Apoptosis*, vol. 15, pp. 1050-71, Sep 2010.
- [212] F. Zhou, D. Xing, and W. R. Chen, "Regulation of HSP70 on activating macrophages using PDT-induced apoptotic cells," *Int J Cancer*, vol. 125, pp. 1380-9, Sep 15 2009.
- [213] A. Asea, "Chaperokine-induced signal transduction pathways," *Exerc Immunol Rev*, vol. 9, pp. 25-33, 2003.
- [214] M. F. Tsan and B. Gao, "Heat shock proteins and immune system," *J Leukoc Biol*, vol. 85, pp. 905-10, Jun 2009.
- [215] Z. Fabry, C. S. Raine, and M. N. Hart, "Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS," *Immunol Today*, vol. 15, pp. 218-24, May 1994.
- [216] B. R. Tambuyzer, P. Ponsaerts, and E. J. Nouwen, "Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology," *J Leukoc Biol*, vol. 85, pp. 352-70, Mar 2009.
- [217] M. Greter, F. L. Heppner, M. P. Lemos, B. M. Odermatt, N. Goebels, T. Laufer, R. J. Noelle, and B. Becher, "Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis," *Nat Med*, vol. 11, pp. 328-34, Mar 2005.
- [218] A. L. Zozulya, E. Reinke, D. C. Baiu, J. Karman, M. Sandor, and Z. Fabry, "Dendritic cell transmigration through brain microvessel endothelium is regulated by MIP-1alpha chemokine and matrix metalloproteinases," *J Immunol*, vol. 178, pp. 520-9, Jan 1 2007.
- [219] K. Biernacki, A. Prat, M. Blain, and J. P. Antel, "Regulation of cellular and molecular trafficking across human brain endothelial cells by Th1- and Th2-polarized lymphocytes," *J Neuropathol Exp Neurol*, vol. 63, pp. 223-32, Mar 2004.
- [220] B. Engelhardt, "Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier," *J Neural Transm*, vol. 113, pp. 477-85, Apr 2006.
- [221] C. L. Maslin, K. Kedzierska, N. L. Webster, W. A. Muller, and S. M. Crowe, "Transendothelial migration of monocytes: the underlying molecular mechanisms and consequences of HIV-1 infection," *Curr HIV Res*, vol. 3, pp. 303-17, Oct 2005.
- [222] A. Prat, K. Biernacki, and J. P. Antel, "Th1 and Th2 lymphocyte migration across the human BBB is specifically regulated by interferon beta and copolymer-1," *J Autoimmun*, vol. 24, pp. 119-24, Mar 2005.
- [223] J. S. Yu, C. J. Wheeler, P. M. Zeltzer, H. Ying, D. N. Finger, P. K. Lee, W. H. Yong, F. Incardona, R. C. Thompson, M. S. Riedinger, W. Zhang, R. M. Prins, and K. L. Black, "Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration," *Cancer Res*, vol. 61, pp. 842-7, Feb 1 2001.
- [224] R. Yamanaka, T. Abe, N. Yajima, N. Tsuchiya, J. Homma, T. Kobayashi, M. Narita, M. Takahashi, and R. Tanaka, "Vaccination of recurrent glioma patients with tumour lysate-pulsed dendritic cells elicits immune responses: results of a clinical phase I/II trial," *Br J Cancer*, vol. 89, pp. 1172-9, Oct 6 2003.
- [225] J. S. Yu, G. Liu, H. Ying, W. H. Yong, K. L. Black, and C. J. Wheeler, "Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma," *Cancer Res*, vol. 64, pp. 4973-9, Jul 15 2004.
- [226] S. Rutkowski, S. De Vleeschouwer, E. Kaempgen, J. E. Wolff, J. Kuhl, P. Demaerel, M. Warmuth-Metz, P. Flamen, F. Van Calenbergh, C. Plets, N. Sorensen, A. Opitz, and S. W. Van Gool, "Surgery and adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for patients with relapsed malignant glioma, a feasibility study," *Br J Cancer*, vol. 91, pp. 1656-62, Nov 1 2004.
- [227] C. J. Wheeler, A. Das, G. Liu, J. S. Yu, and K. L. Black, "Clinical responsiveness of glioblastoma multiforme to chemotherapy after vaccination," *Clin Cancer Res*, vol. 10, pp. 5316-26, Aug 15 2004.

- [228] L. M. Liao, R. M. Prins, S. M. Kiertscher, S. K. Odesa, T. J. Kremen, A. J. Giovannone, J. W. Lin, D. J. Chute, P. S. Mischel, T. F. Cloughesy, and M. D. Roth, "Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment," *Clin Cancer Res*, vol. 11, pp. 5515-25, Aug 1 2005.
- [229] R. Yamanaka, J. Homma, N. Yajima, N. Tsuchiya, M. Sano, T. Kobayashi, S. Yoshida, T. Abe, M. Narita, M. Takahashi, and R. Tanaka, "Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial," *Clin Cancer Res*, vol. 11, pp. 4160-7, Jun 1 2005.
- [230] A. Soling and N. G. Rainov, "Dendritic cell therapy of primary brain tumors," *Mol Med*, vol. 7, pp. 659-67, Oct 2001.
- [231] D. G. Walker, R. Laherty, F. H. Tomlinson, T. Chuah, and C. Schmidt, "Results of a phase I dendritic cell vaccine trial for malignant astrocytoma: potential interaction with adjuvant chemotherapy," *J Clin Neurosci*, vol. 15, pp. 114-21, Feb 2008.
- [232] C. J. Wheeler, K. L. Black, G. Liu, M. Mazer, X. X. Zhang, S. Pepkowitz, D. Goldfinger, H. Ng, D. Irvin, and J. S. Yu, "Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients," *Cancer Res*, vol. 68, pp. 5955-64, Jul 15 2008.
- [233] S. De Vleeschouwer, S. Fieuw, S. Rutkowski, F. Van Calenbergh, J. Van Loon, J. Goffin, R. Sciot, G. Wilms, P. Demaerel, M. Warmuth-Metz, N. Soerensen, J. E. Wolff, S. Wagner, E. Kaempgen, and S. W. Van Gool, "Postoperative adjuvant dendritic cell-based immunotherapy in patients with relapsed glioblastoma multiforme," *Clin Cancer Res*, vol. 14, pp. 3098-104, May 15 2008.
- [234] J. H. Sampson, G. E. Archer, D. A. Mitchell, A. B. Heimberger, J. E. Herndon, 2nd, D. Lally-Goss, S. McGehee-Norman, A. Paolino, D. A. Reardon, A. H. Friedman, H. S. Friedman, and D. D. Bigner, "An epidermal growth factor receptor variant III-targeted vaccine is safe and immunogenic in patients with glioblastoma multiforme," *Mol Cancer Ther*, vol. 8, pp. 2773-9, Oct 2009.
- [235] H. Ardon, S. De Vleeschouwer, F. Van Calenbergh, L. Claes, C. M. Kramm, S. Rutkowski, J. E. Wolff, and S. W. Van Gool, "Adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for children with malignant brain tumours," *Pediatr Blood Cancer*, vol. 54, pp. 519-25, Apr 2010.
- [236] H. Ardon, S. Van Gool, I. S. Lopes, W. Maes, R. Sciot, G. Wilms, P. Demaerel, P. Bijttebier, L. Claes, J. Goffin, F. Van Calenbergh, and S. De Vleeschouwer, "Integration of autologous dendritic cell-based immunotherapy in the primary treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme: a pilot study," *J Neurooncol*, vol. 99, pp. 261-72, Sep 2010.
- [237] J. Karman, C. Ling, M. Sandor, and Z. Fabry, "Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells," *J Immunol*, vol. 173, pp. 2353-61, Aug 15 2004.
- [238] J. Karman, C. Ling, M. Sandor, and Z. Fabry, "Dendritic cells in the initiation of immune responses against central nervous system-derived antigens," *Immunol Lett*, vol. 92, pp. 107-15, Mar 29 2004.
- [239] F. Hirschhaeuser, H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, and L. A. Kunz-Schughart, "Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again," *J Biotechnol*, vol. 148, pp. 3-15, Jul 1 2010.
- [240] E. Gottfried, L. A. Kunz-Schughart, R. Andreesen, and M. Kreutz, "Brave little world: spheroids as an in vitro model to study tumor-immune-cell interactions," *Cell Cycle*, vol. 5, pp. 691-5, Apr 2006.
- [241] J. Friedrich, R. Ebner, and L. A. Kunz-Schughart, "Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge?," *Int J Radiat Biol*, vol. 83, pp. 849-71, Nov-Dec 2007.