

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

**Charakterisierung der Migration von
Glioblastomsphäroiden nach photodynamischer
Therapie (PDT) sowie Nachweis des immunogenen
Potentials der PDT**

Dissertation

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

vorgelegt von

Julian Ficnar

2011

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

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

Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Walter Stummer

Korreferent: Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

**Charakterisierung der Migration von
Glioblastomsphäroiden nach photodynamischer
Therapie (PDT) sowie Nachweis des immunogenen
Potentials der PDT**

Julian Ficnar

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich nur von folgenden Personen Unterstützungsleistungen erhalten:

Herrn Professor Dr. med. H.J. Steiger

Herrn Professor Dr. med. W. Stummer

Herrn Dr. med. N. Etminan

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland, noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht worden.

Wesel, den 11.06.11

Julian Ficnar

Für meine Eltern

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent: Prof. Dr. med. Walter Stummer

Korreferent: Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Inhaltsverzeichnis

<u>1 Einleitung</u>	1
1.1 Einordnung des Glioblastoma multiforme und Epidemiologie	1
1.2 Klinik	3
1.3 Diagnostik	3
1.4 Therapiestrategien und Prognose.....	4
1.5 Die Photodynamische Therapie	7
1.6 Fragestellung	7
1.7 Das Sphäroidmodell	9
1.8 Dendritische Zellen	10
<u>2 Methoden</u>	11
2.1 Kultivieren der Zellen in Monolayer-Zellkultur	11
2.2 Einfrieren und Lagerung	12
2.3 Auftauen von Zellen	13
2.4 Beschichtung der Arbeitsmaterialien (Zellkulturflaschen, Petrischalen und 96-Well-Mikrotiterplatten) mit Noble-Agar	13
2.5 Herstellung der Tumorsphäroide	14
2.6 Ansetzen der ALA-Verdünnung.....	15
2.7 Durchführung der ALA-Inkubation und der Verteilung auf die 96-Well- Mikrotiterplatten	15
2.8 Der WST-1-Assay	16
2.9 Durchführung des WST-1-Assays	16
2.10 Schema für die Durchführung des Zellproliferationstests WST-1 mit U373 Tumorsphäroiden zur LD-50 Dosisfindung	17
2.11 Migrationsversuch mit den Zelllinien U373 und A172	19

<u>2.12 Konfrontationsassay mit U373 Sphäroiden und Einzelzellen mit dendritischen Zellen</u>	<u>21</u>
<u>2.13 Statistische Auswertung</u>	<u>25</u>
<u>3 Ergebnisse</u>	<u>27</u>
<u>3.1 Verhalten des WST-1 Tests</u>	<u>27</u>
<u>3.2 Zellvitalität der Sphäroide ohne ALA, nach Bestrahlung</u>	<u>28</u>
<u>3.3 Zellvitalität in Abhängigkeit von der ALA-Dosis, ohne Bestrahlung</u>	<u>29</u>
<u>3.4 Ermittlung einer letalen Dosis 50 (LD-50) bei U373- und A172-Sphäroiden</u>	<u>31</u>
<u>3.5 Migrationsverhalten der Tumorsphäroide, ohne ALA-Behandlung und ohne Bestrahlung</u>	<u>33</u>
<u>3.6 Migrationsverhalten der Tumorsphäroide, ohne ALA-Behandlung und mit Bestrahlung</u>	<u>35</u>
<u>3.7 Migrationsverhalten der Tumorsphäroide mit ALA-Behandlung und ohne Bestrahlung</u>	<u>37</u>
<u>3.8 Verhalten der Tumorsphäroide nach PDT (mit ALA-Behandlung und Bestrahlung)</u>	<u>38</u>
<u>3.9 Vitalitätskontrolle nach einem, vier und 14 Tagen, in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus</u>	<u>40</u>
<u>3.10 Vergleich der Behandlungsmodi im Migrationsversuch mit U373- und A172-Gliomsphäroiden</u>	<u>42</u>
<u>3.11 Vergleich der Migrationsradien / Steigungen in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus</u>	<u>43</u>
<u>3.12 Konfrontationsassays mit DC und Tumorsphäroiden</u>	<u>45</u>
<u>4 Diskussion</u>	<u>50</u>
<u>4.1 Der WST-1 Assay</u>	<u>52</u>

4.2 Das Sphäroidmodell	52
4.3 Die Bedeutung der LD-50 für die Migrations- und Konfrontationsassays ..	54
4.4 Die photodynamische Therapie des GBM	55
4.5 Die inflammatorische Wirkung der PDT	57
4.6 Migrationsversuche	59
4.7 DC, PDT und Tumormunität	60
5 Zusammenfassung	65
6 Literaturverzeichnis	66
7 Anhang	80
7.1 Danksagung	80
7.2 Abbildungsverzeichnis	81
7.3 Abkürzungen	82
7.4 Materialliste	83
7.5 Geräteliste	86
8 Lebenslauf	I

1 Einleitung

1.1 Einordnung des Glioblastoma multiforme und Epidemiologie

Die häufigsten malignen, intrakraniellen Tumoren sind die Glioblastome. Diese machen 15-20 % aller Hirntumore und 80 % der malignen Gliome aus (Radhakrishnan et al. 1995). In den Industrienationen liegt die jährliche Inzidenz von gliomatösen Hirntumoren bei durchschnittlich 16 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohnern (Sant et al. 1988). Drei bis fünf Prozent aller Todesfälle durch Malignome lassen sich auf hirneigene Tumore zurückführen (Kallio et al. 1991). 60 % aller Hirntumore sind neuroepithelialen Ursprungs (Radhakrishnan et al. 1995). Man spricht daher im Gegensatz zu Metastasen von so genannten hirneigenen Tumoren. Da die Gliome in unterschiedlich differenzierter Weise mit unterschiedlichen klinischen Verläufen vorliegen können, wird die biologische Wertigkeit der Gliome durch ein histologisches Grading standardisiert. Am weitesten verbreitet ist das Schema zum Grading von Tumoren des Nervensystems der World Health Organisation (WHO). Hierbei unterscheidet man vier Malignitätsgrade: das pilozytische Astrozytom (WHO-Grad 1), das diffus infiltrierende Astrozytom (WHO-Grad 2), das anaplastische Astrozytom (WHO-Grad 3) und das Glioblastom (WHO-Grad 4). Das pilozytische Astrozytom WHO 1 stellt die benigne Form der astrozytären Tumore dar. Das Glioblastoma multiforme (GBM) WHO IV repräsentiert die bösartigste Verlaufsform der Gliome.

Das Hauptmanifestationsalter befindet sich zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr. Es existieren Studien, die einen Anstieg der Inzidenz an Glioblastomen beschreiben (Shugg et al. 1994).

Als histopathologische Charakteristika des Glioblastoma multiforme gelten Gewebs- und Zellpolymorphien, Gefäßproliferationen mit arteriovenösen Fisteln, Gefäßthrombosen, Blutungen und zentrale Nekrosen (Kleihues et al. 2002). Morphologisch bietet das Glioblastom im makroskopischen Bereich eine

charakteristisch „bunte“ Schnittfläche. Dieses Erscheinungsbild entsteht durch Gewebseinblutungen, grau-weißes Tumorgewebe und gelbliche Nekrosen, die durch das rasch progrediente Tumorwachstum entstehen. Durch dieses makroskopisch sehr heterogene Erscheinungsbild erhält dieser Tumor auch die Bezeichnung „Glioblastoma multiforme“ (GBM). Die Tumorränder lassen sich sowohl makroskopisch, als auch mikroskopisch schlecht von dem gesunden Hirngewebe abgrenzen, da Glioblastome ein stark diffus-infiltrierendes und hoch invasives Wachstum zeigen. Durch diese Eigenschaft wird eine komplette chirurgische Tumoresektion unmöglich gemacht. Das Glioblastom breitet sich entlang kompakter Myelinbahnen aus. Hierdurch kann eine Ausdehnung über den Balken oder die Kommissuren in die kontralaterale Hemisphäre zustande kommen, welches als Schmetterlingsgliom bezeichnet wird.

Das Glioblastom entsteht typischerweise im Marklager, mit einem variablen Abstand zum Kortex. Lappen- oder Hemisphärengrenzen werden von den infiltrierend wachsenden Glioblastomzellen nicht respektiert. Die häufigste Lokalisation des Glioblastoms befindet sich in den Großhirnhemisphären, insbesondere frontotemporal. Seltener kommen Glioblastome in temporaler und parietaler Lage vor (Lucena Rde C. et al. 2006). Gelegentlich treten Glioblastome bei Kindern auf. Ein bevorzugter Manifestationsort ist in diesen Fällen der Hirnstamm (sog. malignes Hirnstammgliom). Nur etwa 5 % treten im Occipitallappen auf (Jubelirer 1992; Simpson et al. 1993; Kleihues et al. 1994). Infratentoriell findet man das GBM extrem selten. Einige von den im Kleinhirn vorkommenden GBM wurden mit zum Teil Jahrzehnte zuvor radiotherapierten Malignomen in Verbindung gebracht (Aziz et al. 1990; Wisoff et al. 1989). Das Glioblastom metastasiert extrem selten in Bereiche außerhalb des ZNS. Hierbei wird die Anlage eines ventrikuloatrialen Shunts als Risikofaktor diskutiert (Smith et al. 1969; Pasquier et al. 1980). Die Ätiologie der Glioblastome ist unbekannt, mit Ausnahme ihres seltenen Auftretens im Rahmen eines Li-Fraumeni-Syndroms. In diesen Fällen liegt eine Keimbahnmutation des p53-Tumorsuppressorgens vor.

1.2 Klinik

Wenn überhaupt macht sich das GBM initial durch unspezifische Symptome, verursacht durch einen gesteigerten Hirndruck wie Kopfschmerz, Übelkeit oder Erbrechen bemerkbar. Bei etwa 50 % der Patienten mit Gehirntumoren kommen Kopfschmerzen als initiales Symptom vor (Forsyth et al. 1993). In Abhängigkeit von der Lokalisation können sich GBM auch durch fokale oder generalisierte neurologische Ausfallserscheinungen klinisch präsentieren. Zu den fokalen Symptomen gehören Hemiparesen, Aphasie, Hemianopsie, aber auch fokale Krampfanfälle. Aufgrund der vorliegenden Symptomatik lassen sich unter Umständen Rückschlüsse auf die intrakranielle bzw. intracerebrale Lokalisation des Tumors schließen. Insbesondere Krampfanfälle können als Erstmanifestation des Glioblastoms auftreten. Hierbei geben postiktale Paresen oder eine Aphasie (Todd'sches Phänomen) möglicherweise Auskunft über die Lage der tumorösen Läsion. Das GBM ist eine hochgradig maligne, destruierend und infiltrierend wachsende Neoplasie mit infauster Prognose (Scott et al. 1998). Das im Endstadium nicht mehr beherrschbare Tumorwachstum führt zu einer zunehmenden Raumforderung, Verlegung der Liquorzirkulation oder pathologischen Blutungen. Der hierdurch stetig zunehmende Hirndruck führt über einen Einklemmungsmechanismus des Hirnstamms durch eine Massenverschiebung schließlich zum Tod. Unter dem derzeitigen Therapiestandard, der kombinierten Radiochemotherapie nach Stupp (2005) beträgt das mediane Überleben 14 Monate. Von prognostischer Bedeutung sind das Lebensalter des Patienten, das Ausmaß der Begleiterkrankungen und fokale neurologische Defizite (Scott et al. 1999).

1.3 Diagnostik

In der klinischen Diagnostik der Glioblastome besitzen die bildgebenden Verfahren, insbesondere die Computer- und Magnetresonanztomographie, einen hohen Stellenwert.

Im Magnetresonanztomogramm (MRT) zeigen Glioblastome eine typisch ring- und girlandenartige Kontrastmittelanreicherung mit unscharfer Begrenzung. Darüber hinaus charakteristisch sind ein tumorzentraler Nekroseherd und ein perifokales Ödem, welches Ausdruck einer Störung der Blut-Hirn-Schranke ist. Das kontrastmittelgestützte MRT mit Gadolinium gilt als Mittel der Wahl zum Nachweis von intrakraniellen Tumoren und gilt als zuverlässige Diagnostik, die eine suffiziente Tumorabgrenzung sowie die sensitive postoperative Tumornachsorge (Tumorreste und -rezidive) ermöglicht (Castel et al. 1989). Die Untersuchung des Glukosestoffwechsels von zerebralen Gliomen mit (18F)-Fluordesoxyglukose (FDG) und der Positronenemissionstomographie ermöglicht Aussagen zur Prognose und Malignitätsgrad. Desweiteren existieren die MET- und FET-Positronen-Emissionstomographien (Wang et al. 2010), die diffusions-gewichtete MRT und die Magnetresonanzspektroskopie (MR-Spektroskopie) als neue Verfahren (Park et al. 2010), welche zur primären Diagnostik, aber auch zur posttherapeutischen Diagnostik und Prognosestellung eingesetzt werden können.

Hier fungiert die MR-Spektroskopie als sehr nützliches Werkzeug zur Diagnostik und Verlaufskontrolle intrakranieller Tumore. Mit der MR-Spektroskopie gelingt in der Regel eine Differenzierung zwischen hirneigenen Tumoren und Metastasen. Zudem ist eine relativ zuverlässige Graduierung der Gliome möglich. Andere Kontrastmittel aufnehmende Läsionen, wie akute Entzündungen, können von Tumoren unterschieden werden (Lanfermann et al. 2002). Als Differentialdiagnosen zum Glioblastom kommen in der Bildgebung Metastasen, Abszesse, andere hirneigene Tumore und zystische Prozesse anderer Ätiologie in Betracht.

1.4 Therapiestrategien und Prognose

Initial steht die chirurgische Resektion des Glioms im Vordergrund, sofern diese in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation und der Operabilität des Patienten

möglich ist. Das Ziel der Operation ist es, unter Schonung von funktionellen Hirnbereichen, eine möglichst große Zytoreduktion des Tumors zu erreichen.

Der aktuelle Therapiestandard sieht eine multimodale Therapie aus chirurgischer Resektion, Chemotherapie mit Temozolomid und Radiotherapie vor (Sathornsumetee et al. 2007). Mit der chirurgischen Tumorsektion ist die komplette Tumorentfernung jedoch nicht möglich, da einzelne Gliomzellen bis zu sieben Zentimetern (cm) vom Rand des Ursprungstumors in das gesunde, funktionelle Hirngewebe migrieren. Das Rezidiv geht zumeist innerhalb eines Saumes von 3 cm ab dem Resektionsrand aus (Giese et al. 2001).

Eine möglichst ausgedehnte Resektion des Tumors geht mit einer längeren Prognose, einer Verbesserung der neurologischen Ausfälle und einer höheren Lebensqualität einher (Pichlmeier et al 2009; Stummer et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass sich mittels fluoreszenzgestützter Resektion mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) eine vollständigere chirurgische Resektion ermöglichen ließ. Dieses Ergebnis ging auch mit einem längeren, progressionsfreien Intervall einher (Stummer et al. 2006). Als Maßstab für die Tumorentfernung wurde kontrastmittelanreicherndes Tumormaterial in der MRT-Bildgebung herangezogen. In postoperativen MRT-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass bei fluoreszenzgestützter Resektion mit ALA bei 65 % der Patienten der kontrastmittelaufnehmende Tumor entfernt wurde. Hingegen fanden sich in 36 % der Fälle eine komplette Resektion des kontrastmittelaufnehmenden Gewebes bei den in üblicher Weise chirurgisch Behandelten. In der ALA-Gruppe fanden sich nach sechs Monaten progressionsfreie Intervalle bei 41 % der Patienten und in der Kontrollgruppe bei 21 %.

Die Kombination aus postoperativer Strahlentherapie mit adjuvanter Gabe von Temozolomid ist der alleinigen postoperativen Radiatio überlegen (Soffietti et al. 2007; Stupp et al. 2005). Die Überlebenszeit von Patienten mit der Kombinationstherapie (Radiatio und Chemotherapie) beträgt 14,6 Monate vs. 12,1 Monate bei Monotherapie (Stupp et al. 2005). Bei dem Medikament Temozolomid handelt es sich um ein orales Alkylanz, welches ein günstiges Verhältnis aus Wirksamkeit und Nebenwirkungen besitzt und bei der Therapie

des GBM zum adjuvanten Chemotherapeutikum der ersten Wahl gehört (Stupp et al. 2007; Yung et al. 1999). Nebenwirkungen, die häufig zum Behandlungsabbruch führen, gehören dem hämatologischen Formenkreis an (Combs et al. 2007).

Das Vorliegen einer Hypermethylierung der Promoterregion des Gens für das DNS-Reparatur Enzyms O6-methylguanin-DNS-methyltransferase (MGMT) geht mit einem besseren Ansprechen von Glioblastomen auf Temozolomid einher (Esteller et al. 2000; Hegi et al. 2005; Soffiatti et al. 2007).

Bei der Radiotherapie des GBM kann es zu einer Strahlenresistenzbildung der Tumorzellen kommen. Hierfür werden sogenannte Tumorstammzellen verantwortlich gemacht, welche ein DNA-Reparatursystem aktivieren, durch welches die Fähigkeit der Tumorzelle, DNA-Schäden auszugleichen, gesteigert wird (Bao et al. 2006).

Zur Verbesserung der frustrierenden Prognose erfolgte die Entwicklung neuer Therapieansätze. Hierzu gehört die oben beschriebene 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) gestützte Tumoresektion. Dieser systemisch verabreichte, intraoperative Fluoreszenzmarker ermöglicht eine bessere Entfernung der insbesondere infiltrierenden Tumorrandsaumzellen.

Darüber hinaus gibt es Forschungsansätze, dass aus allogenen Gliomgewebe und seinen tumorassoziierten Antigenen Vakzinen für homologe dendritische Zellen (DC) hergestellt werden (Zhang et al. 2007), oder dass aus reseziertem, autologem, mit Photodynamischer Therapie (PDT) behandeltem Tumorgewebe DC-Vakzinen hergestellt werden, die nach Aufarbeitung subcutan verabreicht werden (Korbelik et al. 2007).

Zusätzlich gehören zum Spektrum der neuen Therapieansätze unter anderem Forschungen an gentherapeutischen Therapien, bei denen beispielsweise bestimmte Retroviren Suizid-Gene mit Hilfe mesenchymaler Stromazellen als Vektor in Gliomzellen einschleusen (Okada 2008; Ozawa 2008). Der limitierende Faktor einer Gentherapie mit "nicht-migrierenden" Vektorzellen ist deren räumlich beschränkte Wirkung im Bereich der Resektionshöhle (Rainov et al. 2006). Hierdurch können sie die infiltrierend wachsenden, bereits von der

Resektionshöhle entfernten Tumorzellen nicht erreichen. Daher sind diese invasiven Gliomzellen der Therapie nicht in ausreichendem Maß zugänglich.

1.5 Die Photodynamische Therapie

Die PDT bedient sich dem Prinzip, dass der photosensibilisierende Hämmetabolit 5-ALA verabreicht wird. Diese Substanz akkumuliert selektiv oder in viel höherem Maße in Tumorzellen als in nicht entarteten Zellen. Durch Lichtenergie mit einer für den Photosensitizer spezifischen Wellenlänge von 635 nm kommt es in Gegenwart von intrazellulärem Sauerstoff zur Aktivierung des Photosensitizers und zur möglichst selektiven Schädigung der Tumorzellen. Physikalisch bedient sich die PDT dem Prinzip, dass die Moleküle des Photosensitizers (hier: Protoporphyrin IX) Photonen absorbieren und zu einem energiereicheren Zustand angeregt werden. Dies bezeichnet man als Singulett-Zustand, welcher auf Sauerstoffmoleküle übertragen wird. Der Singulett-Sauerstoff führt zur Oxidation von Zellbestandteilen. Über diesen Mechanismus werden Nekrose und Apoptose der Tumorzellen induziert. Darüber hinaus kommt es durch die 5-ALA basierte PDT zu einer Suppression von Wachstumsfaktoren und zur Aktivierung proapoptotischer Proteasen (Karmakar et al. 2007).

Unmittelbar nach der PDT lässt sich ein Anschwellen der mit PDT behandelten Zellen und eine Schädigung der Zellmembran verzeichnen (Zelenkov et al. 2006). Die genauen zellulären Vorgänge der PDT sind zur Zeit noch nicht ausreichend untersucht.

1.6 Fragestellung

Im Rahmen eines einmaligen Heilversuches (Stummer, 2007) wurde bei einer 31-jährigen Patientin mit bereits rezidiviertem, frontotemporalen Glioblastom eine stereotaktische interstitielle Phototherapie mit 5-ALA durchgeführt. Es kam

zur vollständigen Regression des Tumors. 56 Monate nach dieser Therapie lebte die Patientin weiterhin ohne Rezidiv in gutem Allgemeinzustand.

Dieser atypische Verlauf warf wichtige Fragen auf, da die Phototherapie nur lokal wirken kann. Die Eindringtiefe des verwendeten Laserlichts (635 nm) beträgt nur wenige Millimeter (Messmann et al. 1997; Beck et al. 2007), so dass eine therapeutische Wirkung auf zu erwartende, über Zentimeter infiltrierende Zellen praktisch unmöglich ist. Möglicherweise existieren zu diesem direkten zytotoxischen, antitumorösen Effekt auch Veränderungen der Zellmotilität oder der Immunlage. Auch wäre eine immunstimulierende Wirkung der PDT denkbar.

Um der Frage nachzugehen, ob immunologische Mechanismen oder Veränderungen der Zellmotilität den oben beschriebenen Beobachtungen zugrunde liegen, wurde folgender Versuchsaufbau etabliert: Mit in-vitro produzierten Mikrotumoren (Tumorsphäroiden) sollte mit der Kombination aus ALA- und Bestrahlungsdosis die letale Dosis 50 (LD-50) ermittelt werden, d.h., 50 % der Zellen innerhalb des Tumorsphäroids liegen in avitalem Zustand vor. Anhand der PDT-behandelten Sphäroide sollte das Migrationsverhalten der Tumorzellen, analog zu in-vivo infiltrierenden Zellen, im Vergleich zu unbehandelten Tumorsphäroiden untersucht werden. Darüber hinaus sollten Konfrontationsassays Hinweise erbringen, ob und in welchem Maße Glioblastomzellen durch die PDT-Behandlung einen immunologisch attraktiven Reiz zur Antigenaufnahme durch dendritische Zellen darstellen. Abschließend sollte betrachtet werden, in wie weit die aktuelle Datenlage zur PDT und den immunologischen und migrationshemmenden Effekten aus nicht-neurochirurgischen Fachgebieten auf die PDT des Glioblastoma multiforme übertragbar ist.

1.7 Das Sphäroidmodell

Zur Untersuchung dieser Frage wurden für unsere Experimente Tumorsphäroide aus den Glioblastomzelllinien U373 und A172 hergestellt. Im Gegensatz zu einer Monolayer-Zellkultur stellt ein Tumorsphäroid eine dreidimensionale Struktur dar. Bei diesen in-vitro erzeugten Gebilden handelt es sich um sphärisch wachsende Zellbündel, die einem Tumormodell entsprechen. Diese dreidimensionalen in-vitro-Zellkulturen besitzen in experimentellen Anwendungen gegenüber Monolayerkulturen zahlreiche Vorteile, da sie histomorphologisch und funktionell einem in-vivo-Mikrotumor entsprechen. Es existieren entsprechende Arbeiten über Zell-Zell-Interaktionen, Tumormetabolismen und Konzentrationsgradienten innerhalb des Sphäroids (Kunz-Schughart et al. 2004). Untersuchungen über die Tumorzellinvasion existieren seit 1957 (Moscona et al. 1957). Im Vergleich zu Monolayerkulturen besitzen Tumorsphäroide gegenüber soliden in-vivo-Tumoren einen ähnlichen histologischen Aufbau und ausgeprägte interzelluläre Kontakte. Sie können in ihren Zentren spontane Nekroseherde bilden (Bell et al. 2001; Nirmala et al. 2001). Darüber hinaus ähnelt der Proliferationsgradient innerhalb eines Tumorsphäroids dem eines nicht zystischen in-vivo-Tumors. Es existiert ein Diffusionsgradient, bei dem das Angebot von Sauerstoff und Nährstoffen zum Sphäroidzentrum hin abnimmt und die Konzentration von Kohlendioxid zunimmt.

Im Vergleich zu Monolayerkulturen produzieren Tumorsphäroide eine ähnliche Extrazellulärmatrix wie in-vivo-Tumore (Nedermann et al. 1984) und zeigen eine signifikant höhere Bildung von tumorspezifischen Antigenen und Wachstumsfaktoren als Monolayerkulturen (Mueller-Klieser et al. 1987). Durch die Gesamtheit der oben beschriebenen Eigenschaften eignet sich dieses Tumormodell insbesondere gut für die von uns durchgeführten Migrationsversuche und Konfrontationskulturen.

1.8 Dendritische Zellen

Für die Konfrontationsexperimente, die Hinweise darauf liefern sollten, ob und in wie weit sich durch PDT-Behandlung die Antigenität von Glioblastomsphäroiden steigern lässt, wurden dendritische Zellen (DC) genutzt. DC sind die Initiatorzellen in der afferenten Phase der zellulären antitumorösen Antwort. Sie sind in der Lage aufgrund von aktivierenden Signalen durch die Blut-Hirn-Schranke transendothelial zu migrieren und dort Antigene aufzunehmen (Zozulya et al. 2009). Es existieren bereits Forschungsansätze, in denen aus allogenen Gliomgewebe und seinen tumorassoziierten Antigenen Vakzinen für homologe dendritische Zellen (DC) hergestellt werden (Zhang et al. 2007), oder in denen aus reseziertem, autologen, mit PDT behandelten Tumorgewebe DC-Vakzinen hergestellt werden, die nach Aufarbeitung subcutan verabreicht werden (Korbelik et al. 2007).

Unreife DC tragen wenig MHC-II Moleküle auf ihrer Oberfläche (Sallusto et al. 1994). Über Danger-Signals, wozu Ischämie, Infektionen (Winzler et al. 1997; Feldman et al. 1994), thermische Schädigung und Zytokine wie IL-1, GM-CSF und TNF-alpha (Koide et al., 1987; Kolenik et al., 1990; Josien et al., 1999) gehören, kommt es zur Aktivierung der DC und konsekutiv zu einer Zunahme der Fähigkeit, Antigene aufzunehmen und zu präsentieren. Die DC migrieren aus dem peripheren Gewebe über die Lymphbahnen in die regionären und lokalen Lymphknoten. Dort gelangen sie entweder in die T-Zell-Region oder die B-Zell-Follikel der Lymphknoten und stimulieren dort B- und T-Lymphozyten durch Zytokine (Adema et al., 1997). Die Ausreifung der DC induziert die Expression von Chemokinrezeptoren und Zytokinen und eine Immunantwort (Bancereau J. et al. 2000).

2 Methoden

Die Experimente zur LD-50-Dosisfindung, die Migrationsassays, sowie die gesamte Herstellung der Tumorsphäroide, wurden im neurochirurgischen Forschungslabor der Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Konfrontationsassays und die Kultivierung der dendritischen Zellen fanden in Kooperation mit dem Institut für Zelltherapeutika und Transplantationsmedizin (ITZ) der Universität Düsseldorf statt.

2.1 Kultivieren der Zellen in Monolayer-Zellkultur

Die für die Zellkultur nötigen Reagenzien wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die humanen A172- und U373-Gliomzelllinien, wurden uns mit freundlicher Genehmigung von Herrn PD Dr. R. Sorg aus dem Institut für Transplantationsmedizin und Zelltherapeutika (ITZ) der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Diese wurden als Monolayer in T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Als Medium wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 10 % hitzeinaktiviertem, fetalen Kälberserum (FCS), 1 % Natrium Pyruvat und 1 % Penicillin / Streptomycin verwendet. Die Kultivierung fand im Inkubator bei 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C statt. Täglich wurde das Wachstum der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Bei einer Konfluenz von ca. 75 % wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Air Flow Sterilbank passagiert.

Hierzu wurden die Zellen mit 3 ml 0,05 %iger Trypsin- / EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Lösung bei 37 °C und 5 % CO₂ vom Zellkulturflaschenboden getrennt. Nach dem Ablösen der Zellen wurden 7 ml DMEM (mit 10 % FCS, 1 % Natrium-Pyruvat und 1 % Penicillin / Streptomycin) zu den Zellen, die in 3 ml Trypsin gelöst waren, hinzugegeben und die Zellen resuspendiert. Von den entstandenen 10 ml Zellsuspension wurden je nach

gewünschter Zellkonzentration unterschiedliche Mengen in eine neue T75-Zellkulturflasche pipettiert. In die Kulturflaschen wurden noch 20 ml farbloses DMEM (mit 10 % FCS, 1 % Penicillin / Streptomycin und 1 % Natrium-Pyruvat) gegeben. Überschüssige Zellen wurden verworfen und zum Einfrieren oder zum Anlegen von Sphäroiden verwendet. Das Kultivieren der verdünnten Zellsuspension fand im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ über fünf Tage statt. Bereits nach einem Tag zeigte sich eine Adhärenz der Einzelzellen am Flaschenboden und die Bildung eines zweidimensionalen „Monolayer-Zellrasens“. Alle drei Tage fand ein Wechsel des Zellkulturmediums statt. Hierzu wurde das alte, in der Flasche befindliche Medium abgesaugt und 20 ml frisches DMEM (mit 10 % FCS, 1 % Penicillin / Streptomycin und 1 % Natrium-Pyruvat) wieder hinzugegeben. Während der Versuche war es erforderlich, die Zellen beider Zelllinien bei –80 °C einzufrieren und wieder aufzutauen.

2.2 Einfrieren und Lagerung

DMEM wurde auf 4 °C in einem 15 ml Falconröhrchen vorgekühlt. Die beim Trypsinisieren entstandene Zellsuspension wurde in das vorgekühlte DMEM überführt und anschließend bei 1500 Umdrehungen pro Minute (U/min) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet am Röhrchenboden mit 4,5 ml Einfriermedium, bestehend aus 50 % DMEM, 40 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), resuspendiert. Anschließend folgte die Verteilung der entstandenen Zellsuspension auf 1 ml fassende Kryoröhrchen. Diese wurden bei –80 °C eingefroren und nach einer Woche in flüssigen Stickstoff überführt. In diesem Zustand waren die Zellen praktisch ohne Zeitbeschränkung lagerbar.

2.3 Auftauen von Zellen

Für das Auftauen von Zellen wurden 7 ml vorgekühltes DMEM in ein 15 ml Falconröhrchen vorpipettiert. Im Anschluss daran folgte das Auftauen der im flüssigen Stickstoff gelagerten Kryoröhrchen bei 37 °C im Wasserbad bis nahezu kein Eis mehr im Röhrchen sichtbar war. Der Inhalt wurde in das DMEM enthaltende Kryoröhrchen pipettiert und bei 1500 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 5 ml 37 °C warmem DMEM resuspendiert und in eine 15 ml DMEM (mit 10 % FCS, 1 % Penicillin / Streptomycin und 1 % Natrium-Pyruvat) enthaltende T75-Zellkulturflasche gegeben. Es folgte die weitere Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.4 Beschichtung der Arbeitsmaterialien (Zellkulturflaschen, Petrischalen und 96-Well-Mikrotiterplatten) mit Noble-Agar

Zur Herstellung der Tumorzellsphäroide aus einer Monolayer Zellkultur war es erforderlich, den Boden der T75-Zellkulturflaschen mit Agar zu beschichten um eine Adhärenz der zu kultivierenden Zellen zu verhindern. Folglich bildeten die Zellen untereinander Zell-Zellkontakte aus und führten so zum Wachstum eines dreidimensionalen Gebildes, dem Tumorsphäroid. Zur Herstellung des Agars wurde Noble-Agar der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Hierzu wurde ein Gramm dieser Substanz mit 20 ml Li-Chrosolv Wasser für Chromatographie zusammengegeben. Beide Substanzen wurden in einem Mikrowellenofen viermal bei 400 Watt (W) aufgekocht. Dieses Gemisch wurde mit 80 ml auf 60 °C vorgeheiztem DMEM (darin enthalten sind 10 % FCS, 1 % Natrium-Pyruvat und 1 % Penicillin / Streptomycin) gemischt. Zur Verarbeitung des Agars wurde dieser in einer 400 ml Glasflasche in einem Wasserbad bei 60-80 °C warmgehalten. In die T75-Flaschen wurden jeweils 8-10 ml des flüssigen Agars pipettiert. Dieser verfestigt sich binnen 30 min auf dem Flaschenboden durch Abkühlung. Für die weitere Behandlung der Tumorsphäroide war es ebenfalls

bedeutsam eine Umgebung zu schaffen, die den Sphäroiden wenig Möglichkeiten zur Adhärenzbildung bot. Daher wurden auch die Petrischalen, in denen später die Sphäroide mit ALA inkubiert wurden, und die 96-Well-Mikrotiterplatten, in denen die Bestrahlungen mit dem Laser stattfand, mit Agar beschichtet. Hierzu wählte man eine Menge von 4-5 ml Agar für die Petrischalen und 100 µl Agar pro Well für die Mikrotiterplatten.

2.5 Herstellung der Tumorsphäroide

In T75-Zellkulturflaschen wurden Monolayer-Zellkulturen bis zu einer Dichte von 75 % kultiviert. Diese Zellen wurden mit 3 ml 0,05 %iger Trypsin / EDTA-Lösung trypsinisiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Zellkulturflaschenboden wurden die Zellen mit 7 ml DMEM (mit 10 % FCS, 1 % Natrium-Pyruvat und 1 % Penicillin / Streptomycin) resuspendiert. Von den entstandenen 10 ml Zellsuspension wurden 6 ml in eine mit Agar beschichtete T75-Flasche pipettiert. Hinzu wurden noch 20 ml farbloses DMEM (mit 10 % FCS, 1 % Penicillin / Streptomycin und 1 % Natrium-Pyruvat) gegeben. Die beschichtete Zellkulturflasche mit der Zellsuspension wurde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ über fünf Tage inkubiert. Über diesen Zeitraum bilden sich Tumorsphäroide mit einer Größe von 100 bis 150 µm. Von den sich in der Flasche befindlichen 26 ml Medium mit Tumorsphäroiden wurden 10 ml Medium mit den darin enthaltenen Sphäroiden abpipettiert und 10 ml frisches DMEM (mit 10 % FCS, 1 % Penicillin / Streptomycin und 1 % Natrium-Pyruvat) wieder hinzugegeben. So erreichte man ein Ausdünnen der hohen Sphäroidanzahl in dem Kulturmedium und eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen. Hierauf folgte eine weitere Inkubation für fünf Tage, bis die Tumorsphäroide einen Durchmesser von 250 bis 300 µm erreicht hatten.

2.6 Ansetzen der ALA-Verdünnung

In 10 ml Wasser für Injektionszwecke wurden 5 g kristallines ALA gelöst. Aus diesen 10 ml wurden bei einer später gewünschten ALA-Konzentration von 12,5 µg/ml eine Menge von 25 µl entnommen (bei gewünschten 15 µg/ml sind es 30 µl) und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Dieses wurde mit DMEM (ohne FCS, ohne Penicillin / Streptomycin und ohne Natrium-Pyruvat) auf 50 ml aufgefüllt. Da hier eine zweifache Konzentration vorlag, wurden bei der späteren Inkubation jeweils gleiche Mengen der Sphäroide enthaltenden Suspension und der ALA-Verdünnung zusammengegeben.

2.7 Durchführung der ALA-Inkubation und der Verteilung auf die 96-Well-Mikrotiterplatten

Die 96-W-Platten für den im weiteren Verlauf beschriebenen WST-1-Test wurden aufgrund der photometrischen Auswertung mit farblosem DMEM ohne weitere Zusätze gefüllt (100 µl/Well). Die Randbefüllung betrug 100 µl PBS in jedem Well. Da eine Kultivierung von Tumorsphäroiden in nicht FCS-haltigem DMEM nicht gelang, wurden die Sphäroide bis zu einem Durchmesser von 250 µm in beschichteten T75-Flaschen mit FCS-haltigem DMEM kultiviert. Die Tumorsphäroide wurden erst unmittelbar vor den Experimenten aus den T75-Flaschen in die ALA-Inkubation bzw. ohne Inkubation in die 96-W-Mikrotiterplatten überführt. Direkt vor Versuchsbeginn wurden 8 ml Sphäroidsuspension einer T75-Flasche in eine mit Agar beschichtete Petrischale pipettiert. Zu diesen 8 ml wurden 8 ml der zweifach konzentrierten ALA-Verdünnung gegeben. Aus einer T75-Zellkulturflasche wurden weiterhin 8 ml Sphäroidsuspension in eine weitere mit Agar beschichtete Petrischale pipettiert. In diese Petrischale wurden weiterhin 8 ml DMEM ohne FCS, Penicillin / Streptomycin und Natrium-Pyruvat gegeben. Beide Petrischalen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für vier Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden aus beiden Petrischalen die Sphäroide entnommen und auf die Wells

der 96-W-Platte überführt. Dies geschah unter mikroskopischer Sicht mit einer 0,5-10 µl Pipette. Die Mikrotiterplatte wurde während des Arbeitens vor Lichtexposition durch eine Abdeckung geschützt.

2.8 Der WST-1-Assay

Das WST-1 Reagenz ist ein Test zur farbspektrometrischen/ photometrischen Bestimmung der Zellvitalität. Der Test wurde entwickelt für die in-vitro-Untersuchung der Wirkung von Wachstumsfaktoren, mitogenen Zytokinen und zytotoxischen Agentien in der Zellkultur.

Das zartrote WST-1 (4-{3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio}-1,3-benzene disulfonat) wird durch zelluläre Enzyme lebender Zellen in das dunkelrote Formazan umgewandelt. An dieser Reaktion auf zellulärer Ebene ist das mitochondriale succinyl-tetrazolium-reductase-System beteiligt. Der Anstieg der Konzentration des Formazans korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver, das heißt lebendiger (und nicht abgestorbener) Zellen in der Kultur.

2.9 Durchführung des WST-1-Assays

Für die Durchführung des WST-1 Tests wurde eine 96 W-Mikrotiterplatte in gleicher Weise befüllt, wie oben unter 2.7 beschrieben. Jedem Well der Standard- und jedem Well der Vierfachansätze wurden jeweils drei unbehandelte Sphäroide im Durchmesser von 250 bis 300 µm zugeteilt. Anschließend wurden 10 µl des WST-1 Reagenz in jedes Well pipettiert und im Thermomixer für 20 Sekunden bei 450 U/min durchmischt. Das Ablesen im Biorad-Reader erfolgte nach zwei, vier, acht und 16 Stunden. Vor den jeweiligen Ablesevorgängen war ein Durchmischen der Wells ebenfalls obligat (bei 450 U/min. für ca. 20 Sekunden). Der Reader benutzte zum Ablesen eine Wellenlänge von 415 nm und als Referenzwellenlänge 655 nm.

2.10 Schema für die Durchführung des Zellproliferationstests WST-1 mit U373 Tumorsphäroiden zur LD-50 Dosisfindung

Als Voraussetzung für die im weiteren Verlauf durchgeführten Migrationsexperimente und Konfrontationsassays wurde für die angewandte photodynamische Therapie (PDT) die Kombinationsdosis aus ALA und Lichtenergie ermittelt, bei der 50 % der Zellen keine Vitalität mehr zeigten (sogenannte letale Dosis 50= LD-50 Dosis).

Für die Bereitstellung der Lichtenergie wurde das Lasermodell Ceralas / PDT / 635 nm / 3 W der Firma biolitec® verwendet. Der Laser gibt Licht mit einer Wellenlänge von 635 nm ab. Als Bestrahlungsdauer wurde eine Zeit von 625 Sekunden bei 1 W Energieleistung gewählt. Die Entfernung zwischen Lichtquelle und den in den Wells befindlichen Tumorsphäroiden betrug konstant 9,3 cm. Unter diesen Bedingungen wurde eine Energieleistung von 40 mW/cm² abgegeben, welche 25 J/s entspricht. Zwecks Standardisierung wurde eine Bestrahlungsvorrichtung (Abb. 1) genutzt, die bereits für vorhergehende PDT-Experimente an Monolayer-Zellkulturen in unserem Forschungslabor in Zusammenarbeit mit der Firma Welabo entwickelt wurde. Diese Apparatur ermöglichte eine Fixierung der Mikrotiterplatten in einer zum Lichtleiter horizontal verschiebbaren Klemmvorrichtung. Die Verschieblichkeit ermöglicht ein Umschalten zwischen den einzelnen zu bestrahlenden Vierergruppen. Die Bestrahlungsvorrichtung erlaubte eine simultane Bestrahlung von vier Wells einer 96-W-Mikrotiterplatte.

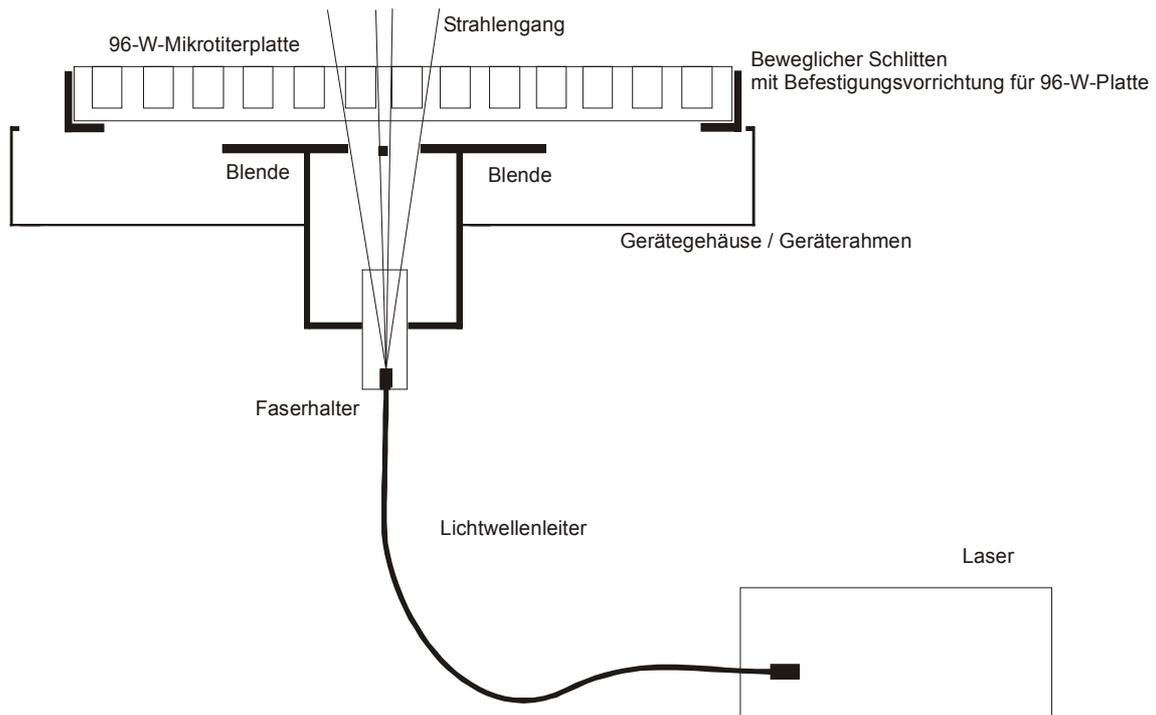


Abb. 1) Bestrahlungsvorrichtung: Diese Apparatur ermöglicht eine Fixierung der Mikrotiterplatten in einer zum Lichtleiter horizontal verschiebbaren Klemmvorrichtung

Die Tumorsphäroide wurden bis zu einem Durchmesser von 250 bis 300 μm in den T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Direkt vor Versuchsbeginn wurden 8 ml des Kulturmediums, welches die Tumorsphäroide als Suspension enthielt, aus der T75-Zellkulturflasche in eine mit Agar beschichtete Petrischale pipettiert. Zu diesen 8 ml wurden 8 ml der zweifach konzentrierten ALA-Verdünnung gegeben. Aus der T75-Zellkulturflasche wurden weiterhin 8 ml Sphäroidsuspension in eine weitere, mit Agar beschichtete Petrischale pipettiert. In diese Petrischale wurden 8 ml DMEM ohne FCS, Penicillin / Streptomycin und Sodium-Pyruvat gegeben. Beide Petrischalen wurden bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 für vier Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden aus beiden Petrischalen die Sphäroide entnommen und auf die 96-W-Platten verteilt. Als Zellproliferations- bzw. Vitalitätsassay wurde der WST-1-Test verwendet. In diesem Versuchsaufbau wurden pro Well drei Sphäroide gewählt. Nach dem Befüllen der 96-Well-Platte erfolgte die Bestrahlung. Im direkten Anschluss wurde die 96-Well-Platte im CO_2 -Inkubator eine Stunde bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden 10 μl des WST-1 Reagenz in jedes Well pipettiert und im

Thermomixer für 20 Sekunden bei 450 U/min durchmischt. Das Ablesen im Biorad-Reader erfolgte jeweils nach vier Stunden und nach 16 Stunden. Vor den jeweiligen Ablesevorgängen ist ein Durchmischen der Wells ebenfalls obligat (bei 450 U/min. für ca. 20 Sekunden). Der Reader benutzte zum Ablesen eine Wellenlänge von 415 nm und als Referenzwellenlänge 655 nm.

Zur Untersuchung der alleinigen Bestrahlung ohne ALA-Inkubation bei jeweils 1 W wurden für jede Bestrahlungszeit zwei Vierfachansätze mit jeweils drei Sphäroiden pro Well verwendet (insgesamt jeweils 24 Sphäroide pro Bestrahlungsdauer). Diese Anzahl wurde für beide Zelllinien verwendet.

Beim Betrachten des Einflusses der alleinigen ALA-Inkubation ohne Bestrahlung wurden in jeder ALA-Konzentration sechs Vierfachansätze mit jeweils 12 Sphäroiden durchgeführt (insgesamt 72 Sphäroide pro ALA-Konzentration). Auch hier galt die Anzahl für jede der beiden verwendeten Zelllinien.

Bei den Behandlungsgruppen (ALA und Bestrahlung) wurden für jede ALA-Konzentration sechs Vierfachansätze durchgeführt, entsprechend jeweils 72 Sphäroide pro Zelllinie und ALA-Konzentration. Bei den U373-Sphäroiden wurden davon abweichend 14 Vierfachansätze bei den ALA-Konzentrationen von 0 µg/ml (168 Sphäroide) und 19 Vierfachansätze (228 Sphäroide) bei 12,5 µg/ml durchgeführt.

2.11 Migrationsversuch mit den Zelllinien U373 und A172

Monolayer-Zellkulturen der beiden Zelllinien U373 und A172 wurden separat trypsinisiert und getrennt auf die mit Agar beschichteten T75-Zellkulturflaschen gegeben. Die Zellen wurden in den T75-Zellkulturflaschen für eine Woche kultiviert, bis sich Sphäroide mit einem Durchmesser von 250 µm bildeten. Am Tag der Versuchsdurchführung wurden die Tumorsphäroide mit ALA inkubiert. Hierfür wurden die Konzentrationen 12,5 µg/ml ALA für die Zelllinie U373 und 15 µg/ml ALA für die Zelllinie A172 gewählt. Hierzu wurde folgende Vorgehensweise genutzt: Aus den Zellkulturflaschen wurden 10 ml des die

Sphäroide enthaltenden Mediums entnommen und auf die mit Agar beschichteten Petrischalen pipettiert. Zu diesen 10 ml wurden nun 10 ml der entsprechenden ALA-Verdünnung in zweifacher Konzentration pipettiert. Diese Mischung wurde für vier Stunden im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Sphäroidsuspensionen, ohne ALA-Inkubation (Kontrollgruppen), wurden ebenfalls in eine Petrischale überführt. Anschließend wurden die Sphäroide aus den Petrischalen auf die unbeschichteten 96-Wellplatten verteilt. Die Platten enthielten für den Versuch in den am Rand befindlichen Wells 200 µl Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) und in den für die Tumorsphäroiden bestimmten Wells 150 µl DMEM ohne weitere Zusätze. Folgende Behandlungen bzw. Kontrollgruppen wurden ausgesucht:

- Tumorsphäroide ohne ALA, ohne anschließende Bestrahlung
- Tumorsphäroide ohne ALA, mit anschließender Bestrahlung
- Tumorsphäroide mit ALA, mit anschließender Bestrahlung
- Tumorsphäroide mit ALA, ohne anschließende Bestrahlung

Bei dieser Aufteilung wurde jeweils ein Tumorsphäroid mit einem Durchmesser von 250 µm in je ein Well gegeben. Die oben genannten Gruppen wurden für jede Zelllinie separat gebildet. Die Bestrahlung erfolgte für 625 Sekunden bei 1 W und einer Wellenlänge von 635 nm. Nach dem Bestrahlungsvorgang wurden in die tumorsphäroidtragenden Wells je 50 µl DMEM (mit 10 % FCS, 1 % Natrium-Pyruvat und 1 % Penicillin / Streptomycin) hinzugefügt, da die Sphäroide ab diesem Zeitpunkt für fünf Tage kultiviert wurden und FCS für das Wachstum und Überleben der Zellen essentiell ist.

Vor der Bestrahlung wurden die Tumore durch das Mikroskop bei hundertfacher Vergrößerung mit einer 2,2 Megapixel Digitalkamera durch das Messokular fotografiert. Es erfolgte die Bestimmung der Durchmesser der Sphäroide unmittelbar vor und nach der Bestrahlung durch das Messokular. Ab dem Zeitpunkt der Bestrahlung wurden über einen Zeitraum von fünf und 14 Tagen die Durchmesser der Sphäroide bzw. die Migrationsradien der migrierenden Tumorzellen gemessen.

Bei den einzelnen Behandlungsgruppen wurden für jede Zelllinie jeweils acht Sphäroide über 14 Tage beobachtet.

Es wurden Vitalitätskontrollen der einzelnen Behandlungsgruppen mit dem WST-1-Test durchgeführt. Hierfür wurden nach dem ersten und vierten Tag bei jeder Zelllinie für jeden Behandlungsmodus je drei Vierfachansätze mit je 12 Sphäroiden mit dem WST-1-Test ausgewertet (jeweils 36 Sphäroide pro Zelllinie und Behandlungsgruppe).

Darüber hinaus wurden nach dem ersten und 14. Tag bei beiden Zelllinien für jeden Behandlungsmodus je drei Vierfachansätze mit je 12 Sphäroiden mit dem WST-1-Test ausgewertet (jeweils 36 Sphäroide pro Zelllinie und Behandlungsgruppe). Die Vitalitätskontrolle sollte sicherstellen, dass eine eventuell gezeigte Migrationshemmung nicht hauptsächlich auf einen Zelluntergang während des Beobachtungszeitraums zurückzuführen war.

2.12 Konfrontationsassay mit U373 Sphäroiden und Einzelzellen mit dendritischen Zellen

Im folgenden Text beschriebenen Konfrontationsassay wurde die PDT-induzierte Interaktion von Glioblastomzellen mit dendritischen Zellen (DC) untersucht. Hierfür wurden Tumorsphäroide und Einzelzellsuspensionen aus Glioblastomzellen der Zelllinie U373 verwendet. Es wurden für die Tumorsphäroide und Einzelzellen analoge Gruppen zu dem vorausgegangenen Versuch gebildet.

Nach der entsprechenden Behandlung wurden die Sphäroide bzw. Einzelzellen mit CFDA-SE (grüne Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 488 nm) gefärbt und mit dendritischen Zellen konfrontiert. Nach einer Zeit von 19 Stunden wurden die DC mit dem Farbstoff HLA-DR-Pe (HLA = Humanes Leukozytenantigen; Pe = Phycoerythrin) gegengefärbt (rote Fluoreszenz bei 564-602 nm). In diesem Zeitraum kam es zur Interaktion der DC mit dem Tumormaterial. Im Anschluss an die HLA-DR-Pe-Färbung fand eine durchflusszytometrische Auswertung im FACS-Analysator (FACS=

fluorescence activated cell sorting) statt. Durch die unterschiedlichen Fluoreszenzen konnte nun quantifiziert werden, wieviel Tumorzellmaterial der unterschiedlich behandelten Tumorsphäroide (grüne Fluoreszenz) in die rot fluoreszierenden DC aufgenommen wurde.

Es sollte untersucht werden, ob durch die 5-ALA-basierte PDT eine effektive Stimulation der Aufnahme von Tumorzellmaterial induziert werden konnte. Der genaue Versuchsaufbau stellte sich wie folgt dar:

Aus der leukozytenreichen Fraktion eines antikoagulierten Vollbluts (Buffy Coat) wurden mittels des Ficolldichtegradienten mononukleäre Zellen (MNC) isoliert. Diese Zellen wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. Sorg aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Aufgrund der Eigenschaft, dass Monocyten auf ihrer Oberfläche das CD14-Antigen tragen, wurden anhand des Protokolls von Sorg et al. (2003) immunmagnetisch CD14+ Monozyten angereichert und isoliert. Die angereicherten Monocyten wurden nach einem Waschschrift direkt in die jeweiligen Versuche eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Sechs Tage vor Konfrontation von dendritischen Zellen und Tumorsphäroiden (am Tag sieben), wurden die Monozyten aus der -80 °C Lagerung aufgetaut. Anschließend wurde die entstandene Zellsuspension auf eine Zellzahl von 10^6 Zellen eingestellt. Diese Zellsuspension wurde auf eine 24-Well-Mikrotiterplatte verteilt, wobei 2 ml in jedes Well gegeben wurden. Hierzu werden 1000 Units/ml (U/ml) GM-CSF und Interleukin-4 (IL-4) gegeben. Das GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) wirkt stimulierend auf die Differenzierung der Monozyten zu dendritischen Zellen. Das IL-4 führt zu einer Herunterregulierung der CD-14-Rezeptoren der Monozyten. Nach zwei und fünf Tagen fand je ein Mediumwechsel statt. Hierzu wurden aus jedem Well 1 ml des Zellkulturmediums abgezogen und 1 ml frisches Medium mit 2000 U/ml GM-CSF und 2000 U/ml IL4 pro Well hinzugefügt. Für diesen Versuchsaufbau wurde als Kulturmedium ebenfalls DMEM (ohne FCS, Penicillin / Streptomycin und Natrium-Pyruvat) verwendet. Am Tag sieben fand die Konfrontation der

Tumorsphäroide bzw. der Einzelzellsuspension der Zelllinie U373 mit den DC statt.

Die PDT-behandelten Tumorzellen (LD-50) und die Zellen der Kontrollgruppen wurden vor der Konfrontation mit dem Farbstoff CFDA-SE (Carboxyfluoreszindiazetat-succimidylester) gefärbt. Dieser gelangt in das Zellinnere und wird durch zelleigene Enzyme in den bei Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm sichtbaren Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxyfluorescein-Succimidyl Ester) gespalten.

Für den Färbevorgang wurden die Sphäroide und Einzelzellen je nach Behandlungsgruppe in ein entsprechendes mit PBS gefülltes 15 ml Falconröhrchen pipettiert. Diese wurden für 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend mit CFDA-SE (Carboxyfluoreszindiazetat-succimidylester) in einer Konzentration von 0,5 µM gefärbt. Hierauf folgte eine weitere 15-minütige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Zellen wurden auf den Grund des Falconröhrchens zentrifugiert (3 min bei 1000 U/min) und das überstehende PBS abgesaugt. Es folgte ein Waschvorgang mit 2 ml PBS und erneuter Zentrifugation und anschließendem Absaugen des PBS. Anschließend wurden in jedes Well 1 ml Medium (CellGro) gefüllt. Die darauf folgende Inkubation (37 °C; 5 % CO₂) bewirkte, dass nicht gebundener Farbstoff aus den Zellen herausdiffundieren konnte. Im Anschluss hieran fand ein weiterer wie oben beschriebener Waschvorgang statt, bei dem die Falconröhrchen ebenfalls wieder mit 1 ml CellGro aufgefüllt wurden. Die Tumorsphäroide wurden entsprechend der einzelnen Gruppen auf die 96-Well-Mikrotiterplatte verteilt, wobei zehn Sphäroide im jeweiligen Durchmesser von 250-300 µm pro Well verwendet wurden.

Zur Herstellung der Einzelzellsuspension wurden die Zellen der Zelllinie U373 auf T75-Zellkulturflaschen bis zu einer Dichte von ca. 75 % kultiviert. Am Tag des Experimentes wurde das Kulturmedium abgesaugt und der zurückbleibende Zellrasen mit PBS gespült. Anschließend wurde in die Zellkulturflaschen, die später die mit ALA inkubierten Zellen lieferten, 15 ml der ALA-Verdünnung (12,5 µg ALA/ml) pipettiert. In die Zellkulturflaschen, die nicht mit ALA in Kontakt kamen, wurde lediglich DMEM ohne weitere Zusätze

gegeben. Die Flaschen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für vier Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Monolayer mit 3 ml Trypsin in eine Zellsuspension umgewandelt. Die aus den jeweils mit ALA inkubierten Zellen und den nicht mit ALA inkubierten Zellen entstandenen Zellsuspensionen aus jeweils fünf Zellkulturflaschen wurden durch Zentrifugieren (2500 U/min für fünf min) konzentriert und auf eine Konzentration auf 10⁶ Zellen pro 100 µl eingestellt. Diese wurden auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte ausgebracht, indem 100 µl der entsprechenden Zellsuspension (ALA / kein ALA) in Vierergruppen auf die Mikrotiterplatte verteilt wurden. Im Anschluss daran erfolgte die Bestrahlung (625 s bei 1 W und einer Wellenlänge von 635 nm). Die entsprechend behandelten Sphäroide und Einzelzellsuspensionen (+ALA / +PDT; -ALA / +PDT; +ALA / -Bestrahlung; -ALA / -Bestrahlung) wurden aus den 15 ml Falconröhrchen auf die 24-Well-Platte zu den DC überführt. Nach einer ca. 19-stündigen Inkubation über Nacht wurden alle Wells separat geerntet und mit HLA-DR-Pe gegengefärbt. Hierfür wurden 5 µl des Farbstoffs auf 100 µl Zellsuspension (DC mit den enthaltenden Sphäroiden) verwendet. Im folgenden 15-minütigen Waschvorgang wurde der überschüssige Farbstoff beseitigt. Die monoklonalen Antikörper gegen HLA-DR waren Pe konjugiert, die hierdurch eine rote Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 546-602 nm erzielten. HLA-DR befindet sich als Oberflächenantigen auf den Monocyten, jedoch nicht auf den Gliomzellen. Hierdurch ließen sich die Zellen bei der FACS-Analyse und mikroskopisch voneinander unterscheiden. Eine Negativkontrollgruppe wurde gebildet, bei der ausschließlich DC (ohne Sphäroide) mit IgG1 Pe und HLA-DR-Pe gefärbt wurden. Hier kamen ebenfalls je 5 µl des Farbstoffs auf 100 µl Zellsuspension. Auch hier folgte nach 15 Minuten ein Waschvorgang mit PBS. Jede untersuchte Gruppe (+ALA / +PDT; -ALA / +PDT; +ALA / -Bestrahlung; -ALA / -Bestrahlung) wurde aus je zehn Sphäroiden auf 2x10⁶ DC gebildet. Bei der Einzelzellsuspension der U373 Zellen waren es 2x10⁶ Glioblastomzellen auf 2x10⁶ DC. Die Versuchszahl bei Sphäroiden und bei den Einzelzellsuspensionen betrug n = 3.

2.13 Statistische Auswertung

Sämtliche statistische Auswertungen von Ergebnissen dieser Arbeit erfolgten mit dem Computerprogramm SPSS. Wir verwendeten das statistische Verfahren der "Analysis of Variance" = Varianzanalyse (ANOVA) um Unterschiede zwischen verschiedenen Behandlungsgruppen herauszufinden. Die ANOVA vergleicht Mittelwerte von drei oder mehr Gruppen bzw. Bedingungen. Die ANOVA wird dann herangezogen, wenn man eine unabhängige Variable in Abhängigkeit von einer abhängigen Variable in drei oder mehr Stufen betrachtet. Mit einer ANOVA gelingt es, die Varianz in den experimentell erhobenen Daten nach systematischer Varianz (Varianz, die aufgrund experimenteller Manipulation entsteht) und unsystematischer Varianz (Varianz, die sich aus interindividuellen Unterschieden und experimentellen Fehlern ergibt) zu trennen. Das Verhältnis zwischen systematischer Varianz und unsystematischer Varianz wird als F-Ratio angegeben. Wenn mehr Varianz durch experimentelle Manipulationen erklärt werden kann als unerklärbar bleibt, ergibt sich ein hoher F-Wert und man kann mit gewisser Wahrscheinlichkeit (mit 95 % Wahrscheinlichkeit bei einem Signifikanzniveau von $p = 0.05$) sagen, dass die gemessenen Unterschiede auf die experimentell variierte, unabhängige Variable zurückzuführen sind. Im Anschluss an den ANOVA-Test, der prüfte, ob signifikante Unterschiede bzw. Abweichungen zwischen den einzelnen Mittelwerten im allgemeinen vorhanden sind, wurde als Post-Hoc-Test die Scheffé-Prozedur durchgeführt. Diese führt gemeinsame paarweise Vergleiche gleichzeitig für alle möglichen paarweisen Kombinationen der Mittelwerte durch. Dieser Test kann nicht nur paarweise Vergleiche durchführen, sondern sämtliche möglichen linearen Kombinationen von Gruppenmittelwerten untersuchen und die Signifikanz der einzelnen Kombinationen bestimmen. Als Signifikanzniveau wurde in der statistischen Auswertung ein Wert von $p < 0,05$ festgelegt. Eine schwache Signifikanz wurde bei $p < 0,1$ angenommen.

Für unsere statistische Auswertung wurde der einfaktorielle ONE-WAY-ANOVA-Test (analysis of variances) verwendet, bei dem es definitionsgemäß nur eine unabhängige Variable (Faktor) mit mehreren Stufen/Gruppen gibt.

Als abhängige Variable (AV) wurde bei den Migrationsassays die Variable ALA-Konzentration verwendet. Die unabhängige Variable (UV) bildete der zu den unterschiedlichen Zeiten ermittelte Migrationsradius. Aus den Mittelwerten der Migrationsradien zu den einzelnen gemessenen Zeitpunkten wurde die Regressionsgerade mit ihrer Steigung nach der Geradengleichung $y = a x + c$ (y =Steigung; c =Achsenabschnitt) errechnet.

Bei der Vitalitätskontrolle in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus nach einem, vier und 14 Tagen wurde ebenfalls der ONE-WAY-ANOVA-Test verwendet.

Die unabhängigen Variablen bildeten die Behandlungsmodi (-ALA / -R; +ALA / -R; -ALA / +R; +ALA / +R) an jeweils Tag eins, Tag vier und Tag 14. Die abhängige Variable bildete die gemessene Zellvitalität. Als Post-Hoc-Test wurde die Scheffée-Prozedur (Mehrfachvergleiche) durchgeführt um genauere Aussagen über die Signifikanz der Unterschiede der einzelnen Gruppen zueinander zu machen.

In der statistischen Auswertung der Konfrontationsassays zwischen DC und U373-Sphäroiden bzw. Tumoreinzellen wurde ebenfalls der ONE-WAY-ANOVA-Test verwendet. Als abhängige Variablen fungierten hier die Behandlungsmodi (-ALA / -R; +ALA / -R; -ALA / +R; +ALA / +R), als unabhängige Variable der Anteil DC, welche grün fluoreszierendes U373-Zellmaterial aufgenommen hatten. Für die Post-Hoc-Mehrfachvergleiche wurde die Scheffée-Prozedur herangezogen um die Signifikanzen einzelner Behandlungsmodi im Vergleich zu bestimmen.

3 Ergebnisse

3.1 Verhalten des WST-1 Tests

Um genauere Aussagen über das Verhalten der Farbreaktion des WST-1 Tests bei der Interaktion mit vitalen Zellen zu machen, wurde die Tumorsphäroid-induzierte Extinktionsänderung des Tests im zeitlichen Verlauf betrachtet. Es wurden vier Vierfachansätze mit drei Tumorsphäroiden (250 µm Durchmesser) pro Well durchgeführt. Die photometrische Auswertung fand nach einer, zwei, vier, acht und 16 Stunden statt. Hierbei zeigte sich, dass die Extinktion ab einer Stunde nach Zugabe des WST-Reagenzes stetig zunahm und nach acht Stunden nahezu konstant bei einem Wert von 0,537 blieb. Nach 16 Stunden blieb der Wert nahezu unverändert. Die Steigung der Geraden im Bereich zwischen dem Zeitpunkt der Zugabe des WST-Reagenzes und acht Stunden ist proportional zur Anzahl vitaler Zellen. Zusätzlich kam es zu einer leichten Zunahme der Standardabweichung bei späteren Ablesezeitpunkten. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde als Inkubationszeit bis zum Ablesen eine Dauer von vier Stunden gewählt. Das Verhalten der Extinktion über die Zeit ist in Abbildung 2 dargestellt.

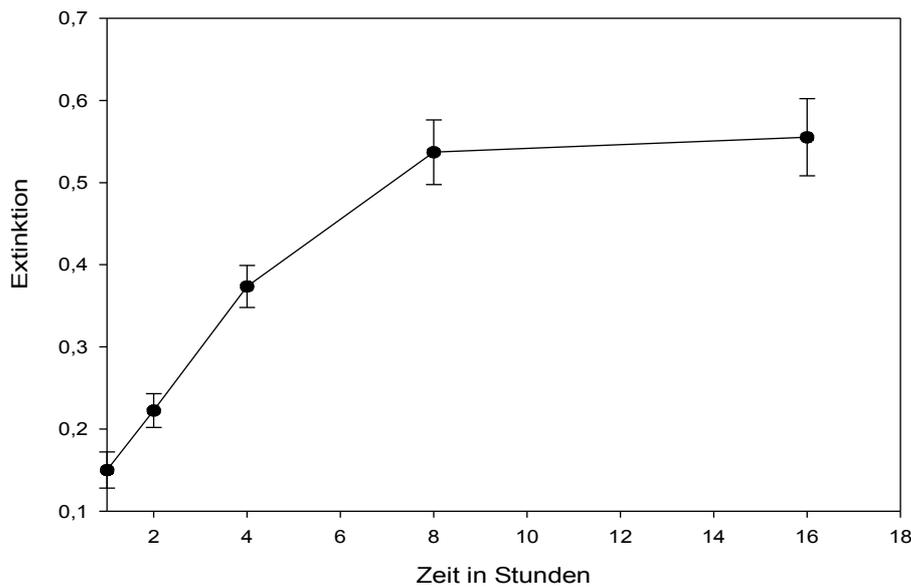


Abb. 2) Extinktionsänderung im WST-1-Test im zeitlichen Verlauf, hervorgerufen durch unbehandelte U373-Sphäroide.

3.2 Zellvitalität der Sphäroide ohne ALA, nach Bestrahlung

Für die beiden Zelllinien U373 und A172 wurde die alleinige Bestrahlung (ohne ALA-Inkubation) der Sphäroide mit Laserlicht (625 s, bei 1 W und 635 nm Wellenlänge) als Kontrolle zu den Behandlungsgruppen mit photodynamischer Therapie (ALA mit Laserbestrahlung) durchgeführt. Es wurde die Zellvitalität nach vier Stunden mit dem WST-1-Test gemessen. Es wurden Bestrahlungszeiten von null Sekunden bis hin zu 700 Sekunden in Hunderterschritten gewählt. Nach jeder der unterschiedlichen Bestrahlungszeiten wurde mit den entsprechenden Sphäroiden der WST-1 Test praktiziert und nach 16 Stunden photometrisch ausgewertet. Hierfür wurden wieder Vierfachansätze mit jeweils drei Sphäroiden pro Well verwendet. Separat für jede Zelllinie (U373 und A172) wurden für jede Bestrahlungszeit je zwei Vierfachansätze mit 12 Sphäroiden gewählt. Die Extinktion eines Vierfachansatzes wurde prozentual auf die Extinktion der Standardgruppe (ohne ALA; ohne R) bezogen. Der resultierende Prozentwert repräsentierte die verbliebene Zellvitalität der vier bestrahlten Wells. Es wurden die Mittelwerte

jeweils beider Vierfachansätze als verbliebene Zellvitalität dargestellt (Abb. 3). Bei beiden Zelllinien zeigte sich, dass die alleinige Bestrahlung mit Laserlicht mit einer Wellenlänge von 635nm und einer Energiedosis von 1 W für eine Dauer von 625 s keinen mit dem WST-1-Test messbaren, signifikanten Effekt auf die Zellvitalität besitzt.

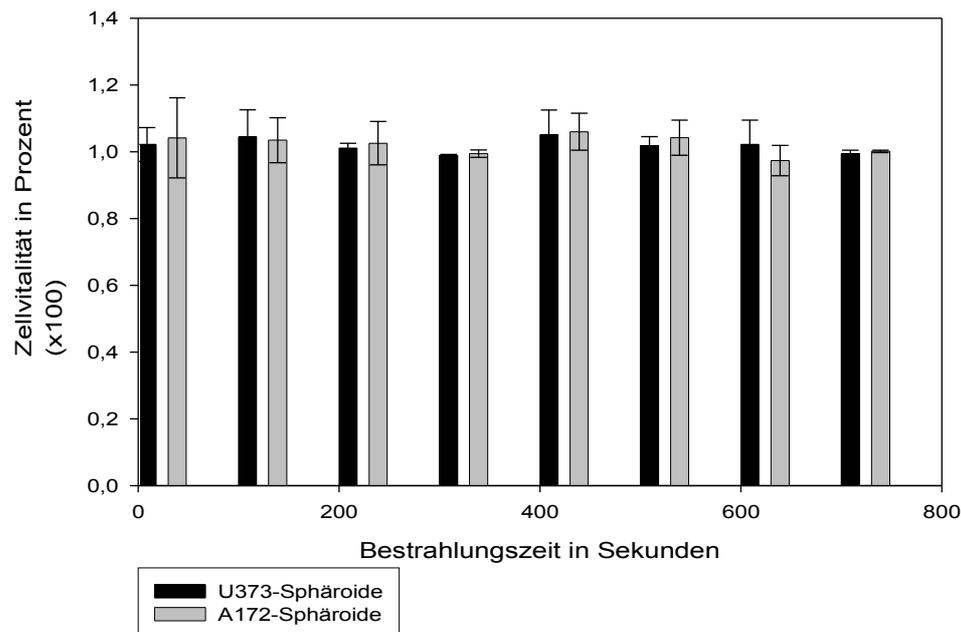


Abb. 3) Zellvitalität der U373- und A172-Sphäroide im WST-1-Test nach vier Stunden ohne ALA-Inkubation in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit bei jeweils 1 W.

3.3 Zellvitalität in Abhängigkeit von der ALA-Dosis, ohne Bestrahlung

Als Kontrollgruppe zu den behandelten Sphäroiden wurden Tumorsphäroide unter gleichen Bedingungen behandelt wie die der Behandlungsgruppe (ALA-Inkubation), mit dem Unterschied, dass keine Bestrahlung mit Laserlicht stattfand. Die sonstigen Parameter waren bei den Versuchen identisch. Das heißt, es wurden Sphäroide in einem Durchmesser von 250-300 μm verwendet, die ALA-Konzentrationen betragen 3; 6; 12,5; 15; 18 und 25 $\mu\text{g/ml}$ bei einer Inkubation von vier Stunden und einer Bestrahlungszeit von 625 s bei 1 W.

Nach vier Stunden wurde der photometrische WST-1 Test angewendet. Dieser Versuchsaufbau wurde in identischer Weise bei beiden Zelllinien U373 und A172 praktiziert. Es wurden in jeder ALA-Konzentration sechs Vierfachansätze mit jeweils 12 Sphäroiden durchgeführt (insgesamt 72 Sphäroide pro ALA-Konzentration). Die verbliebene Zellvitalität wird prozentual als Mittelwert der sechs Vierfachansätze dargestellt (Abb. 4).

Es zeigte sich im WST-1-Test nach vier Stunden bei allen ALA-Konzentrationen kein signifikanter Unterschied in der Zellvitalität im Vergleich zur Standardgruppe (kein ALA, keine Bestrahlung). Die Zellvitalität lag bei allen Gruppen nach vier Stunden bei nahezu 100 % (Abb. 4).

Folglich zeigt sich, dass die alleinige Inkubation von ALA in den angegebenen Konzentrationen (3-25 µg/ml) keinerlei hemmenden oder stimulierenden Effekt auf die Zellvitalität der Gliomsphäroide besitzt. Auch die doppelte Dosis von 5-ALA konnte das Wachstum der Sphäroide ohne PDT nicht signifikant beeinflussen.

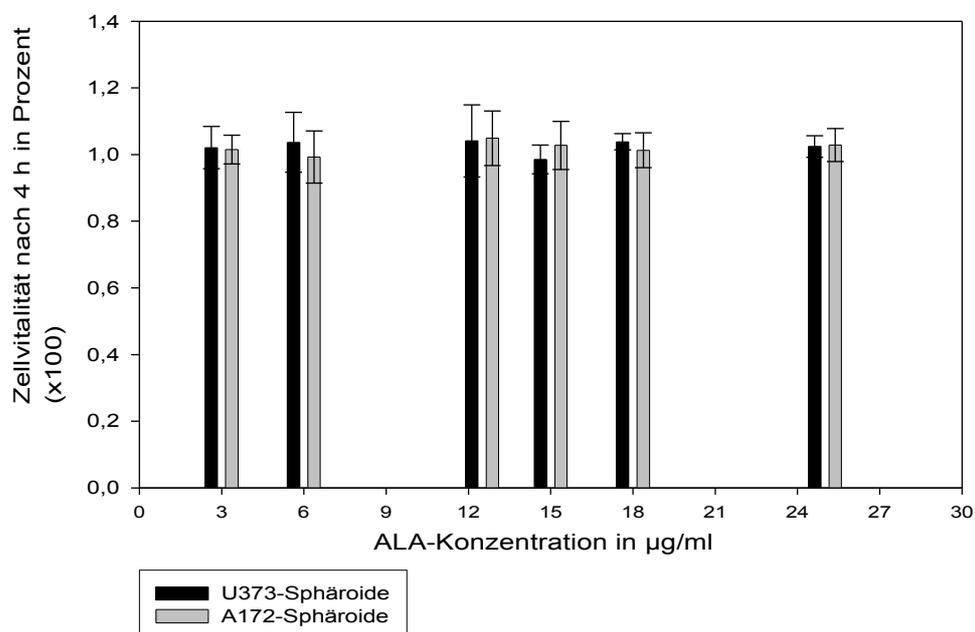


Abb. 4) Zellvitalität der U-373- und A172-Sphäroide nach 4 h im WST-1-test in Abhängigkeit von der ALA-Konzentration ohne Laserbestrahlung. Signifikante Unterschiede waren auch hier nicht erkennbar.

3.4 Ermittlung einer letalen Dosis 50 (LD-50) bei U373- und A172-Sphäroiden

Für die Bestimmung einer sogenannten LD-50 (letale Dosis 50), bei der die Hälfte der Zellen keine Vitalität mehr aufweist, wurden Sphäroide mit einer fixen Bestrahlungsdosis von 625 Sekunden bei 1 W und variabler, eskalierender ALA-Konzentration gewählt. Es wurden Tumorsphäroide der Zelllinien U373 und A172 mit einem Durchmesser von 250 bis 300 µm verwendet. Als ALA-Konzentrationen wurden für jede Zelllinie folgende Werte gewählt:

kein ALA; 3 µg/l; 6 µg /ml; 12,5 µg/ml; 15 µg/ml; 18 µg/ml; 25 µg/ml.

Für die Dosisfindungsexperimente wurden Vierfachansätze gewählt, wobei jedem Ansatz 12 Sphäroide zugrunde liegen (drei Sphäroide pro Well). Für die Zelllinien A172 und U373 wurden für jede ALA-Konzentration sechs Vierfachansätze durchgeführt (72 Sphäroide pro ALA-Konzentration). Bei der Zelllinie U373 wurden davon abweichend bei den ALA-Konzentrationen von 0

$\mu\text{g/ml}$ 14 Vierfachansätze (168 Sphäroide) und bei $12,5 \mu\text{g/ml}$ 19 Vierfachansätze (228 Sphäroide) durchgeführt.

Die Zellvitalität wurde auch hier wieder nach vier Stunden mit dem WST-1-Assay nach dem oben beschriebenen Schema gemessen. Hierbei entsprach die Kontrollgruppe einer Vitalität von 100 %. Die verbliebene Vitalität der einzelnen Behandlungsgruppen wurde prozentual auf die Standardgruppe bezogen.

Vier Stunden nach Bestrahlung der Tumorsphäroide beider Zelllinien zeigte sich bei $0 \mu\text{g/ml}$, $3 \mu\text{g/ml}$ und bei $6 \mu\text{g/ml}$ keine Vitalitätsminderung. Bei weiter ansteigender ALA-Dosis zeigte sich eine Abnahme der Vitalität. So lagen bei $12,5 \mu\text{g/ml}$ bei der Zelllinie U373 eine Minderung des Zellwachstums auf 62,1 % und bei A172-Zellen eine Minderung auf 49,4 % bei $15 \mu\text{g/ml}$ vor. Bei weiter ansteigender ALA-Dosis ging die verbleibende Zellvitalität bei beiden Zelllinien immer weiter gegen Null. Abbildung 5 zeigt die verbliebene Zellvitalität nach PDT in Abhängigkeit von der ALA-Konzentration für beide Zelllinien. Aus dem sigmoidalen Verlauf der in Abb. 5 dargestellten Kurven lässt sich schließen, dass relativ geringe Schwankungen der ALA-Dosis in einem Bereich von $6 \mu\text{g/ml}$ bis $15 \mu\text{g/ml}$ ALA (bei 625 s Bestrahlung bei 1 W) einen relativ starken Effekt auf die Zellvitalität haben.

Aus diesen Ergebnissen ließen sich für die weiteren Versuche eine LD-50 von $12,5 \mu\text{g/ml}$ ALA bei 625 s und 1 W Laserlicht mit der Wellenlänge von 635 nm für die Zelllinie U373 und $15 \mu\text{g/ml}$ ALA für die Zelllinie A172 bei gleichen Bestrahlungsparametern festlegen.

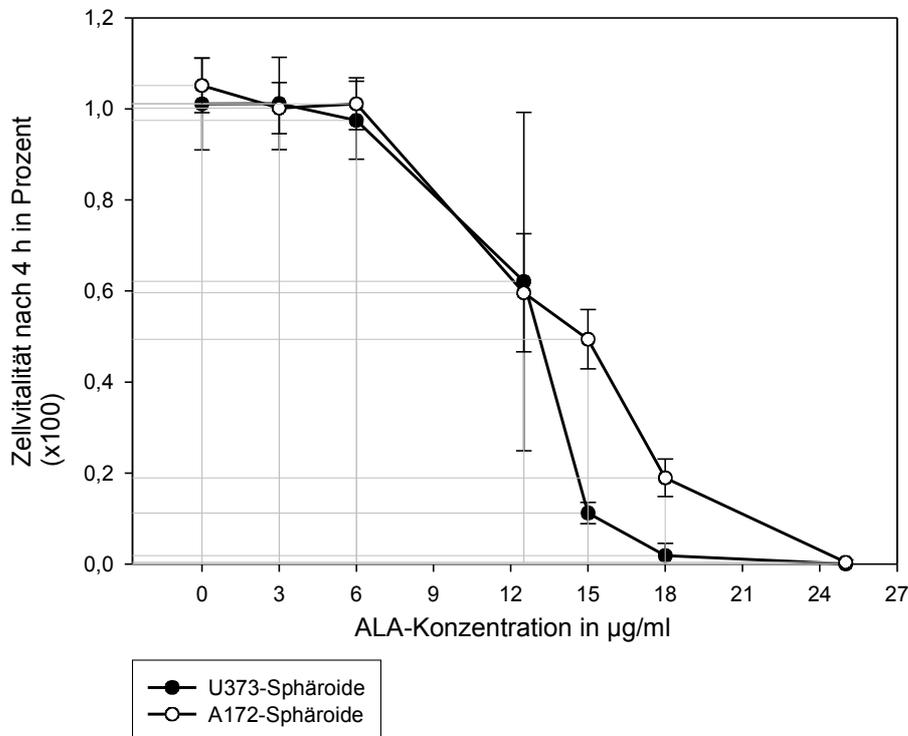


Abb. 5) Gezeigt wird die Zellvitalität von U373- und A172-Sphäroiden nach vier Stunden im WST-1-Test nach PDT (625 s bei 1 W) in Abhängigkeit von der ALA-Konzentration. Bei den U373-Sphäroiden zeigen sich 60 % Vitalität bei einer ALA-Konzentration von 12,5 µg/ml, bei den A172-Sphäroiden liegt die LD-50 bei 15 µg/ml.

3.5 Migrationsverhalten der Tumorsphäroide, ohne ALA-Behandlung und ohne Bestrahlung

Zur Untersuchung der Beeinflussung der Migrationsfähigkeit von Tumorzellen aus Gliomsphäroiden der Zelllinien U373 und A172 wurden neben der Behandlungsgruppe aus Sphäroiden mit ALA-Inkubation und Bestrahlung die im Methodikteil beschriebenen Kontrollgruppen gebildet.

Für die Zellen der Linie U373 wurde eine ALA-Konzentration von 12,5 µg/ml gewählt und für die Zellen der Linie eine Konzentration von 15 µg/ml. Die Bestrahlungszeit betrug jeweils 625 s bei 1 W. Diese Parameter entsprachen der für die jeweilige Zelllinie ermittelten LD-50. Bei beiden Zelllinien wurden in der Kontrollgruppe (-ALA/-PDT) jeweils die Durchmesser der Fläche der migrierenden Zellen von je acht Sphäroiden über einen Zeitraum von 14 Tagen bestimmt. Dies geschah lichtmikroskopisch mit einem Messokular. Das mikroskopische Erscheinungsbild der Sphäroide in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus ist in den Abbildungen sechs bis neun gezeigt. In den Abbildungen sieben und neun lassen sich die vom Tumorsphäroid in die Peripherie migrierenden Tumorzellen erkennen.

Die in Abbildung zehn gezeigten Werte stellen Mittelwerte der jeweiligen Durchmesser zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten dar (Beobachtungszeitraum: 14 Tage). Der Durchmesser von 250 µm gilt als Ausgangsradius, welcher dem durchschnittlichen Sphäroiddurchmesser ohne Migration entspricht. Es zeigte sich bei beiden Zelllinien eine stetige Zunahme des Migrationsradius, wobei die Migration der A172-Zellen eine etwas langsamere Progredienz vorweist. Aus den Mittelwerten der Migrationsradien an den unterschiedlichen Messzeitpunkten wurde eine Regressionsgerade ermittelt und als Steigung angegeben.

Die Steigung für die A172 Zellen betrug 141,135 bei einer Signifikanz von $p < 0,000$ im ANOVA-Test (Signifikanzniveau: 0,05) mit einem Achsabschnitt von -30,27.

Für die U373 Zellen war der Wert der Steigung 258,118 bei einer Signifikanz von $p < 0,000$ mit einem Achsabschnitt von 55,99. Das Migrationsverhalten der U373-Zellen zeigte sich ausgeprägter, als das der A172-Sphäroide, was die größere Steigung der U373-Zellen erklärt.

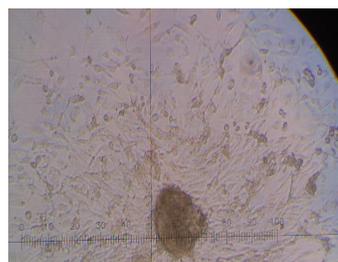


Abb. 6)

Tumorsphäroid
ohne ALA, ohne Bestrahlung,
direkt nach der Inkubation (U373)

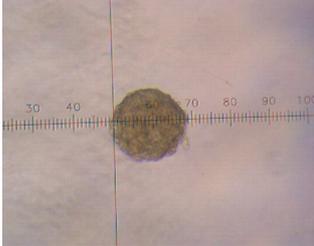


Abb. 7)

Tumorsphäroid
ohne ALA, ohne Bestrahlung,
nach vier Tagen (U373)

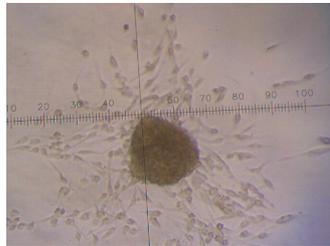


Abb. 8)

Tumorsphäroid
ohne ALA, ohne Bestrahlung,
direkt nach ALA-Inkubation (A172)

Abb. 9)

Tumorsphäroid
ohne ALA, ohne
Bestrahlung nach vier Tagen (A172)

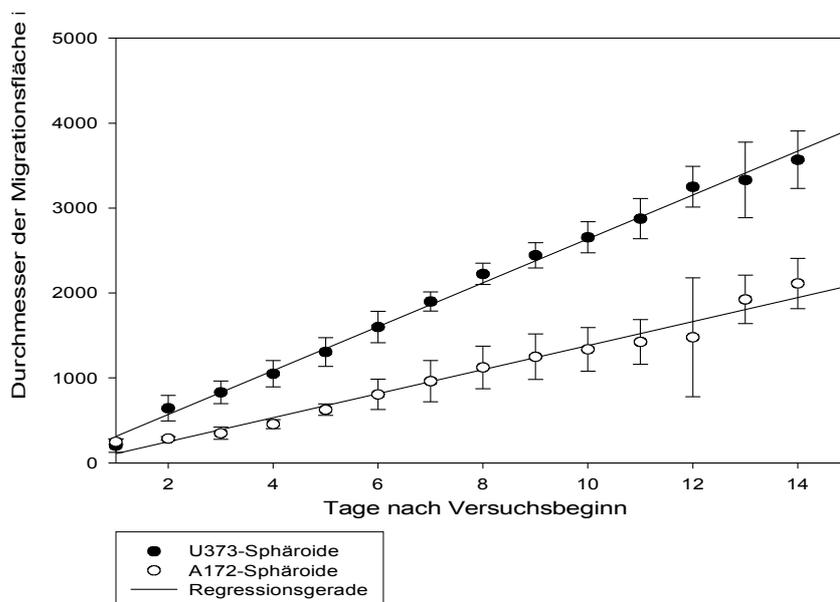


Abb. 10) Migrationsverhalten der U373- und A172-Tumorsphäroide, ohne ALA-Inkubation und ohne Laserbestrahlung. Beobachtungszeitraum: 14 Tage.

3.6 Migrationsverhalten der Tumorsphäroide, ohne ALA-Behandlung und mit Bestrahlung

Als weitere Kontrollgruppe wurde an beiden Zelllinien die Kontrollgruppe ohne ALA-Kontakt mit 625 s Laserlichtbestrahlung bei 1 W untersucht. Hierfür wurden die Tumorsphäroide von den mit Agar beschichteten Petrischalen auf nicht beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatten gegeben. Im Anschluss daran fand

die Bestrahlung statt. Die Bestimmung bzw. Berechnung der Mittelwerte der Migrationsdurchmesser glich der oben beschriebenen Methode. Die Anzahl der Sphäroide betrug pro Zelllinie je acht Einzelsphäroide.

In diesem Versuchsaufbau (-ALA/+Bestrahlung) zeigte sich ebenfalls bei beiden Zelllinien eine deutliche Zellmigration über den Zeitraum von 14 Tagen (Abb. 11 und 12). Auch hier fiel die Migration der A172-Zellen im Vergleich zu den U373-Zellen geringer aus. Die graphische Darstellung des Migrationsverhaltens zeigt Abbildung 13.

Die Steigung für die A172 Zellen betrug 163,7 ($p < 0,000$ im ANOVA-Test; Achsabschnitt = $-197,4$).

Die U373 Zellen zeigten auch hier eine größere Steigung von 266,95 ($p < 0,000$; Achsabschnitt von $-40,28$).



Abb. 11)

Ohne ALA, mit Bestrahlung,
U373 nach vier Tagen

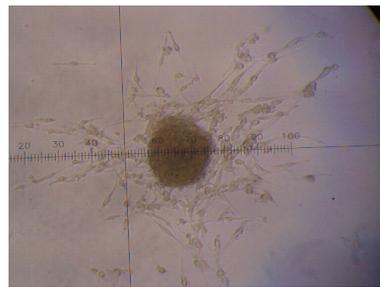


Abb. 12)

Ohne ALA, mit Bestrahlung,
A172 nach vier Tagen

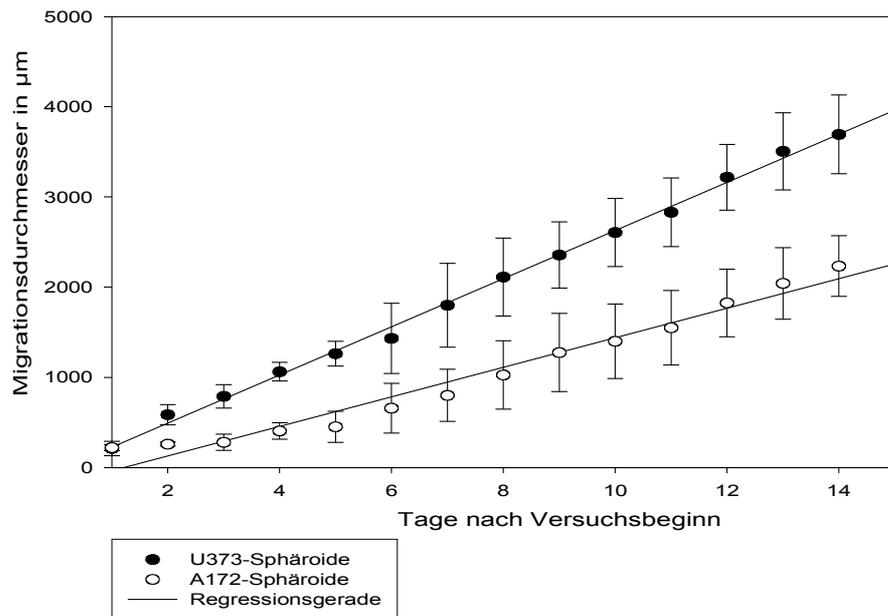


Abb. 13) Migrationsverhalten der U373- und A172-Tumorsphäroide, ohne ALA-Inkubation und mit Laserbestrahlung. Beobachtungszeitraum: 14 Tage.

3.7 Migrationsverhalten der Tumorsphäroide mit ALA-Behandlung und ohne Bestrahlung

Die Zelllinien U373 und A172 wurden nach ALA-Inkubation mit den Konzentrationen von 12,5 µg/ml (U373) und 15 mg/ml (A172) ohne Bestrahlung hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens untersucht. Die Abbildungen 14 und 15 zeigen das Wachstumsverhalten der Migrationsfront bei den Tumorsphäroiden mit ALA-Behandlung und ohne Bestrahlung über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Anzahl der Sphäroide betrug auch in diesem Versuchsaufbau pro Zelllinie acht Einzelsphäroide. Auch hier bestätigten sich die Ergebnisse der übrigen Kontrollgruppen. Es war ein konstantes Wachstum der Migrationsradien zu verzeichnen (Abb. 16), wobei die die Steigung für die A172-Zellen mit einem Wert von 97,849 ($p < 0,000$ im ANOVA-Test; Achsabschnitt: 45,687) niedriger ausfiel. Für die U373 Zellen betrug die Steigung 149,184 bei einer Signifikanz von $p < 0,000$ mit einem Achsabschnitt von 23,530.

Darüber hinaus fiel auf, dass das Migrationsverhalten nach alleiniger ALA-Inkubation niedriger ausfiel als bei den Gruppen ohne ALA (siehe unten).



Abb. 14)
Mit ALA, ohne Bestrahlung,
nach vier Tagen (U373)

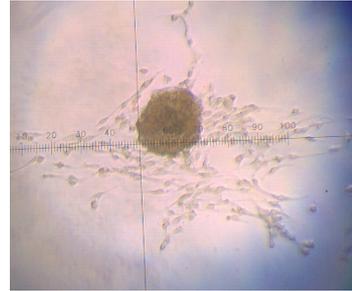


Abb. 15)
Mit ALA, ohne Bestrahlung,
nach vier Tagen (A172)

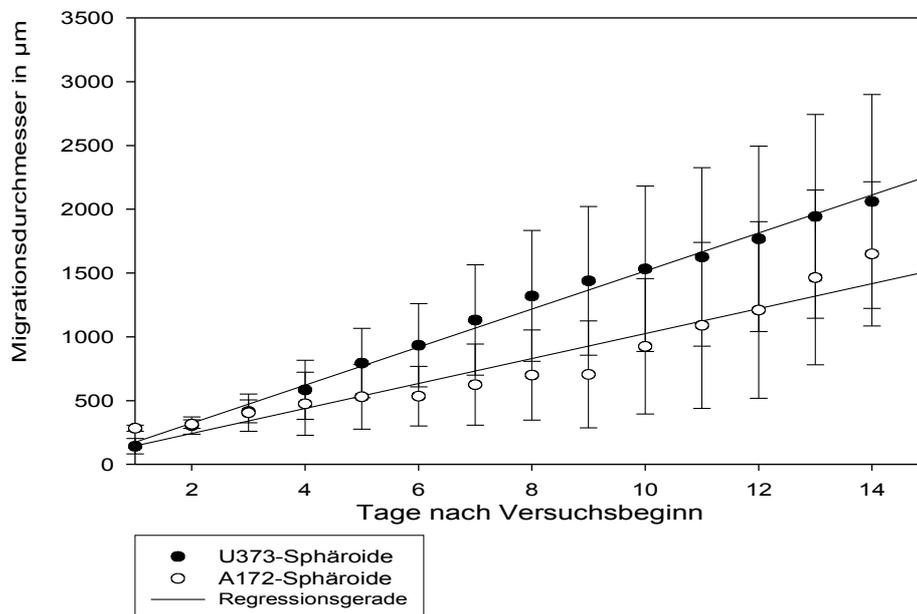


Abb. 16) Migrationsverhalten der U373- und A172-Tumorsphäroide, mit ALA-Inkubation und ohne Laserbestrahlung. Beobachtungszeitraum: 14 Tage.

3.8 Verhalten der Tumorsphäroide nach PDT (mit ALA-Behandlung und Bestrahlung)

In den Behandlungsgruppen (mit ALA und Bestrahlung) beider Zelllinien (U373 und A172) wurde die PDT mit 12,5 µg/ml ALA (U373) und 15 µg/ml ALA (A172) über 623 Sekunden bei 1 W durchgeführt. Diese Kombinationen aus ALA-Konzentration und Energiedosis entsprachen den in den vorhergehenden

Versuchen ermittelten LD-50. Insgesamt wurden für jede Zelllinie acht Sphäroide im Durchmesser von ca. 250 μm über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet.

Bei den direkt nach der Bestrahlung mit dem Messokular ausgemessenen Sphäroiden beider Zelllinien zeigte sich kein Unterschied zu den Sphäroiden vor der Bestrahlung (Abb. 17). Nach einem Tag fand sich eine Größenzunahme der Tumore auf 285,417 μm (U373) und 289,667 μm (A172) (Abb. 18 und 20). Diese Durchmesser stellen den Mittelwert der jeweils 24 Sphäroide dar. Nach zwei Tagen zeigte sich lediglich ein geringer Anstieg der Sphäroiddurchmesser auf 325,667 μm (U373) und 295,833 μm (A172). Nach drei Tagen war ein Abfallen der durchschnittlichen Durchmesser auf 269,565 μm (U373) (Abb. 19) und 268,201 μm (A172) zu verzeichnen. Dieser Wert blieb auch nach 14 Tagen bei beiden Zelllinien nahezu unverändert. Des Weiteren fanden sich bei beiden Zelllinien über den gesamten Beobachtungszeitraum von vier und 14 Tagen keine migrierenden Zellen im Umkreis der Tumorsphäroide. Der zeitliche Verlauf des Wachstumsverhaltens der Tumorsphäroide ist in Abbildung 21 graphisch dargestellt. Die Steigung der Regressionsgeraden für die A172 Zellen betrug $-3,871$ bei einer Signifikanz von $p = 0,001$ im ANOVA-Test mit einem Achsabschnitt von 261,264.

Die negative Steigung kam durch die initiale Sphäroiddurchmesserzunahme und das darauffolgende Abschwellen zustande. Nach Tag fünf blieb der Durchmesser konstant (entspricht keinem Wachstum). Die Steigung betrug ab Tag fünf nahezu null. Für die U373-Sphäroide waren die Ergebnisse vergleichbar (Steigung: $-4,486$; $p=0,069$; Achsabschnitt von 275,701).



Abb. 17) Mit ALA, mit Bestrahlung
unmittelbar nach PDT (U373)



Abb. 18) Mit ALA, mit Bestrahlung,
einem Tag nach PDT (U373)

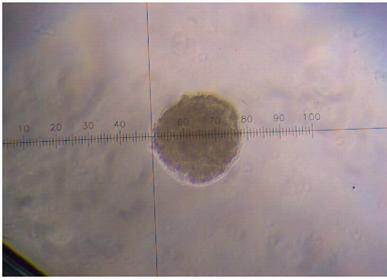


Abb. 19) Mit ALA, mit Bestrahlung, vier Tage nach PDT (U373)

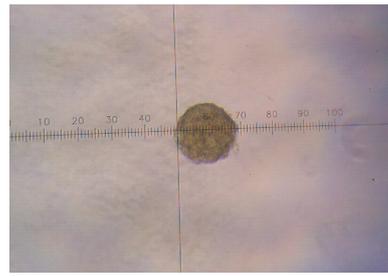


Abb. 20) Mit ALA, mit Bestrahlung, einen Tag nach PDT (A172)

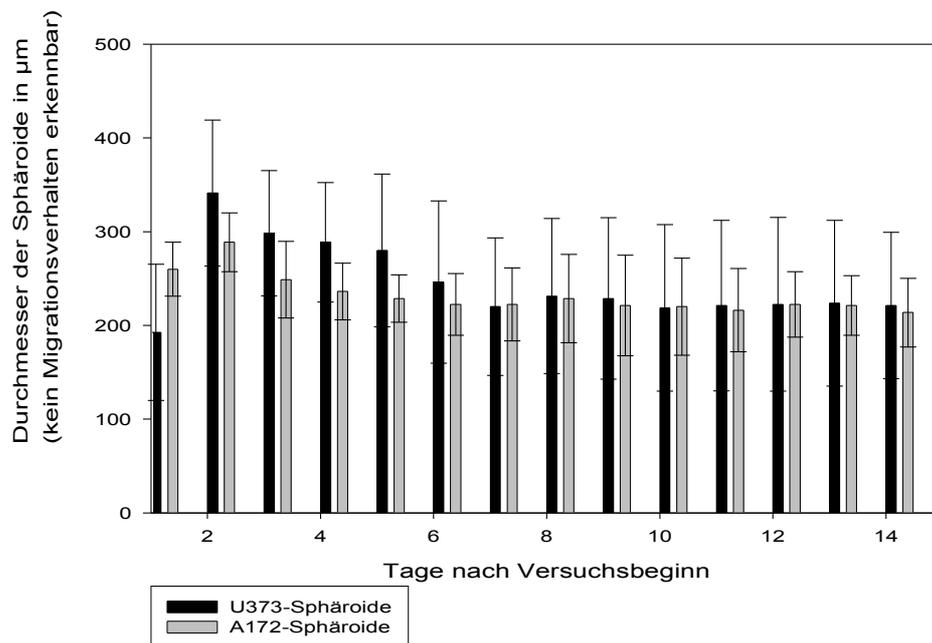


Abb. 21) Verhalten des Durchmesser der U373 und A172-Sphäroide über 14 Tage nach PDT mit 12,5 µg (U373) und 15µg (A172) ALA und 625s Bestrahlung bei 1 W. Beobachtungszeitraum: 14 Tage.

3.9 Vitalitätskontrolle nach einem, vier und 14 Tagen, in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus

Um zu überprüfen, ob die fünf und 14 Tage andauernde Migrationshemmung nicht auf ein Absterben sämtlicher Zellen in den Tumorsphäroiden unmittelbar nach der Bestrahlung oder während des Beobachtungszeitraums zurückzuführen ist, wurde bei beiden Zelllinien (U373 und A172) der WST-1 Test direkt nach der photodynamischen Therapie nach vier Tagen und nach 14

Tagen durchgeführt. Hierfür wurden bei jeder Zelllinie für jeden einzelnen Behandlungsmodus drei Vierfachansätze mit je 12 Sphäroiden mit dem WST-1-Test ausgewertet (Zeitraum über vier Tage). Für den Beobachtungszeitraum über 14 Tage wurden für jeden Behandlungsmodus je zwei Vierfachansätze gewählt. Der WST-1-Test wurde direkt nach der PDT, nach vier Tagen und nach 14 Tagen angewandt. Die verbliebene Zellvitalität zu den genannten Zeitpunkten ist in den Abbildungen 22 und 23 dargestellt. Es zeigte sich bei beiden Zelllinien in den Kontrollgruppen (-ALA / -Bestrahlung; -ALA / +Bestrahlung; +ALA / -Bestrahlung) nach einem Zeitraum von vier Stunden, nach vier Tagen und nach 14 Tagen keine signifikante Reduktion der Zellvitalität. Die Untersuchung der Behandlungsgruppen ergab vier Stunden nach PDT eine Minderung der als vital detektierbaren Zellen auf ca. 50 % der Ausgangsmenge (A172: $p = 0,001$; U373: $p < 0,000$). Dieser Wert war über die Beobachtungszeiträume von vier Tagen (A172: $p = 0,001$; U373: $p < 0,000$) und 14 Tagen (A172: $p < 0,000$; U373: $p = 0,001$) konstant. Beim Vergleich der Vitalität der Behandlungsgruppen (+ALA / +Bestrahlung) von Tag eins, fünf und 14 zeigte sich kein signifikanter Vitalitätsunterschied. Es lag zu den drei Zeitpunkten eine 50-prozentige Vitalität vor. Die drei Kontrollgruppen (-ALA / -Bestrahlung; -ALA / +Bestrahlung; +ALA / -Bestrahlung) waren zu den drei Ablesezeitpunkten weder vitalitätsgemindert, noch unterschieden sie sich an den drei Messzeitpunkten signifikant. Durch diese Ergebnisse konnte ausgeschlossen werden, dass die PDT-induzierte Migrationshemmung auf eine komplette Schädigung aller Zellen, oder auf ein Absterben des gesamten Tumorsphäroids über den Beobachtungszeitraum zurückzuführen ist, da die 50 % Vitalität des Ausgangstages über den Zeitraum von 14 Tagen erhalten blieb.

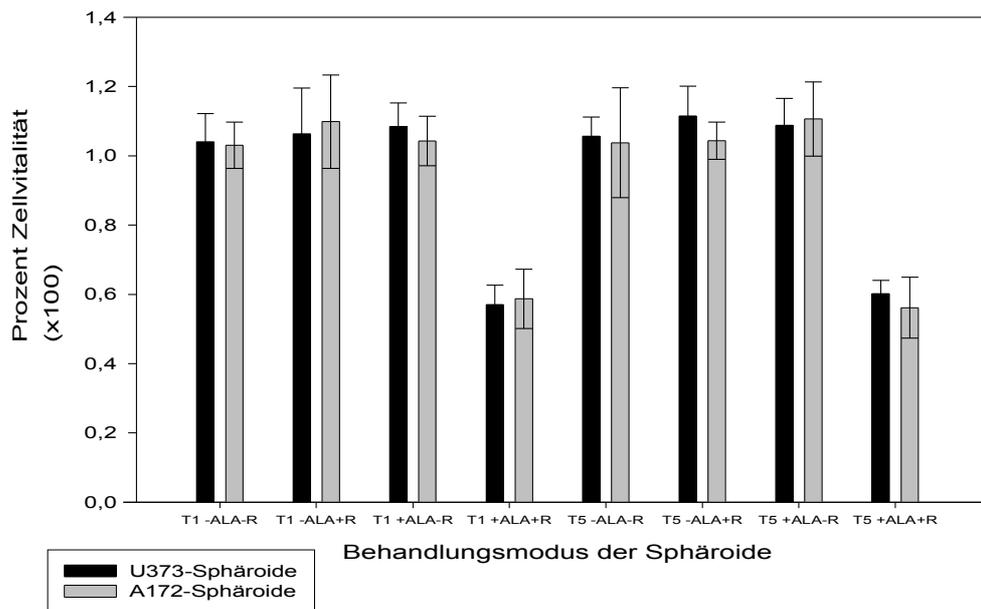


Abb. 22) Vitalitätskontrolle der U373- und A172-Sphäroide nach einem und vier Tagen in Abhängigkeit von ihrer Behandlung. (T1 = vier Stunden, T5 = vier Tage, T14= 14 Tage nach Bestrahlung)

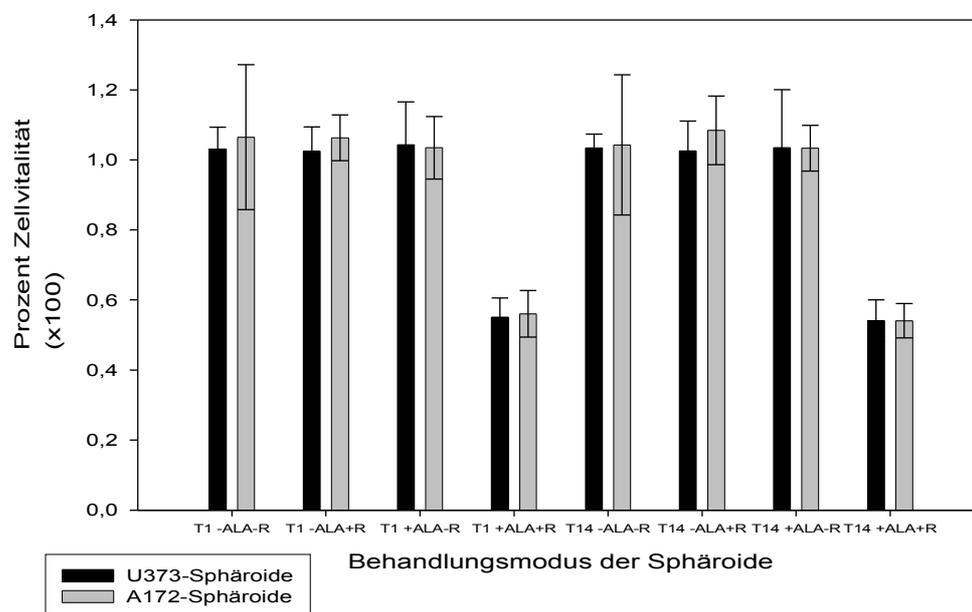


Abb. 23) Vitalitätskontrolle der U373- und A172-Sphäroide nach einem und 14 Tagen in Abhängigkeit von ihrer Behandlung.

3.10 Vergleich der Behandlungsmodi im Migrationsversuch mit U373- und A172-Gliomsphäroiden

Die vergleichende Betrachtung des Migrationsverhaltens zeigte keine Migrationshemmung bei alleiniger Bestrahlung (-ALA / +R) nach 14 Tagen. Nach alleiniger Gabe von ALA (+ALA / -R) war eine signifikante Migrationshemmung ($P = 0,0002$) für U373 nach vier Tagen auf ungefähr 70 % der Kontrollgruppe zu verzeichnen. Eine ähnlich starke Migrationshemmung war bei den U373- und A172-Zellen nach 14 Tagen zu beobachten. In den Behandlungsgruppen (+ALA / +R) zeigte sich bei beiden Zelllinien nach 14 Tagen keinerlei Migration. Der in Abbildung 24 angegebene Durchmesser von ca. 250 μm entsprach dem Ausgangsdurchmesser der Tumorsphäroide ohne migrierte Zellen.

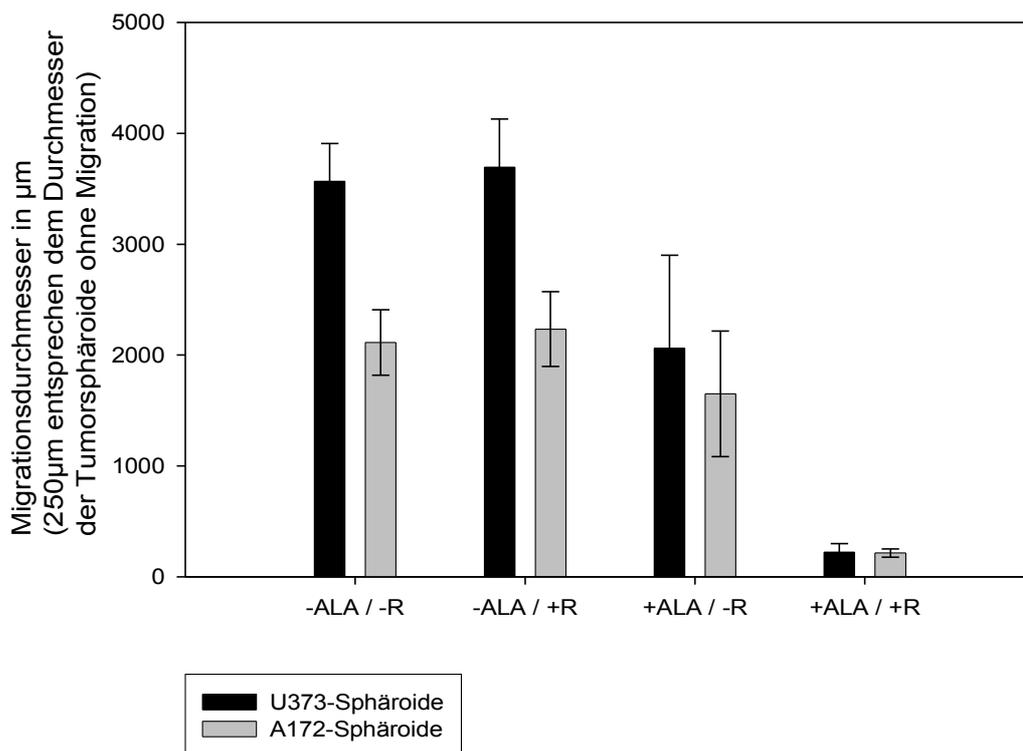


Abb. 24) Vergleich des Migrationsverhaltens der U373- und A172-Sphäroide nach 14 Tagen in Abhängigkeit von ihrem Behandlungsmodus.

3.11 Vergleich der Migrationsradien / Steigungen in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus

Die in den Migrationsassays aus den Migrationsradien ermittelten Steigungen bzw. Regressionsgeraden zeigten in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus Unterschiede. Die negative Steigung der Behandlungsgruppe (+ALA / +Bestrahlung) ließ sich durch die initiale Durchmesserzunahme und das darauffolgende Abschwollen der Tumorsphäroide erklären. Ab Tag fünf bleibt der Durchmesser nahezu konstant. Es fand keinerlei Zellmigration statt. Die größten Steigungen besaßen die Gruppen -ALA / -Bestrahlung und -ALA / +Bestrahlung. Bei der Gruppe mit alleiniger ALA-Gabe (ohne Bestrahlung) zeigte sich eine reduzierte Migrationstendenz (nicht signifikant), welche aber nicht mit einer erhöhten Antigenaufnahme in den unten beschriebenen Konfrontationsassays einherging. Diese Ergebnisse waren für beide Zelllinien (A172 und U373) vergleichbar und sind in den Abbildungen 25 und 26 graphisch dargestellt.

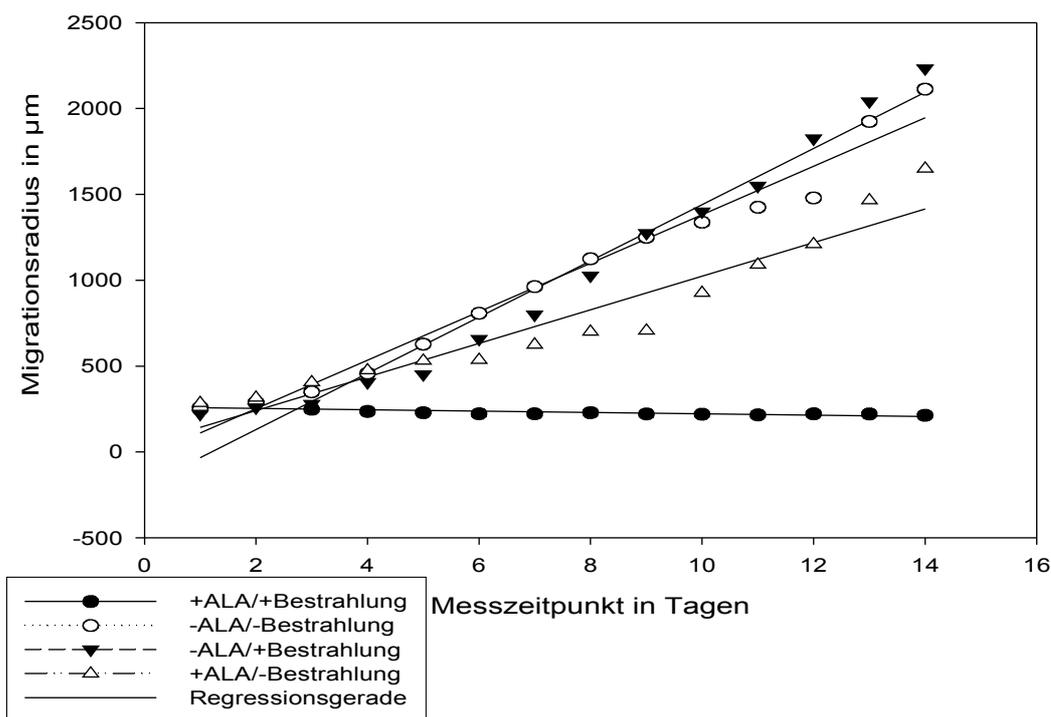


Abb. 25) Steigungen der Regressionsgeraden in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus in den Migrationsassays mit A172-Sphäroiden. Beobachtungszeitraum: 14 Tage.

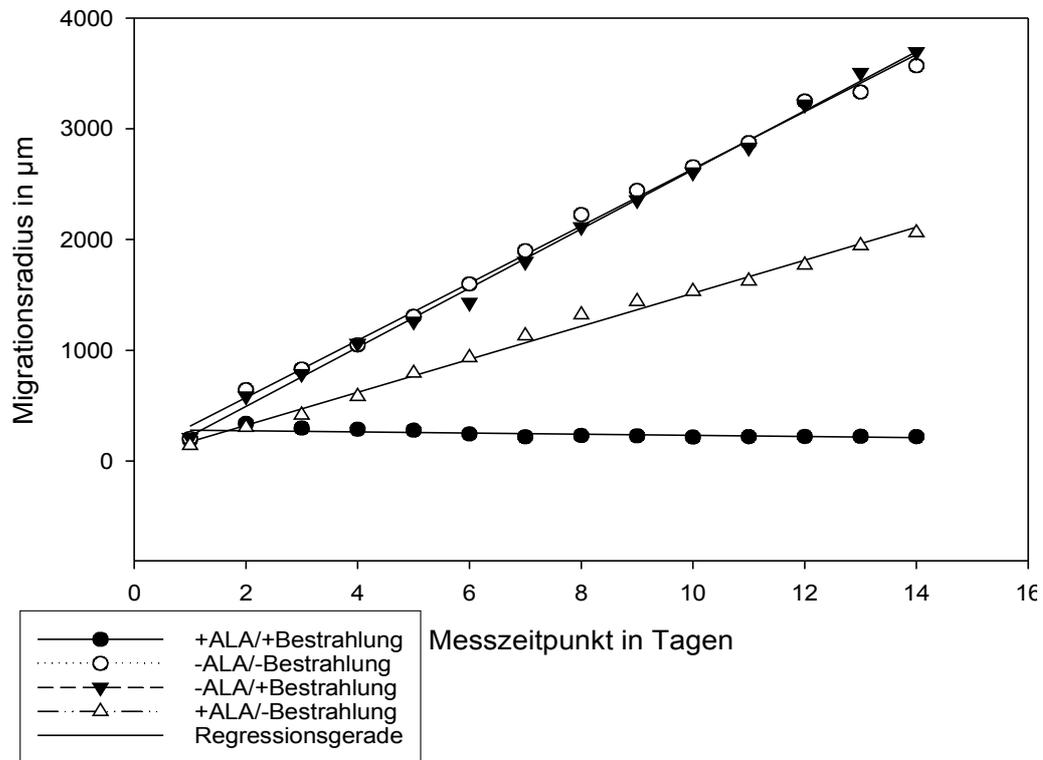


Abb. 26) Steigungen der Regressionsgeraden in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus in den Migrationsassays mit U373-Sphäroiden. Beobachtungszeitraum: 14 Tage.

3.12 Konfrontationsassays mit DC und Tumorsphäroiden

Abbildung 27 zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Auswertung eines Konfrontationsassays von DC mit U373-Einzelzellen und Tumorsphäroiden. Hierbei sind auf der Abszisse die durchflusszytometrisch erfassten Signale einer grünen Fluoreszenz (CFSE-markierte U373-Zellen) dargestellt. Die Ordinaten zeigen die relative Anzahl HLA-DR-positiver DC (rot) in der Durchflusszytometrie. Die in Abbildung 27 gezeigten Prozentangaben repräsentieren den Anteil CFSE-positiven Tumormaterials (grün), das mit roten Fluoreszenzereignissen zusammentrifft. Dies spiegelt den von DC aufgenommenen Anteil grün fluoreszierenden Tumormaterials wider.

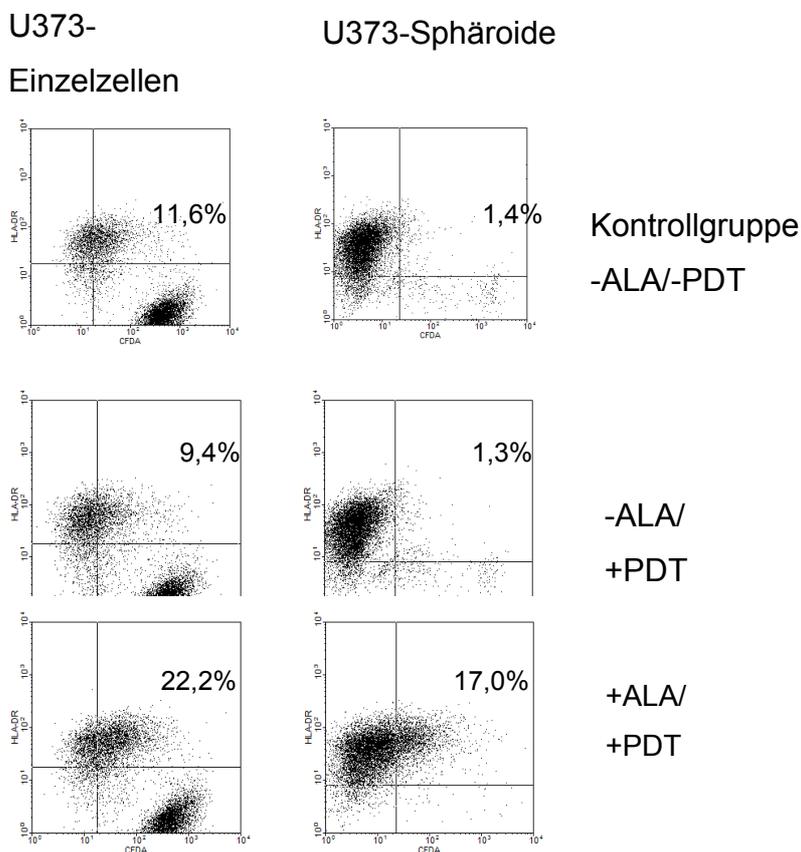


Abb. 27) Gezeigt wird exemplarisch die durchflusszytometrische Auswertung eines Konfrontationsassays von DC mit U373-Einzelzellen und Tumorsphäroiden.
Abszisse: Grüne Fluoreszenz CFSE-markierter Zellen.
Ordinate: HLA-DR-positive Zellen.

In dem gesamten Versuchsaufbau wird sowohl die Interaktion von DC mit U373-Einzelzellsuspensionen, als auch mit U373-Tumorsphäroiden separat

voneinander betrachtet. Die Kontrollgruppe wurde aus HLA-DR-markierten DC und CFSE-markierten U373-Zellen gebildet, wobei in dieser Gruppe keinerlei Behandlung der Tumorzellen stattgefunden hat (kein ALA und keine PDT). Als weitere Gruppen existierten die wie oben beschrieben gefärbten Zellen sowohl mit ALA-Behandlung, ohne PDT, als auch ohne ALA-Behandlung, mit PDT. Die Behandlungsgruppe wurde von ALA-inkubierten (12,5 µg/ml) und bestrahlten (625 s bei 1 W) Zellen gebildet. Die Negativkontrollgruppe stellen HLA-DR-gefärbte DC mit ungefärbten, unbehandelten U373-Zellen dar.

Die Abbildungen 28 und 29 zeigen die Tumorzellmaterialaufnahme durch DC in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus. DC, welche grün fluoreszierendes Tumormaterial aufgenommen haben, werden als positive DC bezeichnet.

Im ONEWAY ANOVA Test zeigte sich bei der Endozytose der DC von U373 Sphäroiden ein signifikanter Unterschied ($p=0,018$) zwischen den einzelnen Gruppen insgesamt. Im Post-Hoc-Test mit der Scheffé-Prozedur zeigte sich eine signifikant höhere Antigenaufnahme durch DC bei Sphäroiden der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (+ALA / +R vs. -ALA / -R: $p=0,037$). Die alleinige Bestrahlung und die alleinige Gabe von ALA führte zu keiner signifikant erhöhten Antigenaufnahme durch DC.

In der Behandlungsgruppe war im Vergleich zu den beiden weiteren Gruppen(+ALA / -R; -ALA / +R) die Antigen- bzw. Tumormaterialaufnahme durch DC zwar um fast das Fünffache gesteigert, aber aufgrund der niedrigen Fallzahl ($n=3$) war der Unterschied hier jedoch nur schwach signifikant (+ALA / +R vs. +ALA / -R: $p = 0,057$; +ALA / +R vs. -ALA / +R: $p = 0,057$).

Die Negativkontrolle (-ALA / -Bestrahlung/ohne CFSE-Färbung) registrierte praktisch keinerlei grünen Fluoreszenzereignisse, die mit einem roten Ereignis, hervorgerufen durch die HLA-DR-positiven DC, zusammentrafen (0,1 % für Einzelzellen und 0,3 % für Tumorsphäroide).

Andere Ergebnisse erbrachten die Konfrontationsassays mit DC und U373-Einzelzellen. Im ONEWAY ANOVA-Test zeigte die Endozytose der DC von U373 Einzelzellen keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen insgesamt ($p=0,63$). Im Post-Hoc-Test mit der Scheffé-Prozedur

zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Antigen- bzw. Tumormaterialaufnahme beim Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander. Die Antigenaufnahme bei der Behandlungsgruppe (+ALA / +R) war zwar im Vergleich zu den übrigen drei Gruppen(-ALA / -R; +ALA / -R; -ALA / +R) um ca. das 1,5-Fache gesteigert, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Dies lässt sich wahrscheinlich auf die geringe Fallzahl (n = 3) zurückführen.

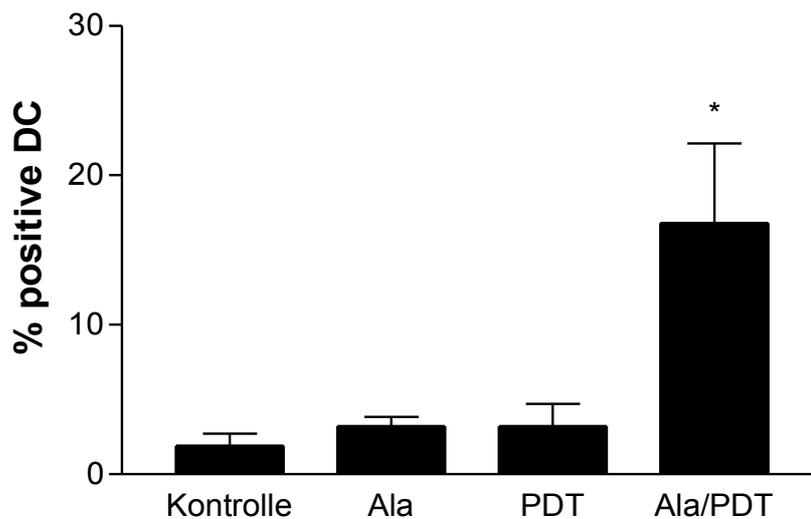


Abb. 28) Konfrontationsassay mit DC und U373-Sphäroiden. Gezeigt wird die Tumorzellmaterialaufnahme durch DC in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus.
* = signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

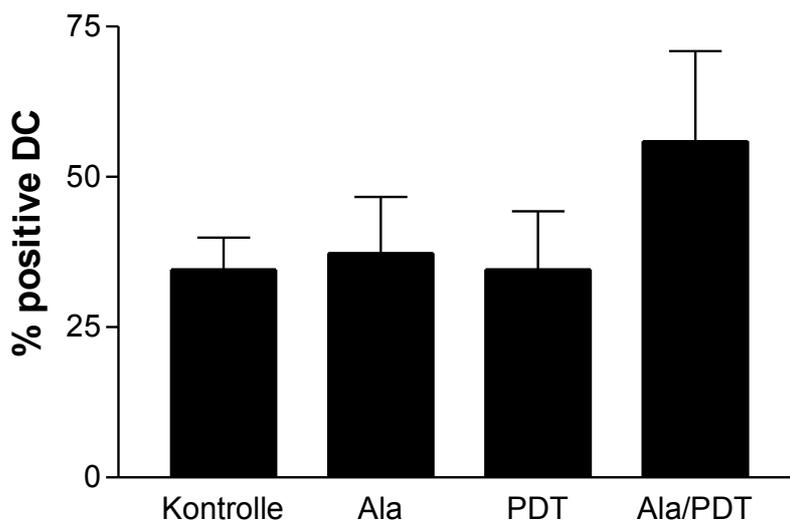


Abb. 29) Konfrontationsassay mit DC und U373-Einzelzellen. Gezeigt wird die Tumorzellmaterialaufnahme durch DC in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus.

Die Abbildung 30 zeigt die rot fluoreszierenden DC mit grün fluoreszierendem U373 Tumormaterial, welches durch Phagozytose aufgenommen wurde. Die Darstellung dokumentiert die gesteigerte perinukleäre Anreicherung von Tumormaterial (grün) in den roten DC. Die Fotos entstanden in Kooperation mit Dr. Erich Bünemann (Arbeitsgruppe Prof. Homey, Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf) durch Fluoreszenzmikroskopie an einem Zeiss CellObserver.

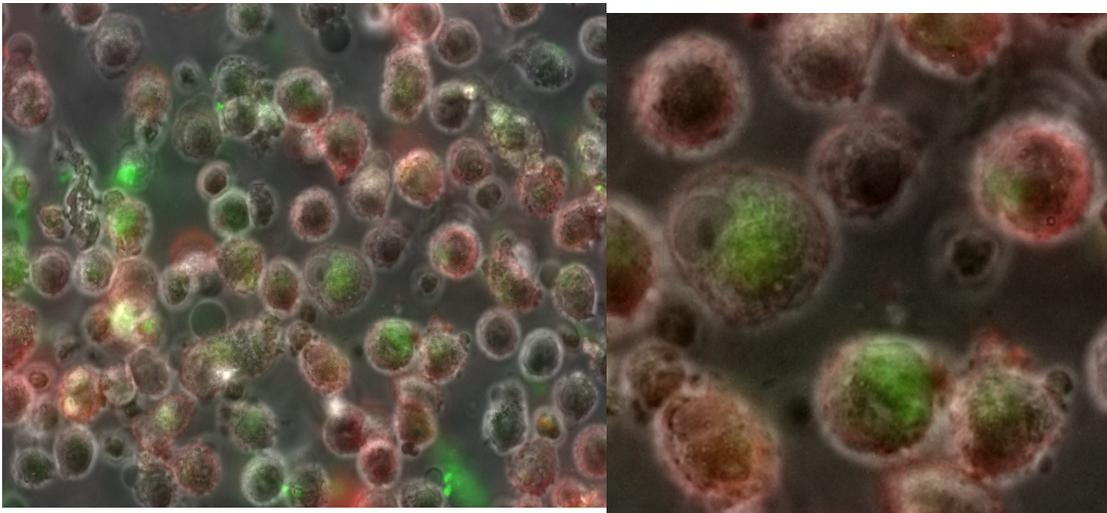


Abb. 30) Rot fluoreszierende DC mit phagozytiertem, perinukleärem, grün fluoreszierendem U373 Tumormaterial.

4 Diskussion

Gegenwärtig wird als experimentelles Verfahren die ALA-basierte PDT bei Patienten mit rezidiviertem malignen Gliom untersucht (Beck et al. 2007). Im Rahmen dieser Untersuchung war der klinische Verlauf einer 31-jährigen Patientin bemerkenswert (Stummer et al. 2007), die mittels 5-ALA-Phototherapie behandelt wurde.

Im Rahmen dieses Heilversuches (Stummer, 2007) wurde bei der Patientin eine stereotaktische, interstitielle Phototherapie mit 5-ALA durchgeführt. Ein Jahr zuvor wurde bei dieser Patientin ein links frontales Glioblastom operiert und bestrahlt. Unter Radio- und Temozolomidtherapie entwickelte sich im Verlauf ein Zweitherd in der linken Insel. Aufgrund der eloquenten Lage des Satellitenherdes wurde diese Patientin mit einer stereotaktischen, interstitiellen PDT mit 5-ALA behandelt. Es kam zur vollständigen Regression des Tumors. 56 Monate nach dieser Therapie lebte die Patientin weiterhin ohne bildmorphologisches Rezidiv im guten Allgemeinzustand. Dieser bisher atypische klinische Verlauf einer Gliompatientin nach interstitieller PDT warf die Frage auf, ob und in welcher Weise jenseits einer lokalen Destruktion des Tumors, eine systemische und spezifische Antwort gegen die residuellen Tumorzellen induziert wird und welche Mechanismen dieser zugrunde liegen. Ein hypothetisch zu vermutender Mechanismus wäre die Beeinflussung migratorischer oder invasiver Eigenschaften maligner Gliome.

Die therapieresistente Natur und das Auftreten von Rezidiven sind vor allem in den migratorischen und invasiven Eigenschaften des GBM begründet (Scott et al. 1998 ; Giese et al. 2001).

Ein Ziel dieser Arbeit war es Hinweise dafür zu sammeln, ob und in welchem Umfang im humanen Glioblastomsphäroidmodell die Kombination aus dem

Photosensibilisator 5-ALA und einer Bestrahlung bei 635 nm eine Migrationshemmung der Gliomzellen in die Tumorperipherie bewirken kann. Es sollte gezeigt werden, ob sich durch die 5-ALA-basierte PDT eine durch dendritische Zellen vermittelte anti-tumorale Immunantwort an Gliomsphäroiden induzieren lässt. Im Rahmen dieser Fragestellung wurde auch untersucht, ob die Gliomsphäroide durch PDT-Behandlung einen chemoattraktiven Reiz für DC generieren, welcher zu einer gesteigerten Antigenaufnahme von Tumorantigenen durch DC führt. Für diese Forschungsarbeit wurden im Vorfeld in Dosisfindungsstudien die Konzentration des Photosensibilisators 5-Aminolävulinsäure und die Bestrahlungszeit für die Glioblastomsphäroide optimiert.

Es bestätigte sich der in der Literatur beschriebene vitalitätsreduzierende Effekt der 5-ALA basierten PDT (Noodt et al. 1996) an A172- und U373-Tumorsphäroiden.

Im WST-1-Vitalitätstest zeigte sich eine signifikante, dosisabhängige Vitalitätsreduktion bei eskalierenden ALA-Dosierungen in Kombination mit der Laserlichtbestrahlung. Die alleinige ALA-Applikation oder Laserbestrahlung erzielte keinen Effekt. Ähnliche Beobachtungen machten bereits Zelenkov et al. (2007). Die verbliebene Zellvitalität lag jeweils analog zu der Kontrollgruppe (kein ALA / keine Bestrahlung) bei 100 %. Leichte Abweichungen von diesem Wert sind vermutlich auf die minimal unterschiedliche Beschaffenheit der Tumorsphäroide zurückzuführen, da es sich bei diesen dreidimensionalen Gebilden um jeweils eigenständige biologische Systeme handelt. Mit Hilfe des WST-1 Zellvitalitätstests lies sich eine PDT-Dosis für die nachfolgenden Migrations- und Konfrontationsexperimente bestimmen, bei der eine posttherapeutische Zellvitalität von 50 % vorliegt (letale Dosis 50).

Darüber hinaus wird untersucht, ob und in welchem Umfang sich die aktuelle Datenlage zu PDT-induzierten Immunantworten in nicht neuroonkologischen Bereichen auf die PDT des Glioblastoms übertragen lässt.

4.1 Der WST-1 Assay

Der WST-1 Assay basiert auf der Aktivitätsbestimmung der Superoxid Dismutase von sich teilenden Zellen. Aufgrund der hohen Sensitivität ist der Test dazu geeignet, die Vitalität von dreidimensionalen Zellkulturen zu bestimmen, die aus quantitativ weniger Zellen bestehen als große Monolayer Zellkulturen.

Es existieren zahlreiche Arbeiten, die diesen Test als Messinstrument in der Zellkultur verwenden, wie z. B. Napolitano et al. (2007) oder Helen und Mitarbeiter (2007). Darüber hinaus prüften Zhou et al. (2006) die Validität des WST-1-Assays anhand der NBT-Reference Methode, einem weiteren Test zur Bestimmung der Aktivität der Superoxid Dismutase, und kamen zu streng übereinstimmenden Ergebnissen. Aus den zahlreichen in der Literatur beschriebenen Erfahrungen bezüglich des WST-1-Assays ergibt sich eine Eignung dieses Messinstruments für die in dieser Arbeit durchgeführten Dosisfindungsversuche.

4.2 Das Sphäroidmodell

Zur Untersuchung der oben genannten Fragen wählten wir für unsere Experimente Tumorsphäroide, welche aus den Glioblastomzelllinien U373 und A172 hergestellt wurden. Im Folgenden werden die Vorzüge beschrieben, welche diese dreidimensionalen Zellkulturen für die von uns durchgeführten Experimente geeignet machen.

Im Gegensatz zu einer Monolayerzellkultur stellt ein Tumorsphäroid ein dreidimensionales Tumoraggregat dar. Bei diesen in-vitro erzeugten Mikrotumoren handelt es sich um sphärisch wachsende Zellbündel, die einem Tumormodell entsprechen sollen. Diese dreidimensionalen in-vitro-Zellkulturen besitzen in experimentellen Anwendungen gegenüber Monolayerkulturen zahlreiche Vorteile. Sie entsprechen histomorphologisch, physiologisch und funktionell einem in-vivo Mikrotumor, welcher im Vergleich zu Monolayerkulturen gegenüber soliden in-vivo-Tumoren einen ähnlichen

histologischen Aufbau und ausgeprägte interzelluläre Kontakte aufweist. Sie können in ihren Zentren spontane Nekroseherde bilden (Bell et al. 2001; Nirmala et al 2001). Darüber hinaus ähnelt der Proliferationsgradient innerhalb eines Tumorsphäroids dem eines nicht zystischen in-vivo-Tumors. Es existiert ein Diffusionsgradient, bei dem das Angebot von Sauerstoff und Nährstoffen zum Sphäroidzentrum hin abnimmt und die Konzentration von CO₂ zunimmt. Hierdurch unterscheidet sich auch die Proliferationsaktivität in den unterschiedlichen Zonen des Sphäroids. Die herabgesetzte Diffusionskapazität in den zentralen Bereichen des Sphäroids bedingt einen reduzierten Stoff- und Gasaustausch und dadurch eine niedrigere Proliferationsrate. Hier kann es, vergleichbar zu den schlecht perfundierten Arealen von in-vivo-Tumoren, bis zum Arrest des Zellzyklus (G₀-Phase) und Nekrosebildung kommen (Bauer et al. 1982). Die oberflächliche Schicht hingegen zeigt eine stärkere Zellproliferation. Hieraus ergibt sich auch ihre histologische Einteilung in drei Schichten (Mueller-Klieser et al. 1987). Die äußere Schicht ist durch die großkernigen, proliferierenden Zellen charakterisiert. In der mittleren Schicht finden sich die kleineren, wenig proliferierenden und im Zellarrest befindlichen Zellen. Zentral im Tumorsphäroid findet sich bei ausreichendem Sphäroiddurchmesser ein nekrotischer Bezirk.

Im Vergleich zu Monolayerkulturen produzieren Tumorsphäroide eine ähnliche Extrazellulärmatrix wie in-vivo-Tumore (Nedermann et al. 1984). Besonders in der letztgenannten Eigenschaft sind Sphäroide einer Monolayerkultur überlegen. Darüber hinaus zeigen die Tumorsphäroide eine signifikant höhere Bildung von tumorspezifischen Antigenen als Monolayerkulturen (Mueller-Klieser et al. 1987). Insbesondere durch diese Eigenschaft scheinen Sphäroide besser für Kokulturen oder antigenbasierte Therapien von Tumoren geeignet zu sein als Monolayerkulturen.

Bereits 1957 führten Moscona und Mitarbeiter (Moscona et al. 1957) Untersuchungen an Tumoraggregaten und Gewebszellen durch um Tumorzellinvasionen zu studieren. Seither wird dieses Modell für Invasionsversuche und auch für in-vitro Therapieansätze genutzt.

4.3 Die Bedeutung der LD-50 für die Migrations- und Konfrontationsassays

Um ein Modell für weiterführende Untersuchungen zum Migrationsverhalten und zur Induktion von Immunantworten und durch PDT zu finden, wurde nach einer therapeutischen ALA-Dosierung gesucht, bei der 50-60 % (LD-50) der Zellen nach PDT noch vital sind. Dieser Überlegung liegt zu Grunde, dass für sekundäre Effekte, die durch PDT verursacht werden, die Reaktion vitaler Zellen verantwortlich ist, die durch subletale PDT-Dosen hervorgerufen wird: Dieser Effekt ist unabhängig von der direkten phototoxischen Wirkung und wird durch oxidativen Stress an nicht direkt zugrunde gegangenen Zellen hervorgerufen (Korbelik et al 1996).

Die Dosisfindungsversuche wurden mit eskalierenden ALA-Konzentrationen bei einer PDT-Dauer von 625 s und einer Dosis von 1 W durchgeführt. Der Proliferationsindex wurde mit dem WST-1 Assay gemessen. Die Kontrollgruppen waren Laserbestrahlung ohne ALA und ALA ohne Laserbestrahlung. Als LD-50 konnte dann auch im wiederholten Ansatz eine ALA-Konzentration von 12,5 µg/ml für die PDT von U373-Sphäroiden und 15 µg/ml für A172-Sphäroide festgelegt werden. Erwartungsgemäß zeigte sich in den Kontrollgruppen im WST-1 Assay, dass auch bei längeren Bestrahlungszeiten ohne den Photosensitizer 5-ALA, keine Wirkung erzielt wurde und dass bei eskalierenden ALA-Dosen bis zur doppelten Dosis von 25µg/ml ohne Laserbestrahlung das Wachstum der Gliomsphäroide beider Zelllinien nicht signifikant beeinflusst wurde.

Somit zeigte sich, dass sich die von uns gewählten ALA-Dosierungen und Bestrahlungsdosen in Kombination mit dem Sphäroidmodell für weiterführende Untersuchungen zur Induktion von Immunantworten durch die PDT eigneten.

4.4 Die photodynamische Therapie des GBM

Die photodynamische Therapie bedient sich dem Prinzip, dass ein photosensibilisierender Stoff (Photosensitizer) verabreicht wird. Der Stoff, bzw. phototoxische Metaboliten dieser Substanz, akkumulieren selektiv in Tumorzellen (Stummer et al. 2008). Durch Lichtenergie mit einer für den Photosensitizer spezifischen Wellenlänge kommt es in Gegenwart von intrazellulärem Sauerstoff zur Aktivierung des Photosensitizers und zur selektiven Schädigung der Tumorzellen. Die PDT wurde bereits bei anderen Neoplasien als dem Glioblastoma multiforme als Option in der Tumorthherapie eingesetzt (Dougherty et al. 1998). Beispielsweise findet die 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) basierte Therapie von präkanzerösen Läsionen in der Dermatologie Verwendung (Rhodes et al. 2007).

Bei der PDT des GBM bedient man sich ebenfalls der Substanz 5-ALA. Hierbei handelt es sich um eine sogenannte Prodrug. Dies bedeutet, dass dieser Stoff nach seiner systemischen Verabreichung in den Tumorzellen zu der eigentlich wirksamen Form umgewandelt wird. Hierbei handelt es sich um Protoporphyrin IX, welches durch Licht der Wellenlänge von 635 nm angeregt wird. Hierdurch kommt es zu einer Reihe von photochemischen Prozessen, intrazellulären Signalkaskaden und konsekutiv zur Schädigung der Tumorzellen. Bei der destruirenden Wirkung der PDT wird davon ausgegangen, dass primär eine Schädigung der Mitochondrien der Tumorzellen induziert wird (Linuma et al. 1994, Gaullier et al. 1995, Überriegler et al. 1995).

Physikalisch bedient sich die PDT dem Prinzip, dass die Moleküle des Photosensitizer (hier: Protoporphyrin IX) Photonen absorbieren und in einen energiereicheren, sogenannten Singulett-Zustand angeregt werden. Dieser wird auf Sauerstoffmoleküle übertragen, aus denen sog. Singulett-Sauerstoff entsteht. Der Singulett-Sauerstoff wiederum führt zur Oxidation von Zellbestandteilen. Mit weniger als 0,02 μm (Moan et al. 1991) ist der Wirkungsradius dieser Sauerstoffform als gering einzustufen. Über diesen Mechanismus werden Nekrose und Apoptose der Tumorzellen induziert. Darüber hinaus kommt es durch die 5-ALA basierte PDT zu einer Suppression

von Wachstumsfaktoren und zur Aktivierung proapoptotischer Proteasen (Karmakar et al. 2007). Es existieren Erkenntnisse darüber, dass die Mitochondrien als erstes geschädigt werden (Linuma et al. 1994, Gaullier et al. 1995, Überriegler et al. 1995). Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich bei der Apoptose um einen programmierten Zelltod, bei dem Prozesse im Zellmetabolismus ablaufen, die das Sterben der Zelle kontrolliert einleiten.

Unmittelbar nach der PDT lässt sich ein Anschwellen der mit PDT behandelten Zellen und eine Schädigung der Zellmembran verzeichnen (Zelnekov et al. 2006). Die genauen zellulären Vorgänge der PDT sind zur Zeit noch nicht ausreichend untersucht. Neben den oben beschriebenen Mechanismen werden auch immunologische und inflammatorische Abläufe diskutiert. Nach PDT kommt es zu Veränderungen der Ultrastruktur von Gliomzellen, insbesondere der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums. Die Blut-Tumorschranke wird in ihrer Funktion herabgesetzt, was die Möglichkeit aufkommen lässt, die PDT mit dem Einsatz von Chemotherapeutika zu kombinieren (Hu et al. 2007).

Zelnekov und Mitarbeiter (2006) lieferten Hinweise, dass durch PDT an Gliomzellen eine direkte Membranfragmentierung induziert wird. Die direkte zytotoxische Wirkung der mit der PDT applizierten Lichtenergie reicht jedoch nicht aus, um alle vom Tumor zentrifugal invadierenden Zellen zu erfassen, da die effektive Eindringtiefe (d_{eff}) des Lichts im Gewebe auf ca. 3 mm beschränkt ist. Aus diesen Fakten ergibt sich die Überlegung, dass die längerfristige Regression von tumorösen Läsionen durch eine inflammatorische bzw. immunologische Komponente erklärbar ist. Dies wird durch Untersuchungen an tumortragenden Ratten (SCC VII) untermauert, die zeigen, dass Vaccinen mit Tumorgewebe-inkubierten DC potenter waren, wenn das Tumorgewebe vor dem Kontakt mit den DC mit PDT behandelt wurde. Hingegen zeigte sich eine niedrigere Wirkstärke bei fehlender PDT (Korbelik et al. 2007). Darüber hinaus wurde eine signifikant größere Anzahl von aktivierten, sich degranulierenden CD8⁺ T-Lymphozyten in den entsprechend behandelten Tumoren (PDT) gemessen als in den Kontrollgruppen.

Untersuchungen zeigten, dass sich die akkumulierenden Porphyrine zur selektiven Zerstörung experimenteller Hirntumore in vivo nutzen lassen, wobei durch die alleinige Applikation der 5-Aminolävulinsäure keine nennenswerten Nebenwirkungen auftreten (Olzowy et al. 2002). Bis auf in Einzelfällen berichteten Neuropathien des fünften und siebten Hirnnervs (Varma et al. 2007) sind nach Durchführung einer PDT keine relevanten Nebenwirkungen, wie zum Beispiel eine Ödembildung, zu erwarten (Ito et al. 2004).

Stummer und Mitarbeiter führten eine Phase I/II Dosisescalationsstudie (Förderkennzeichen 70-2864 der Deutschen Krebshilfe) durch, bei der Patienten mit rezidivierenden malignen Gliomen zunächst fluoreszenzgestützt operiert wurden und anschließend ein nicht entfernbare Resttumor lokal mit Laserlicht (635 nm) bestrahlt wurde. Die Überlebenszeiten des behandelten Kollektivs waren vielversprechend (Median: 15 Monate nach photodynamischer Therapie bei rezidiviertem GBM). Schwerwiegende Nebenwirkungen konnten nicht ausgemacht werden (Publikationen in Vorbereitung).

4.5 Die inflammatorische Wirkung der PDT

Die Datenlage bezüglich der inflammatorischen und immunologischen Wirkung der PDT zu neurochirurgischen Themen, insbesondere im Zusammenhang mit dem Glioblastom, ist spärlich. Es existieren zahlreiche Arbeiten, die sich mit immunologischen Effekten nach PDT an extracerebralen Tumoren befassen. Ein Ziel dieser Arbeit ist es zu prüfen, ob sich die bekannten Mechanismen und Reaktionen auch auf die Neuroonkologie übertragen lassen. Die nachfolgenden Ausführungen aus der Literatur beziehen sich ausschließlich auf Arbeiten, welche sich mit der Photobiologie und Immunologie von nicht-neurochirurgischen Tumoren beschäftigen.

Es wird angenommen, dass die Induktion von Nekrose und Apoptose in Tumoren nach PDT zu einer systemischen Freisetzung von Zytokinen und Stress-Proteinen führt, was wiederum in eine inflammatorische und immunologische Reaktion mündet. Daraus resultiert die Einwanderung von

Immunzellen, die eine Tumorummunogenität generieren können. Es wird davon ausgegangen, dass subletale PDT-Dosen, unabhängig von der direkten phototoxischen Wirkung, eine sekundäre Reaktion durch oxidativen Stress an nicht direkt zugrunde gegangenen Zellen hervorrufen (Korbelik et al 1996).

Neben den DC scheinen auch andere Zellen an der Induktion einer tumorspezifischen Immunität beteiligt zu sein. Nach photodynamischer Therapie einer tumorösen Läsion ist eine lokale Entzündungsreaktion zu verzeichnen, welche sich zum Teil durch eine rapide Infiltration von neutrophilen Granulozyten charakterisieren lässt. Im Tierexperiment zeigte sich, dass immundefiziente Tiere, die keine, oder lediglich defekte Neutrophile Granulozyten besaßen und folglich keine Infiltration eines Tumors zeigten, eine schwächere CD8+ Tumor-Immunität ausbildeten (Kousis et al. 2007). Hingegen scheinen CD4+ T-Lymphozyten eine untergeordnete bis gar keine Rolle zu spielen (Kabingu et al. 2007).

Bisher wurde davon ausgegangen, dass die oben genannten sekundären Effekte durch Ischämie, bedingt durch eine Störung der Mikrozirkulation des Tumors, verursacht werden. Es existieren aber mittlerweile Erkenntnisse, dass dafür eine antitumoröse Entzündungsreaktion und eine tumorspezifische Immunreaktion verantwortlich gemacht werden können (Gomer CJ et al 2002).

Zellen, die eine subletale PDT-Dosis überleben, sind durch die Exprimierung von Stressproteinen, Aktivierung von Apoptose-regulierenden Genen und durch Hochregulierung von Zytokinen und Akut-Phase-Proteinen für die inflammatorische Reaktion verantwortlich (Cuenco et al 1997).

Zu den proinflammatorisch wirkenden Mediatoren gehören vasoaktive Substanzen, Heat-Shock-Proteine, Proteinase, Wachstumsfaktoren sowie Zytokine und Interleukine wie IL-1 β , IL-2, IL-6 Tumor-necrosis-factor- α und granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (De Vree et al 1997; Gollnick et al 2003).

Nach PDT an der Tumorzelllinie SCCVII (squamous cell carcinoma cells) kommt es zum signifikanten Anstieg von den Heat Shock Proteinen HSP 70, aber auch HSP 60 und GRP 94 (glucose regulator protein 94) (Korbelik et al. 2005). Heat-Shock-Proteine (HSP) sind vor allem an der Regulierung von

inflammatorischen und immunologischen Reaktionen beteiligt. HSP werden aufgrund vieler zahlreicher Noxen (z.B.: Infektionen und Hitze) exprimiert. Korbelik konnte nachweisen, dass nach PDT die Expression von HSP an der Zelloberfläche durch eine Verlagerung dieser Proteine von intra- nach extrazellulär gesteigert wird. Dendritische Zellen, Makrophagen, CD8+T-Lymphozyten und B-Zellen besitzen spezifische Rezeptoren für HSP. So kann es über die verstärkte Expression der HSP an der Oberfläche der noch vitalen Tumorzellen zu einer direkten Stimulation der oben genannten Immunzellen kommen (Multhoff et al 2001).

4.6 Migrationsversuche

Die in dieser Arbeit gezeigte Migrationshemmung der Gliomzellen nach PDT deckt sich mit einer Arbeit von Au et al. (2006), welche an humanen Gliomzellen der Linien U87 und GBM6840 jeweils eine signifikante Reduktion der Migration nach PDT mit den Photosensitizern Photofrin, 5-Aminolävulinsäure und Calphostin C zeigten. Möglicherweise ist die Reduktion des invasiven Verhaltens im Matrigel-Invasions-Assay auf eine verminderte Expression von MMP-2 and MMP-9 (matrix metalloproteinase -2 und -9) zurückzuführen (Au et al. 2006).

Über ähnliche Ergebnisse berichteten Jiang und Mitarbeiter bereits 2003 bei der Photofrin-basierten PDT in Kombination mit Buthionine Sulfoximine (BSO), an den Glioblastomlinien U87 und U251n. BSO ist eine Substanz, die zelluläre Glutathionkonzentration vermindert und so möglicherweise zu einem erhöhten oxidativen Stress führt.

Darüber hinaus konnte in in-vitro Experimenten eine PDT-induzierte Inhibition der invadierenden Tumorzellen in Kollagen-Matrix-Assays gezeigt werden. Diese Migrationshemmung ging über die durch die Zytotoxizität der PDT erzielte Inhibition der migrierenden Zellen hinaus (Hirschberg et al. 2006).

In unseren Experimenten hingegen wurden Gliomzellen der Zelllinien U373 und A172 auf unbeschichteten Zellkulturplatten verwendet. Als Photosensitizer kam

allein 5-ALA zum Einsatz. In unserem Setting ist daher eher eine Aussage über das Migrationsverhalten nach PDT als über das invasive Verhalten der Tumorzellen zu treffen.

Die oben beschriebenen Ergebnisse (Au et al. 2006; Hirschberg et al. 2006) decken sich mit den in dieser Arbeit durchgeführten Migrationsexperimenten, bei denen nach vier und 14 Tagen nach PDT eine absolute Migrationshemmung zu verzeichnen war, die Zellproliferation aber noch 50-60 % betrug. Von Interesse ist dabei, ob die Migrationshemmung dauerhaft anhält und in wie weit diese Ergebnisse auf in-vivo-Verhältnisse übertragbar sind.

Momentan existieren zu dieser Fragestellung keinerlei Daten. Es lässt sich die Vermutung äußern, dass der antitumoröse Effekt (und die damit prognostisch günstige Wirkung) der PDT nicht nur durch direkte Zytotoxizität, indirekte immunologische Mechanismen, sondern auch durch eine Inhibition der invasiv wachsenden Zellen zustande kommt. Ein in unseren Experimenten beobachteter Nebeneffekt war, dass die alleinige Anwendung von 5-ALA (ohne Bestrahlung) zu einer, wenn auch geringen Migrationshemmung führte. Eine Erklärung für dieses Phänomen lies sich auch nach eingehender Literaturrecherche nicht eruieren. Der migrationshemmende Effekt bei alleiniger ALA-Gabe (ohne Bestrahlung) korrelierte sowohl bei den U373-Sphäroiden, als auch bei den U373-Einzelzellen nicht mit einer gesteigerten Tumormaterialaufnahme bei gleicher Behandlung in den Konfrontationsassays mit DC. Als weiteren Effekt zeigten die Tumorsphäroide beider Zelllinien nach PDT-Behandlung ein initiales Anschwellen und eine konsekutive Verkleinerung bis nahezu auf den Ursprungdurchmesser. Dieses Verhalten wurde bereits von Zelenkov et al. (2007) beschrieben.

4.7 DC, PDT und Tumormunität

Neben der Migrationshemmung durch PDT ist eine PDT-induzierte Immunogenität der GBM-Zellen aufgrund der Ergebnisse der von uns durchgeführten Konfrontationsassays wahrscheinlich:

An Tumorsphäroiden der Zelllinie U373 wurde eine 5-ALA-basierte PDT mit einer Dosis, entsprechend einer LD-50, durchgeführt. Die Sphäroide wurden mit CFDA-SE, einem Fluoreszenzfarbstoff, markiert und mit unreifen DC kokultiviert. Die DC wurden mit PE-konjugierten anti-HLA-DR-Antikörpern gefärbt, um sie von den Tumorzellen unterscheiden zu können (U373-Zellen wurden nicht angefärbt). Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Antigenaufnahme durch DC bei Sphäroiden der Behandlungsgruppe (Kombination aus ALA und Bestrahlung) im Vergleich zur Kontrollgruppe (+ALA / +R vs. -ALA / -R: $p=0,037$). Die alleinige Bestrahlung oder alleinige Gabe von ALA führten zu keiner signifikant erhöhten Antigenaufnahme durch DC. Die Antigenaufnahme in der Behandlungsgruppe (+ALA / +R) im Vergleich zu den Gruppen +ALA / -R und -ALA / +R war zwar um fast das fünffache gesteigert, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Dieses Phänomen ist höchst wahrscheinlich auf die niedrige Fallzahl ($n=3$) zurückzuführen.

Die Konfrontationsassays wurden zusätzlich mit U373-Einzelzellen praktiziert. Die Tumorantigenaufnahme bei der Behandlungsgruppe (+ALA / +R) war im Vergleich zu den übrigen drei Gruppen (-ALA / -R; +ALA / -R; -ALA / +R) zwar nicht signifikant erhöht, es zeigte sich jedoch ein deutlicher Trend (Steigerung um den Faktor ca. 1,5). Auch hierbei lässt sich das Fehlen der statistischen Signifikanz vermutlich auf die niedrige Fallzahl zurückführen.

Der Unterschied zwischen der wesentlich stärker ausgeprägten Antigenaufnahme bei den Experimenten mit Tumorsphäroiden (signifikante Antigenaufnahmesteigerung) im Gegensatz zu den nicht signifikanten Ergebnissen bei den U373-Einzelzellen lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass Tumorsphäroide im Vergleich zu Monolayerkulturen eine ähnliche Extrazellulärmatrix wie in-vivo-Tumore produzieren (Nedermann et al. 1984). In dieser Eigenschaft sind Sphäroide Monolayerkulturen, aus denen die von uns verwendeten Einzelzellen stammten, überlegen. Tumorsphäroide zeigen eine signifikant höhere Bildung von tumorspezifischen Antigenen als Monolayerkulturen (Mueller-Klieser et al. 1987). Ebenfalls könnte der innerhalb von Sphäroiden bestehende Diffusionsgradient mit zentralen hyperkapnischen

und hypoxischen Bereichen für einen stärkeren antigenen Effekt nach PDT verantwortlich sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit den von uns durchgeführten Konfrontationsassays ein erster Hinweis dafür erbracht werden konnte, dass die 5-ALA-basierte PDT die DC-vermittelte Immunogenität von Glioblastomen verstärkt.

Als Initiatorzellen der afferenten Phase der zellulären antitumorösen Antwort sind DC in der Lage aufgrund von aktivierenden Signalen durch die Blut-Hirn-Schranke transendothelial zu migrieren und dort Antigene aufzunehmen (Zozulya et al 2009).

Zu diesen Signalen gehören Ischämie, Infektionen (Winzler et al. 1997; Feldman et al. 1994), thermische Schädigung und Zytokine wie IL-1, GM-CSF und TNF-alpha (Koide et al., 1987; Kolenik et al., 1990; Josien et al., 1999). Hierdurch kommt es zur Aktivierung der DC und konsekutiv zu einer Zunahme der Fähigkeit, Antigene aufzunehmen und zu präsentieren. In unseren Experimenten führte vermutlich die Kombination aus ALA-Inkubation und Laserbestrahlung zur Signalinduktion der Gliomzellen, welche wiederum die Antigenität der Tumorzellen verstärkte bzw eine Aktivierung der DC bewirkte.

Nach Aktivierung migrieren die DC in-vivo aus dem peripheren Gewebe über die Lymphbahnen in die regionären und lokalen Lymphknoten, wo sie entweder in die T-Zell-Region oder die B-Zell-Follikel der Lymphknoten gelangen und dort B- und T-Lymphozyten durch Zytokine stimulieren (Adema et al., 1997). Die Ausreifung der DC induziert die Expression von Chemokinrezeptoren und Zytokinen und eine Immunantwort (Bancereau J. et al. 2000).

Es wird angenommen, dass die Induktion von Nekrose und Apoptose in Tumoren nach PDT zu einer systemischen Freisetzung von Zytokinen und Stress-Proteinen führt. Dies wiederum mündet in eine inflammatorische und immunologische Reaktion. Daraus resultiert die Einwanderung von Immunzellen, die eine Tumorummunogenität generieren können. Es wird davon ausgegangen, dass subletale PDT-Dosen, unabhängig von der direkten phototoxischen Wirkung, eine sekundäre Reaktion durch oxidativen Stress an nicht direkt zugrunde gegangenen Zellen hervorrufen (Korbelik et al 1996).

Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass Zelllysate aus PDT-behandeltem Tumormaterial (Murine Mamma-Ca Zelllinie) eine Aktivierung von DC und konsekutiv der zellulären Immunität gegen EMT6 Tumore initiierten (Gollnick et al. 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch Zelllysate aus PDT-behandeltem Tumorgewebe eine stärkere IL-12 Bildung durch DC hervorgerufen wurde, als es durch Lysate von UV- oder Infrarot-bestrahltem Tumormaterial der Fall war. IL-12 wird ein bedeutender Effekt in der antitumorösen Immuntherapie von Tumoren zugeschrieben (Golab et al. 1999). Möglicherweise liegt der Grund für die erhöhte Bildung von IL-12 nach PDT darin, dass UV-Bestrahlung nur Apoptose und Infrarotbestrahlung nur Nekrose induziert. Durch die photodynamische Therapie werden aber beide Phänomene hervorgerufen. Vermutlicherweise wird für eine DC-Aktivierung eine Kombination aus Apoptose und Nekrose benötigt (Jalili et al. 2004).

Es konnte an in-vitro-Experimenten gezeigt werden, dass Überstände von PDT-behandelten murinen Kolonkarzinomen DC stimulierten und eine signifikante Zunahme der Expressierung von IL-12 induzierten (Jalili et al. 2004). Am in-vivo Tiermodell injizierten Jalili und Mitarbeiter (2004) Mäusen unreife DC nach PDT von Kolonkarzinomen intratumoral. Nach Aktivierung und Ausreifung der DC kam es zur Bekämpfung eines kontralateralen Tumors durch zytotoxische T-Lymphozyten.

In immundefizienten SCID-Mäusen zeigte sich eine niedrigere Wirksamkeit der PDT als in immunkompetenten Tieren (Korbelik et al. 1996), wobei sich diese Wirkung durch Immunadjuvantien noch steigern ließ (Chen et al 2005).

Der im Tierexperiment gezeigte Vorteil der Kombination aus PDT und DC-Vakzinierung könnte auch bei Gliomen eine signifikante Wirkung auf die Prognose haben. Die Generierung von Vakzinen gegen Gliomzellen durch PDT-Zelllysate ist eine weitere Möglichkeit den additiven Effekt von PDT und Immunsystem zu nutzen.

Hinweise darauf, dass es sich um eine spezielle, adaptive Immunantwort handelt, erbrachten Gollnick et al (2002), indem sie zeigten, dass in Mäusen, die mit PDT-generiertem EMT6 und P815 Zelllysate vakziniert wurden, das

Wachstum der entsprechenden Tumore inhibierend beeinflusst wurde, aber sich das Wachstum von Colon-26-Tumoren nicht herabsetzte.

Von großem Interesse in Zukunft wird sein, wie groß der Vorteil der Kombination aus PDT und DC-Vakzinierung in der Anwendung am malignen Gliom des Menschen sein wird. Beim kolorektalen Karzinom existieren beispielsweise vielversprechende tierexperimentelle Daten, die einen systemischen antitumoralen Effekt durch Vakzinierung zeigen (Saji et al. 2006). Die im Tierexperiment gezeigte Überlegenheit der DC-Vakzinen von PDT-behandeltem Tumormaterial eröffnet die attraktive Möglichkeit patientenindividuelle PDT-Vakzinen direkt aus Tumorresektat zu generieren (Korbelik et al. 2007).

5 Zusammenfassung

Aufgrund der prognostisch relevanten Wirkung der PDT bei Patienten mit GBM ist die Induktion einer Immunreaktion gegen die invasiven Gliomzellen fernab des Primärtumors anzunehmen. Eine immunogene Wirkung mit Induktion einer antitumorösen Immunantwort durch die PDT von extrakraniellen Tumoren ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. In dieser Arbeit galt es zu prüfen, ob sich die bekannten Mechanismen und Reaktionen auch auf die Neuroonkologie übertragen lassen.

Mit einer im neurochirurgischen Forschungslabor der Universität Düsseldorf entwickelten Bestrahlungsvorrichtung für 96-Well-Mikrotiterplatten wurde an Tumorsphäroiden von humanen U373- und A172-Gliomen die 5-ALA-basierte PDT mit Laserlicht der Wellenlänge von 635 nm durchgeführt, um die bereits an Einzelzellsuspensionen beschriebene Wirkung auch am Sphäroidmodell nachvollziehen zu können.

Um eine therapeutische ALA-Dosis für die PDT von Sphäroiden zu bestimmen, wurden Dosisfindungsversuche mit eskalierenden ALA-Konzentrationen durchgeführt. Der Vitalitätsindex wurde mit dem WST-1-Zellvitalitätsassay gemessen. Als Zielwert wurde die ALA-Konzentration angestrebt, nach welcher 50-60 % der Zellen noch vital sind (LD-50). Erwartungsgemäß zeigte sich in den Kontrollgruppen im WST-1-Assay, dass auch bei längeren Bestrahlungszeiten ohne den Photosensitizer 5-ALA, keine vitalitätsmindernde Wirkung erzielt wird. Die alleinige Inkubation der Gliomzellen mit eskalierenden ALA-Konzentrationen zeigte lediglich eine leichte, nicht signifikante Einschränkung des Migrationsverhaltens.

In den Migrationsassays konnte nachgewiesen werden, dass durch PDT mit der LD-50 an U373- und A172-Sphäroiden die Migration im Vergleich zu den Kontrollgruppen (ohne ALA, mit Bestrahlung; mit ALA, ohne Bestrahlung; ohne ALA, ohne Bestrahlung) signifikant inhibiert wird. Der in-vitro beobachtete Migrationsarrest hielt im gesamten Beobachtungszeitraum von 14 Tagen an.

In Kokulturen und Konfrontationsassays von PDT-behandelten U373- Gliomsphäroiden und DC wurde untersucht, ob eine Endozytose von Tumorbestandteilen durch DC stattfindet und in welchem Maße sich diese durch PDT im Vergleich zu den Kontrollgruppen steigern lässt. Hierbei zeigte sich, dass nur die PDT-Behandlung (Kombination aus ALA und Bestrahlung) zu einer signifikant gesteigerten Aufnahme von Tumormaterial von U373-Sphäroiden durch die DC führte. Bei PDT-behandelten U373-Einzellen war dieser Unterschied nicht signifikant. Hingegen zeigte die alleinige Bestrahlung oder ALA-Inkubation kaum einen Effekt im Vergleich zu komplett unbehandelten Sphäroiden (kein ALA / keine PDT). Hiermit konnte ein erster Hinweis dafür erbracht werden, dass die 5-ALA-basierte PDT die Immunogenität von Glioblastomen verstärkt und zu einer effektiveren Antigenaufnahme durch dendritische Zellen führt. Diese ersten Hinweise auf eine Immunogenität durch PDT sollten in weitergehenden Arbeiten untersucht werden. Hier ist vor allem die afferente Phase (Antigenaufnahme, Migration und Ausreifung der DC) der zellulären Tumormunität zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

ADEMA GJ, HARTGERS F, VERSTRATEN R, DE VRIES E, MARLAND G, MENON S, FOSTER J, XU Y, NOOYEN P, MCCLANAHAN T, BACON KB, FIGDOR CG. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*. 1997 Jun 12;387(6634):713-7.

AU CM, LUK SK, JACKSON CJ, NG HK, YOW CM, TO SS Differential effects of photofrin, 5-aminolevulinic acid and calphostin C on glioma cells. *J Photochem Photobiol B*. 2006 Nov 1;85(2):92-101.

AZIZ TZ, STODDARD M, Cerebellar glioblastoma multiforme; a report of two cases and review of the literature, *West Eng. Med. J*. 1990; 105(2), 39-42.

BANCEREAU J, BRIERE F, CAUX C., DAVOUST J, LEBECQUE S ET AL, Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000 18: 767-811.

BAO S, WU Q, MCLENDON RE, HAO Y, SHI Q, HJELMELAND AB, DEWHIRST MW, BIGNER DD, RICH JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006 Dec 7;444(7120):756-60.

BAO S, WU Q, MCLENDON RE, HAO Y, SHI Q, HJELMELAND AB, DEWHIRST MW, BIGNER D.D. RICH J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006, Vol 444: 756-760.

BAUER K D, KENG P, SUTHERLAND RM. Isolation of quiescent cells from multicellular tumor spheroids using centrifugal elutriation. *Cancer Res* 1982 Jan; 42(1): 72-78.

BECK TJ, KRETH FW, BEYER W, MEHRKENS JH, OBERMEIER A, STEPP H, STUMMER W, BAUMGARTNER R. Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg Med*. 2007 Jun;39(5):386-93.

BELL HS, WHITTLE IR, WALKER M, LEAVER HA, WHARTON SB. The development of necrosis and apoptosis in glioma: experimental findings using spheroid culture systems. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2001 27:291-304.

BROWN PD, BALLMAN KV, RUMMANS TA, MAURER MJ, SLOAN JA, BOEVE BF, GUPTA L, Tang-WAI DF, ARUSELL RM, Clark MM, Buckner JC A prospective study of quality of life in adults with newly diagnosed high-grade gliomas : The Impact of the extent of resection on quality of life and survival. *Neurosurgery* 2005 57:495-504.

BURGER P C, CAVENEE W K The WHO Classification of tumores of the nervous system.

CASTEL JC, CAILLE JM: linaging of irradiated brain tumours. Value of magnetic resonance imaging. *JNeuroradial* 1989; 1 6:81-132.

CHEN Y J., WURTZ T, WANG C J, KUO Y R, YANG K D, HUANG H C, WANG F. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J Orthop Res* 2004 22: 526-534.

CHORAZY-MASSALSKA M, RADZIKOWSKA A, MASLINSKI W, BIALY L, SIENKO J, SIERON A, ADAMEK M, BASAK G, MROZ P, KRASNODEBSKI IW, JAKOBISIAK M, AND GOLAB J (2004). Effective photoimmunotherapy of murine colon carcinoma induced by the combination of photodynamic therapy and dendritic cells. *Clin. Cancer Res.* 10, 4498-4508.

COMBS SE, WAGNER J, BISCHOF M, WELZEL T, WAGNER F, DEBUS J, SCHULZ-ERTNER D. Postoperative Treatment of Primary Glioblastoma Multiforme with Radiation and Concomitant Temozolomide in Elderly Patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008 Mar 15;70(4):987-92.

CUENCO GM, KNISELY TL. Induction of glucose regelatory proteins in tumor cells after treatment with a benzophenothiazine analogue. *Photochem Photobiol B* 1997; 65:19S.

DAVIS, L.D., SCHWARTZ, J., Trends in cancer mortality: US white males and females, *Lancet*, 1988 1, 633-6.

DE VLEESCHOUWER S, RAPP M, SORG RV, STEIGER HJ, STUMMER W, VAN GOOL S, SABEL M. Dendritic cell vaccination in patients with malignant gliomas: current status and future directions. *Neurosurgery* 2006;59:988-1000.

DE VREE. Role of interleukin-1 and granulocyte colony-stimulating factor in photofrin-based photodynamic therapy of rat rhabdomyosarcoma tumors. *Cancer Res* 1997;57:2555-8.

Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 1984 Jul;44(7):3090-7.

DUBESSY C, MERLIN JM, MARCHAL C, GUILLEMIN F. Spheroids in radiology and photodynamic therapy. *Critical Reviews in Oncology Hematology* 2000 36:179-192.

ESTELLER M, GARCIA-FONCILLAS J, ANDION E, GOODMAN SN, HIDALGO F, VANACLOCHA V, BALIN SB, HERMAN JG. Inactivation of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *NEngl JMed* 2000;343:1350-1354.

FELDMAN SB, FERRARO M, ZHENG HM, PATEL N, GOULD-FOGERTI S, FITZGERALD-BOCARSLY P. Viral induction of low frequency interferon-alpha producing cells. *Virology.* 1994 Oct;204(1):1-7.

FINE HA, DEAR KB, LOEFFLER JS, BLACK PM, CANELLOS GP. Meta Analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 1993; 71:2585-2597.

FORSYTH P.A, POSNER J.B. Headaches in Patients with brain tumors, a study of 1 1 1 Patients *Neurology* 1993;43:1678-1683.

FRIEDMANN HS, ALBRIGHT R, OLSON J, CHANG SM, LEVIN, V. A et al Multicenter phase 11 trial of temozolomide in patient with anaplastic astrocytoma. *J Clin Oncology* 1999; 17:3693.

GAULLIER JM, GEZE M, SANTUS R, SA E MELO T, MAZIERE JC, BAZIN M, MRLIERE P, DUBERTERT L. Subcellular localization of and photosensitization by protoporphyrin IX in human keratinocytes and fibroblast cultivated with 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol.* 1995 Jul;62(1):114-22.

GIESE A, WESTPHAL M. Treatment of malignant glioma: a problem beyond the margins of resection, *J Cancer Res Clin Oncol* 200 1; 127: 217-225.

Glioma Meta-Analysis Trialists Group: Chemotherapy in adult highgrade glioma: A systemic review and meta -analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 2002; 1011-1018.

GOLAB J, ZAGOZDZON R. Antitumor effects of interleukin-12 in pre-clinical and early clinical studies [Review]. *Int J Mol Med* 1999;3:537-44.

GOLLNICK SO, VAUGHAN L, HENDERSON BW. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Res* 2002. 62:1604-1608.

GOLLNICK SO. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer* 2003;88:1772-9.

GOMER CJ, FERRARIO A, LUNA M, RUCKER N, WONG S. Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment. *Lasers Surg Med.* 2006 Jun;38(5):516-21.

GOMER CJ: Cellular targets and molecular responses associated with photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg* 1996;14:315-21.

LANFERMANN H, HERMINGHAUS S, PILATUS U, RAAB P, WAGNER S, ZANELLA FE. Grundlagen der 1H-MR-Spektroskopie intrakranieller Tumoren.

HEGI ME, DISERENS AC, GORLIA T, HAMOU MF, DE TRIBOLET N, WELLER M, KROS JM, HAINFELLNER JA, MASON W, MARIANI L, BROMBERG JE, HAU P, MIRIMANOFF RO, CAIRNCROSS JG, JANZER RC, STUPP R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):997-1003.

HELEN W, MERRY CL, BLAKER JJ, GOUGH JE. Three-dimensional culture of annulus fibrosus cells within PDLLA/Bioglass composite foam scaffolds: assessment of cell attachment, proliferation and extracellular matrix production. *Biomaterials.* 2007; 28(11):2010-20.

HESS K.R. Extent of resection as prognostic variable. *JNeurooncology* 1999; 42:227-231
HIRSCHBERG H, SUN CH, KRASIEVA T, MADSEN SJ. Effects of ALA-mediated photodynamic therapy on the invasiveness of human glioma cells. *Lasers Surg Med.* 2006;38(10):939-45.

HU SS, CHENG HB, ZHENG YR, ZHANG RY, YUE W, ZHANG H. Effects of photodynamic therapy on the ultrastructure of glioma cells. *Biomed Environ Sci.* 2007 Aug;20(4):269-73.

IINUMA S, FARHI SS, ORTEL B, HASSAN T. A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. *Br J Cancer* 70:21-28, 1994.

INABA K, INABA M, NAITO M, STEINMANN RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 479.

ITO S, RACHINGER W, STEPP H, REULEN HJ, STUMMER W. Oedema formation in experimental photo-irradiation therapy of brain tumours using 5-ALA. *Acta Neurochir (Wien)*. 2005;147(1):57-65; discussion 65.

JALILI A, MAKOWSKI M, SWITAJ T, NOWIS D, WILCZYNSKI GM, WILCZEK E, CHORAZY-MASSALSKA M, RADZIKOWSKA A, MASLINSKI W, BIAŁY L, SIENKO J, SIERON A, ADAMEK M, BASAK G, MRÓZ P, KRASNODEBSKI IW, JAKÓBISIAK M, GOŁAB J. Effective photodynamic therapy of murine colon carcinoma induced by the combination of photodynamic therapy and dendritic cells. *Clin Cancer Res.* 2004 Jul 1;10(13):4498-508.

JANSEN EP, DEWIT LG, VAN HERK M, BARTELINK H. Target volumes in Radiotherapy for highgrade malignant gliomas of the brain. *Radiother. Oncol.* 2000 56, 151-156.

JIANG F, ROBIN AM, KATAKOWSKI M, TONG L, ESPIRITU M, SINGH G, CHOPP M. Photodynamic therapy with photofrin in combination with Buthionine Sulfoximine (BSO) of human glioma in the nude rat. *Lasers Med Sci.* 2003;18(3):128-33.

JIANG W, SWIGGARD WJ, HEUFLER C, PENG M, MIRZA A, STEINMANN R M, NUSSENZWEIG MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* 1995 May 11;375(6527):151-5.

JOSIEN R, WONG B R, LI H L, STEINMAN R M, CHOI Y. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J. Immunol.* 1999 162:2562.

JUBELIRER, S.J., A review of the treatment and survival rates of 138 patients with glioblastoma multiforme, *West Virginia Med. J.* 1996; 92, 186-90.

KABINGU E, VAUGHAN L, OWCZARCZAK B, RAMSEY KD, GOLLNICK SO. CD8+ T cell-mediated control of distant tumours following local photodynamic therapy is independent of CD4+ T cells and dependent on natural killer cells. *Br J Cancer*. 2007 18;96(12):1839-48.

KALLIO M, SANKILA R, JÄÄSKELÄINEN J, KARJALAINEN S, HAKULINEN T. A population-based study on the incidence and survival rates of 3857 glioma patients diagnosed from 1953 to 1984. *Cancer*. 1991 15;68(6):1394-400.

KARMAKAR S, BANIK NL, PATEL SJ, RAY SK. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells. *Neurosci Lett*. 2007 Mar 30;415(3):242-7.

KLEIHUES P, LOUIS DN, SCHEITHAUER BW, RORKE LB, REIFENBERGER G, BURGER PC, CAVENEE WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002 ;61(3):215-25; discussion 226-9.

KLEIHUES P, LÜBBE J, WATANABE K, VON AMMON K, OHGAKI H. Genetic alterations associated with glioma progression, *Verh. Dtsch. Ges. Path. Klein Neuroradiol* 1994; 78, 43-7
Klein Neuroradiol 2002; 12:1-17.

KNUECHEL R, KENG P, HOFSTAEDTER F, LANGMUIR V, SUTHERLAND RM, PENNEY DP. Differentiation patterns in two- and three-dimensional culture systems of human squamous carcinoma cell lines. *Am J Pathol*. 1990 Sep;137(3):725-36.

KOIDE S. L., INABA K. UND STEINMANN R. M. Interleukin 1 enhances T-dependent immune response by amplifying the function of dendritic cells. *J. Exp. Med*. 1987 165:515.

KOLENIK S., DING T. G. UND LONGLEY J. Granulocyte macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) decreases CD1a expression by human Langerhans cells and increases proliferation in the mixed epidermal cell-lymphocyte reaction (MELR). *J. Invest. Dermatol*. 1990 95:359.

KORBELIK M, KROSL G, KROSL J, DOUGHERTY GJ. The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. *Cancer Res*. 1996 Dec 15;56(24):5647-52.

KORBELIK M, STOTT B, SUN J. Photodynamic therapy-generated vaccines: relevance of tumour cell death expression. *Br J Cancer*. 2007 Nov 19;97(10):1381-7.

KORBELIK M, SUN J, CECIC I. Photodynamic therapy-induced cell surface expression and release of heat shock proteins: relevance for tumor response. *Cancer Res.* 2005 1;65(3):1018-26.

KORBELIK M, SUN J. Photodynamic therapy-generated vaccine for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 55(8):900-9.

KORBELIK M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg* 1996; 14:329-34.

KOUSIS PC, HENDERSON BW, MAIER PG, GOLLNICK SO. Photodynamic therapy enhancement of antitumor immunity is regulated by neutrophils. *Cancer Res.* 2007Nov1;67(21):10501-10.

KUNZ-SCHUGHART LA, FREYER JP, HOFSTAEDTER F, EBNER R. L et al: The use of 3D-Cultures for throughput screening: The multizellular Spheroid Modell. *JBiomol Scr* 2004, 273-285.

LASSALLE HP, BAUMANN H, STRAUSS WS, SCHNECKENBURGER H. Cell-substrate topology upon ALA-PDT using variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy (VA-TIRFM). *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2007;26(2):83-8.

LUCENARDE C, DE MELLO RJ, LESSA JR JR, CAVALCANTE GM, RIBEIRO M. Clinical topographic findings in glioblastoma multiforme and the relation with motor impairment. *Arg Neuropsiquiatr.* 2006 Jun;64(2B):441-5.

MAHALEY, MS, METTLIN C, NATARAJAN N, LAWS ER, PEACE BB, National survey of patterns of care for brain-tumor-patients, *J. Neurosurg.* 1989; 71, 826-36

MAIURI F, BENVENUTI, D., GANGEMI, M., CORRIERO, G., GIAMUNDO, A., DE CHIARA, A., Spinal subarachnoidal metastasis from primary intracranial gliomas. *Act Neurologica* 1980; 35: 399-405.

MESSMANN H, GEISLER M, GROSS U, ABELS C, SZEIMIES RM, STEINBACH P, KNÜCHEL R, DOSS M, SCHÖLMERICH J, HOLSTEGE A. Influence of a haematoporphyrin

derivative on the protoporphyrin IX synthesis and photodynamic effect after 5-aminolaevulinic acid sensitization in human colon carcinoma cells. *Br J Cancer*. 1997;76(7):878-83.

MOAN J, BERK. The photodegeneration of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singulaet oxygen. *Photochem Photobiol* 1991;53:549-53.

MOLL H, FUCHS H, BLANK C, ROLLINGHOFF M. Langerhans cells transport Leishmania major from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T-cells. *Eur. J. Immunol*. 1993; 23(7):1595-601.

MOSCONA JE. The development in vitro of chimeric Aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. *Proc Natl Acad Sci* 1957; 43:184-194.

MUELLER-KLIESER W, VAUPEL P. Improvement of tumor spheroid oxygenation by tetrachlorodecaoxide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1987 Jan;13(1):49-54.

MUELLER-KLIESER W, VAUPEL P. Tetrachlorodecaoxide improves the oxygenation status of multicellular tumor spheroids. *Adv Exp Med Biol*. 1986;200:623-32.

MUELLER-KLIESER W. Mutlicellular spheroids. A review on cellular Aggregates in cancer research. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987, 113: 101-122.

MULTHOFF G, PFISTER K, GEHRMANN M, ET AL. A 14-mer Hsp70 peptide stimulates NK cell activity. *Cell Stress Chaperones* 2001;6:337-74.

NABAVI A, THURM H, ZOUNTSAS B, PIETSCH T, LANFERMANN H, PICHLMEIER U, MEHDORN M. Five-aminolevulinic acid for fluorescence-guided resection of recurrent malignant gliomas: a phase ii study. *Neurosurgery*. 2009 Dec;65(6):1070-6; discussion 1076-7.

NAPOLITANO AP, DEAN DM, MAN AJ, YOUSSEF J, HO DN, RAGO AP, LECH MP, MORGAN JR. Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels. *Biotechniques*. 2007 Oct;43(4):494, 496-500.

NAYAK JV, HOKEY DA, LARREGINA A, HE Y, SALTER RD, WATKINS SC, FALO LD JR. Phagocytosis induces lysosome remodeling and regulated presentation of particulate antigens by activated dendritic cells. *J Immunol*.2006 Dec 15;177(12):8493-503.

NEDERMAN T, ACKER H, CARLSSON J. Penetration of substances into tumor tissue: a methodological study with microelectrodes and cellular spheroids. *In Vitro*. 1983; 19(6):479-88.

NEDERMAN T, NORLING B, GLIMELIUS B, CARLSSON J, BRUNK U. Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*. 1984 Jul;44(7):3090-7.

NEDERMAN T, TWENTYMAN P. Spheroids for studies of drug effects. *Recent Results Cancer Res*. 1984;95:84-102.

NIRMALA C, RAO JS, RUIFROK AC, LANGFORD LA, OBEYESEKERE M. Growth characteristics of glioblastoma spheroids. *International Journal of Oncology* 2001 19:1109-1115.

NOODT BB, BERG K, STOKKE T, PENG Q, NESLAND JM. Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protoporphyrin IX. *Br J Cancer*. 1996 Jul;74(1):22-9.

OKADA T, OZAWA K. Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy. *Front Biosci*. 2008 1;13:1887-91.

OLZOWY B, HUNDT CS, STOCKER S, BISE K, REULEN HJ, STUMMER W. Photoirradiation therapy of experimental malignant glioma with 5-aminolevulinic acid. *J Neurosurg*. 2002; 97(4):970-6.

PARK I, LARSON PE, ZIERHUT ML, HU S, BOK R, OZAWA T, KURHANEWICZ J, VIGNERON DB, VANDENBERG SR, JAMES CD, NELSON SJ. Hyperpolarized ¹³C magnetic resonance metabolic imaging: application to brain tumors. *Neuro Oncol*. 2010 Feb;12(2):133-44.

PASQUIER B, PASQUIER D, GOLET A, PANH MH, COUDERC P. Extraneural metastases of astrocytomas and glioblastomas. *Cancer* 1980; 45: 112-125.

RADHAKRISHNAN K, MOKRI B, PARISI JE, O'FALLON WM, SUNKU J, KURLAND LT. Trends in incidence of primary brain tumors. *Ann Neurol* 1995;37:67-73.

RAINOV NG, SÖHLING A, HEIDECKE V. Novel therapies for malignant gliomas: a local affair? *Neurosurg Focus* 2006; 20 1-13.

RHODES LE, DE RIE MA, LEIFSDOTTIR R, YU RC, BACHMANN I, GOULDEN V, WONG GA, RICHARD MA, ANSTEY A, WOLF P. Five-year follow-up of a randomized, prospective trial of topical methy aminolevulinic photodynamic therapy vs surgery for nodular basal cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 2007 143(9):1131-6.

SAJI H, SONG W, NAKAMURA H, SAIJO T, HOSAKA M, HAGIWARA M, OGATA A, KAWASAKI N, ENGLEMAN EG, KATO H. A possibility of overcoming local tumor immune tolerance by radiofrequency ablation in combination with intratumoral injection of naïve dendritic cell. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2006; 33(12):1736-8.

SALLUSTO F, CELLA M, DANIELI C, LANZAVECCHIA A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 1995 Aug 1;182(2):389-400.

SALLUSTO F, SCHAERLI P, LOETSCHER P, SCHANIEL C, LENIG D, MACKAY CR, QIN S, LANZAVECCHIA A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 1998 Sep;28(9):2760-9.

SANT M, CROSIGNANI P, BORDO BM, NICOLA G, BIANCHI M, BERRINO F. Incidence and survival of brain tumors: a population-based study. *Tumori.* 1988 Jun 30;74(3):243-52.

SATHORNSUMETEE S, REARDON DA, DESJARDINS A, QUINN JA, VREDENBURGH JJ, RICH JN. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer.* 2007 1;110(1):13-24.

SATHORNSUMETEE S, RICH JN, REARDON DA. Diagnosis and Treatment of High-Grade Astrocytoma. *Neurol Clin.* 2007 25(4):1111-1139.

SATHORNSUMETEE S, RICH JN, REARDON DA. Diagnosis and Treatment of High-Grade Astrocytoma. *Neurol Clin.* 2007 Nov;25(4):1111-1139.

SCOTT JN, REWCASTLE NB, BRASHER PM, FULTON D, MACKINNON JA, HAMILTON M, CAIRNCROSS JG, FORSYTH P. Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? *Ann Neurol* 1999;46:183-188.

SCOTT JN, REWCASTLE NB, BRASHER PM, ET AL. Long-term glioblastoma multiforme survivors: a population-based study. *Can J Neurol Sci.* Aug 1998;25(3):197-201.

SHUGG D, ALLEN BJ, BLIZZARD L, DWYER T, RODER D. Brain cancer incidence, mortality and case survival: Observations from two Australian cancer registries, *Int. J. Cancer* 1994 59, 765-70.

SIMPSON JR, HORTON J, SCOTT C, CURRAN WJ, RUBIN P, FISCHBACH J, ISAACSON S, ROTMAN M, ASBELL SO, NELSON JS, WEINSTEIN AS, NELSON DF, Influence of location and extend of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive radiation therapy oncology group (RTOG) clinical trias, *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 1993; 26, 239-44.

SMITH DR, HARDMANN JM, EARLE KM. Contiguous glioblastoma multiforme and fibrosarcoma with extracranial metastasis. *Cancer* 1969; 24: 270-276.

SOFFIETTI R, RUDÀ R, TREVISAN E. New chemotherapy options for the treatment of malignant gliomas. *Anticancer Drugs.* 2007 18(6):621-32.

SORG RV, OZCAN Z, BREFORT T, FISCHER J, ACKERMANN R, MÜLLER M, WERNET P. Clinical-scale generation of dendritic cells in a closed system. *J Immunother.* 2003 Jul-Aug;26(4):374-83.

STEINER HH, HEROLD-MENDE C, BONSANTO M, GELETNEKY K, KUNZE S. Prognosis of brain tumors: epidemiology, survival time and clinical course. *Versicherungsmedizin.* 1998 1;50(5):173-9.

STEPP H, BECK T, PONGRATZ T, MEINEL T, KRETH FW, TONN JCH, STUMMER W. ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2007;26(2):157-64.

STUMMER W, BECK T, BEYER W, MEHRKENS JH, OBERMEIER A, ETMINAN N, STEPP H, TONN JC, BAUMGARTNER R, HERMS J, KRETH FW. 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.* 2008 Mar;87(1):103-9. Epub 2007 Nov 23.

STUMMER W, BECK T, BEYER W, MEHRKENS JH, OBERMEIER A, ETMINAN N, STEPP H, TONN JC, BAUMGARTNER R, HERMS J, KRETH FW. 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.* 2008 Mar;87(1):103-9.

STUMMER W, PICHLMEIER U, MEINEL T, WIESTLER OD, ZANELLA F, REULEN HJ, ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomized controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006, 7(5):392-401.

STUMMER W, PICHLMEIER U, MEINEL TH, WIESTLER D, ZANELLA F, REULEN, STUPP R, PICA A, MIRIMANOFF RO, MICHIELIN O. A practical guide for the management of gliomas. *Bull Cancer.* 2007 1;94(9):817-22.

STUPP R, PICA A, MIRIMANOFF RO, MICHIELIN O. A practical guide for the management of gliomas. *Bull Cancer.* 2007 1;94(9):817-22.

STUPP R, MASON W P, VAN DEN BENT MJ, WELLER M, FISHER B, TAPHOORN MJB, MIRIMANOFF R. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma, *NEngl JMed* 2005, 352:987-996.

SUTHERLAND RM, DURAND RE. Hypoxic cells in an in vitro tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1973 Mar;23(3):235-46.

SUTHERLAND RM, DURAND RE. Radiosensitization by nifuroxime of the hypoxic cells in an in vitro tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1972 Dec;22(6):613-8.

SUTHERLAND RM, MCCREDIE JA, INCH WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1971; 6(1):113-20.

TAI CK, KASAHARA N. Replication-competent retrovirus vectors for cancer gene therapy. *Front Biosci.* 2008 1;13:3083-95.

ÜBERRIEGLER KP, BANIEGHAL E, KRAMMER B. Subcellular damage kinetics with co-cultivated WI38 and VA13-transfected human fibroblasts following 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX formation. *Photochem Photobiol.* 1995 Dec;62(6):1052-7.

VARMA AK, MULLER PJ. Cranial neuropathies after intracranial Photofrin-photodynamic therapy for malignant supratentorial gliomas-a report on 3 cases. *Surg Neurol.* 2008 Aug;70(2):190-3.

WANG L, QU W, LIEBERMAN B, PLOESSL K, KUNG HF. Synthesis and in vitro evaluation of ¹⁸F labeled tyrosine derivatives as potential positron emission tomography (PET) imaging agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Jun 15;20(12):3482-5

WINZLER C, ROVERE P, RESCIGNO M, GRANUCCI F, PENNA G, ADORINI L, ZIMMERMANN V S, DAVOUST J, RICCIARDI-CASTAGNOLI P. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med*. 1997 185:317.

WISOFF HS, LLENA JF, Glioblastoma multiforme of the cerebellum five decades five decades after irradiation of a cerebellar tumor, *J. Neuro-Oncol*. 1989; 7, 339-44.

YUNG WK, PRADOS MD, YAYA-TUR R, ROSENFELD SS, BRADA M, FRIEDMAN HS, ALBRIGHT R, OLSON J, CHANG SM, O'NEILL AM, FRIEDMAN AH, BRUNER J, YUE N, DUGAN M, ZAKNOEN S, LEVIN VA Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. Erratum in: *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2762-71.

ZELENKOV P, BAUMGARTNER R, BISE K, HEIDE M, MEIER R, STOCKER S, SROKA R, GOLDBRUNNER R, STUMMER W. Acute morphological sequelae of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the C6 spheroid model. *J Neurooncology* 2007 Mar;82(1):49-60.

ZHANG JG, EGUCHI J, KRUSE CA, GOMEZ GG, FAKHRAI H, SCHROTER S, MA W, HOA N, MINEV B, DELGADO C, WEPSIC HT, OKADA H, JADUS MR. Antigenic profiling of glioma cells to generate allogeneic vaccines or dendritic cell-based therapeutics. *Clin Cancer Res*. 2007 Jan 15;13(2 Pt 1):566-75.

ZHANG R, BHARADWAJ U, LI M, CHEN C, YAO Q. Effects of pentoxifylline on differentiation, maturation, and function of human CD14+ monocyte-derived dendritic cells. *J Immunother*. 2007; 30:89-95.

ZHOU JY, PROGNON P. Raw material enzymatic activity determination: a specific case for validation and comparison of analytical methods--the example of superoxide dismutase (SOD). *J Pharm Biomed Anal*. 2006 Mar 18;40(5):1143-8.

ZOZULYA AL, ORTLER S, FABRY Z, SANDOR M, WIENDL H. The level of B7 homologue 1 expression on brain DC is decisive for CD8 Treg cell recruitment into the CNS during EAE. *Eur J Immunol.* 2009 Jun;39(6):1536-43.

Zulassungsstudie in der Ersttherapie des Glioblastoms, Stupp et al. 2005; Hegi et al. 2005.

7 Anhang

7.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. H.J. Steiger, Herrn Prof. Dr. med. W. Stummer, Herrn Dr. R. Sorg, Herrn Dr. med. N. Etminan und Frau B. Senger für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit, für die Unterstützung und Anregung bei der Bearbeitung dieser Untersuchung bedanken. Mit dem Thema meiner Inaugural-Dissertation haben sie mir eine Aufgabe gestellt, die meinen beruflichen Werdegang sehr positiv beeinflusste und viele wertvolle persönliche Erfahrungen bei der Fertigstellung der Arbeit mit sich brachte.

7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Bestrahlungsvorrichtung, schematisch
- Abb. 2: Extinktion WST-1-Assay im zeitlichen Verlauf
- Abb. 3: Zellvitalität (U373 / A172) in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit
- Abb. 4: Zellvitalität (U373 / A172) nach 16h im WST-1-Assay in Abhängigkeit von der ALA- Konzentration, ohne Bestrahlung
- Abb. 5: Zellvitalität (U373 / A172) nach 16h im WST-1-Assay in Abhängigkeit von der ALA- Konzentration, mit Bestrahlung (LD-50-Dosisfindung)
- Abb. 6: Tumorsphäroid, -ALA / -Bestrahlung, direkt nach Inkubation (U373)
- Abb. 7: Tumorsphäroid, -ALA / -Bestrahlung, nach vier Tagen (U373)
- Abb. 8: Tumorsphäroid, -ALA / -Bestrahlung, direkt nach Inkubation (A172)
- Abb. 9: Tumorsphäroid, -ALA / -Bestrahlung, nach vier Tagen (A172)
- Abb. 10: Migrationsverhalten (U373 / A172), -ALA / -Bestrahlung, über 14 Tage
- Abb. 11: Tumorsphäroid, -ALA / +Bestrahlung, U373 nach vier Tagen
- Abb. 12: Tumorsphäroid, -ALA / +Bestrahlung, A172 nach vier Tagen
- Abb. 13: Migrationsverhalten (U373 / A172), -ALA / +Bestrahlung, über 14 Tage
- Abb. 14: Tumorsphäroid, +ALA / -Bestrahlung, U373 nach vier Tagen
- Abb. 15: Tumorsphäroid, +ALA / -Bestrahlung, A172 nach vier Tagen
- Abb. 16: Migrationsverhalten (U373 / A172), +ALA / -Bestrahlung, über vierzehn Tage
- Abb. 17: Tumorsphäroid U373, +ALA / +Bestrahlung, unmittelbar nach PDT
- Abb. 18: Tumorsphäroid U373, +ALA / +Bestrahlung, ein Tag nach PDT
- Abb. 19: Tumorsphäroid U373, +ALA / +Bestrahlung, vier Tage nach PDT
- Abb. 20: Tumorsphäroid A172, +ALA / +Bestrahlung, ein Tag nach PDT
- Abb. 21: Durchmesser Tumorsphäroide U373 / A172 über 14 Tage nach PDT (+ALA / +Bestrahlung)
- Abb. 22: Vitalität (U373 / A172) nach einem u. vier Tagen in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus
- Abb. 23: Vitalität (U373 / A172) nach einem und 14 Tagen in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus
- Abb. 24: Vergleich der Migrationsradien nach 14 Tagen (U373 und A172) in Abhängigkeit vom Behandlungsmodus
- Abb. 25: Vergleich der Steigungen (ermittelt aus dem Migrationsverhalten) der A172-Sphäroide über 14 Tage
- Abb. 26: Vergleich der Steigungen (ermittelt aus dem Migrationsverhalten) der U373-

Sphäroide über 14 Tage

Abb. 27: Durchflusszytometrische Auswertung Konfrontationsassay, exemplarisch

Abb. 28: Konfrontationsassay mit DC und U373-Tumorsphäroiden

Abb. 29: Konfrontationsassay mit DC und U373-Einzelzellen

Abb. 30: Rot fluoreszierende DC mit phagozytiertem, grün fluoreszierenden U373-Tumormaterial

7.3 Abkürzungen

µl - Mikroliter

5-ALA - 5-Aminolävulinsäure

Abb. - Abbildung

CD - Cluster of domination

CFDA-SE - Carboxyfluoreszin-diazetat-succimdylester

CFSE - Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester

GM-CSF - Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

d - Tag

DC - Dendritische Zelle(n)

DMEM - Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium

DMSO - Dimethylsulfoxid

EDTA - Ethylendiamintetraacetat

FACS - fluorescence activated cell sorting

FCS - Foetales Kälberserum

GBM - Glioblastoma multiforme

h - Stunde

HLA - Humanes Leukozytenantigen

IL - Interleukin

ITZ - Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika

LD50 - Letale Dosis 50

min - Minute

ml - Milliliter

MNC - Mononukleäre Zelle(n)

n - Anzahl

nm - Nanometer

PBS	- Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDT	- Photodynamische Therapie
Pe	- Phycoerythrin
R	- Radiatio / Bestrahlung
Vs.	- Versus

7.4 Materialliste

24-Well-Gewebekulturplatten (Greiner)

5-Aminolävulinsäure der Firma Merck á 5 g

Ammoniunchlorid-Lösung (8,3 g NH_4Cl + 1,0 g KHCO_3 + 0,0375 g EDTA-Na_2 ad. H_2O dest. 1 l; hergestellt und sterilisiert von der Apotheke des UKD, Düsseldorf)

Biocidal ZF™ WAK-Chemie Medical GmbH

CD14-Microbeads 2 μl (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Cell-Dyn-3500 Analysegeräts (Abbott, Wiesbaden)

CellGroDC Medium (CellGenix, Freiburg)

CellGroDC von CellGenix.

CFDA:Molecular Probes/Invitrogen

CFDA-SE (Molecular Probes/Invitrogen)

CGDC-Medium

Combitip plus® kleinster Schritt 10 µl; größter Schritt 200 µl

Combitip plus® kleinster Schritt 100 µl; größter Schritt 2000 µl

Combitip plus® kleinster Schritt 50 µl; größter Schritt 1000 µl

DMEM – Dulbecco´s Modified Eagle Medium ohne Phenolrot

DMEM High-Glucose mit Phenolrot Best. Nr. 41965-039; Fa. Gibco

Ethanol 70 % vergällt mit Petroläther

Falcon-Röhrchen 15 ml (Falcon/BD Biosciences, Heidelberg)

Falcon-Röhrchen 50 ml (Falcon/BD Biosciences, Heidelberg)

FCS: Gold = Foetal-Calf- Serum-Gold; Best.- Nr. A15/649; Fa. PAA

Ficoll-Lösung 15 ml (Biochrom, Berlin) mit der spezifischen Dichte von 1,077 g/cm³

FITC – Fluoreszeinisothiocyanat; PE – Phycoerythrin

Flaschen: Schott / Duran 400 ml; 80 ml Fisherbrand

Fungizome: Best. Nr. 15290-026; (50 ml-Fl.); Fa. Gibco

GM-CSF: Berlex

Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor 1000 U/ml (GM-CSF, Leukine Sargramostim, Berlex, Richmond, CA)

HLA-DR-Pe: Pharmingen

Human Cytokine Antibody-Array Kit, 5 Membranen

Human IL-12 P70 ELISA Kit (RayBiotech)

Humanes Serumalbumin 0,5 % (HSA, 20 % Octalbin, Octapharma, Langenfeld)
in PBS (= HAS / PBS)

IgG1 Pe: Immunotech

IL4 : CellGenix

Interleukin-4 1000 U/ml (IL-4, CellGenix)

LiChrosolv Wasser für Chromatographie der Firma Merck

Luminex 15-Multiplex-Kit (BioSource)

Mausserum 2,5 %ig (Sigma-Aldrich, Seelze)

Motorpipette: Pipetus® Hirschmann Laborgeräte

NaCl 0,9 % Fa. Braun

Noble agar der Firma Sigma-Aldrich

Pasteurpipetten aus Glas Fa. Brand

PBS: Phosphatpuffer; Fa. Gibco

Penicillin-Streptomycin (=Penstrep): Fa. Biochron

Petrischalen Cellstar; Fa. Greiner-bio-one

Pipettenspitzen: ep T.I.P.S Eppendorf

Polypropylen-Rundbodenröhrchen 5 ml (BD Biosciences)

Serologische Pipetten Stripette®, 2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml; steril

Tissue Culture Plate (Zellkulturplatte) der Firma Cellstar; steril, non pyrogen,

Trypsin EDTA: 0,25 ml; Cat. Nr.: L 11-004 ; Fa. PAA (100 ml-Fl.)

WST-1 Cell Proliferation Reagent der Firma Roche 25 ml für 2500 Tests

7.5 Geräteliste

Absauggerät: Gardner Denver

Autoklav: Systemec D-65

Biorad Microplate Reader Model 680 XR 655 nm / 415 nm

Digitale Kamera (Olympus),

Durchflusszytometrie: FACSCalibur von BD (Becton Dickinson)

Eppendorf Multipipette®

Eppendorf Research Pipette® 0.5 - 10 µl; 10 - 100 µl; 20 - 200 µl; 100 - 1,000 µl; 500 - 5,000 µl; 1 - 10 ml;

Kühlschrank Fa. Liebherr Premium

Lichtleiter Medlight FD1-614

LS-Säule (Miltenyi Biotec)

Messokular Olympus CWHK 10x/18L

Microwelle Micromat

Midi-MACS (Miltenyi Biotec)

Mikroskop: Olympus CK2

Neubauer Zählkammer Fa. Brand

Rührgerät KIKA Labortechnik RET basic

Sterilbank: LaminAir® HA 2448

Thermomixer comfort von Eppendorf

Waage: Fa. Kern 410

Wasserbad: Fa. Köstermann

Zentrifuge Hettich 30

8 Lebenslauf

Name: Julian Ficnar

Geburtsdatum: 24.09.1981

Geburtsort: Dortmund

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: ledig

Schullaufbahn:

August 1988 bis Juli 1992: Erich-Kästner-Grundschule Dortmund

August 1992 bis Juni 2001: Immanuel-Kant-Gymnasiums Dortmund
Abitur im Jahr 2001

Zivildienst:

Juli 2001 bis Juni 2002: Elfmonatiger Zivildienst: mobile Alten- und
Krankenpflege Diakonische Dienste Dortmund

Hochschullaufbahn:

Oktober 2002 - Mai 2007: Studium Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

August 2004: Physikum mit der Abschlussnote 2,33

August 2007 bis Juli 2008: Praktisches Jahr Universitätsklinikum Düsseldorf

November 2008: 2. Staatsexamen mit der Gesamtnote 1,5

Berufspraxis:

Seit Februar 2009: Arzt in Weiterbildung in der Gynäkologie und
Geburtshilfe im Marienhospital Wesel

Promotion:

Februar 2006: Beginn der Dissertationsarbeit unter der Leitung
von Herrn Prof. Dr. med. W. Stummer an der
neurochirurgischen Klinik der Universität
Düsseldorf

August 2011: Promotion in der Neurochirurgischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf