

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

Photodynamische Therapie (PDT) mit 5-ALA in Glioblastom-Stammzellkulturen

Dissertation

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

vorgelegt von

Sarah Christa Jauernik

2013

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

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

Referent: Prof. Dr. Steiger
Korreferent: Dr. med. Felsberg

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern.

Zusammenfassung

Glioblastome sind hirneigene Tumore, die trotz maximaler Therapie mit einer geringen mittleren Überlebenszeit von 14,6 Monaten verbunden sind. [1] Neue Therapieverfahren, wie die Photodynamische Therapie mit ALA, stellen deshalb eine wichtige Option dar und werden experimentell an Zellkulturen aber auch klinisch beim rezidivierenden Glioblastom erfolgreich eingesetzt. [2, 3] Dabei reichert sich der Photosensibilisator Protoporphyrin IX selektiv in Tumorzellen an und sorgt bei einer Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 635nm für verschiedene Effekte, wie der Entstehung von Sauerstoffradikalen, die zu Apoptose und Nekrose führen, immunologische Effekte, Regulation der Angiogenese und Beeinflussung der Invasivität. [4-8] Inzwischen konnten für das Glioblastom, wie auch für andere Tumore, Tumorstammzellen identifiziert werden, die eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie aufweisen, und als die Zellen gelten, die für Tumorwachstum und Tumorentstehung verantwortlich sind. [9-12]

Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob Tumorstammzellen des Glioblastoms ALA aufnehmen und falls ja, sensibel auf die PDT reagieren.

Dazu wurde die Tumorstammzelllinie GS5 mit vollständigem stammzellähnlichem Phänotyp kultiviert. Anschließend wurde die ALA-Aufnahme durchflusszytometrisch gemessen und ein Ansprechen auf die PDT mit ALA durch den WST-1 Test nachvollzogen. Als Kontrollzelllinie wurde die Glioblastomzelllinie U373, deren Verhalten im Bezug auf die PDT bekannt ist, kultiviert und den gleichen Versuchen unterzogen.

Die Aufnahme von ALA konnte nach Inkubation mit ALA durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Desweiteren konnte eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität nach Inkubation mit ALA und anschließender Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 635nm im WST-1 Test nachgewiesen werden. Die Reduktion der Zellviabilität war dabei im Vergleich zur Reduktion der Zellviabilität nach alleiniger Inkubation mit ALA, alleiniger Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 635nm und ohne Behandlung signifikant.

Dies zeigt, dass die PDT eine wirksame Therapieoption auch für Tumorstammzellen darstellt. In weiteren Versuchen muss getestet werden, wie andere Glioblastomtumorstammzellen auf die PDT reagieren und wie sich die Zellen nach abgelaufener PDT verhalten. Desweiteren sollten *In-Vivo*-Experimente folgen. Ein kontrovers diskutierter Punkt ist, ob der sichere Nachweis der Tumorstammzellen durch eine durchflusszytometrische Messung von CD133 ausreicht, wenn nicht, wie in dieser Arbeit, etablierte Zelllinien verwendet werden. Dies ist auch ein Grund dafür, dass für diese Arbeit etablierte Tumorstammzelllinien verwendet wurden. Es gibt Hinweise darauf, dass andere Methoden sensitiver sind. [13] Inzwischen gibt es auch viele Untersuchungen, die zeigen, dass das Vorhandensein von CD133 positiven Zellen, also das Vorhandensein von Tumorstammzellen, eng mit der Dauer des mittleren Gesamtüberlebens und der Dauer des progressionsfreien Intervalls zusammenhängen. [14, 15] Wirksame Therapien für Tumorstammzellen scheinen somit von großer Bedeutung zu sein.

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ALA	5-delta-Aminolävulinsäure
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
FACS	<i>Flow cytometry</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (fetales Kälberserum)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> (Fibroblastenwachstumsfaktor)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
h	Stunde
HSA	<i>Human serum albumin</i> (Humanserumalbumin)
I.E.	Internationale Einheit
IG	Immunglobulin
MGMT	06-methylguanin-DNS-methyltransferase
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
mW	Milliwatt
Op	Operation
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PDT	Photodynamische Therapie
PE	Phycoerythrin
PPIX	Protoporphyrin IX
PTEN-Gen	<i>phosphatase and tensin homology Gen</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute-Zellkulturmedium
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SSC	<i>Side Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TP53 Gen	Gen für den Tumorsuppressor P53
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
WST-1	<i>Water-soluble tetrazolium salt</i> (wasserlösliches Tetrazoliumsalz)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glioblastome	1
1.1.1	Einteilung	1
1.1.2	Epidemiologie	2
1.1.3	Klinik	3
1.1.4	Tumorpathologie	4
1.1.5	Diagnostik	5
1.1.6	Therapieoptionen	6
1.1.7	Prognose	10
1.2	Stammzellen	11
1.2.1	Das Tumorstammzell-Modell	11
1.2.2	Tumorstammzellen in Glioblastomen	13
1.2.3	Klinische Bedeutung der Stammzelltheorie	14
1.3	Photodynamische Therapie mit 5-Aminolävulinsäure	15
1.3.1	Prinzip der PDT	16
1.3.2	Die Rolle von ALA und der PDT in der Neurochirurgie	18
2	Fragestellung	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Material	21
3.1.1	Chemikalien	21
3.1.2	Verbrauchsmaterial	21
3.1.3	Geräte	22
3.2	Zellkultur	23
3.2.1	Zellkultur der Stammzelllinien GS5	23
3.2.2	Zellkultur der Vergleichszelllinie U373	24
3.2.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen	25
3.2.4	Einstellen einer Zellzahl in einem definierten Volumen	26
3.2.5	Ansetzen der ALA-Verdünnungen	27
3.3	WST-1-Assay als Proliferationstest nach ALA und PDT	29
3.3.1	Allgemeine Informationen zum WST-1-Assay	29
3.3.2	Ausplattieren der Zellen	29

3.3.3	Inkubation der Zellen mit ALA	31
3.3.4	Prinzip der Bestrahlung mit einem Diodenlaser	31
3.3.5	Bestrahlung der Zellen im Versuchsaufbau	32
3.3.6	Durchführung des WST-1-Assays mit anschließender Messung	33
3.4	Durchflusszytometrie	34
3.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	34
3.4.2	Durchflusszytometrische Messung der ALA-Aufnahme in Zellen	34
3.4.3	Statistische Auswertung	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Durchflusszytometrische Messung der ALA-Aufnahme in Zellen	36
4.1.1	Allgemeine Informationen zur Messung	36
4.1.2	ALA-Aufnahme der GS5-Zellen.....	37
4.1.3	ALA-Aufnahme der U373-Zellen	39
4.2	WST-1 Test	42
4.2.1	Verhalten der GS5-Zelllinie im WST-1 Test.....	42
4.2.2	Entwicklung eines geeigneten Ablaufs für den WST-1 Test mit GS5-Zellen nach PDT	43
4.2.3	Einführen eines Mediumwechsels.....	47
4.2.4	WST-1 Test mit GS5-Zellen nach PDT inklusive eines Mediumwechsels.....	50
4.2.5	WST-1 Test mit U373-Zellen nach PDT.....	55
5	Diskussion	59
5.1	Tumorstammzellen und Glioblastom-Stammzellen	59
5.2	Durchflusszytometrische Messung der ALA-Aufnahme.....	60
5.3	Der WST-1 Test als Proliferationstest nach ALA und PDT	62
5.4	Die Photodynamische Therapie an Gliom- und Glioblastomzellen sowie an Tumorstammzellen	65
5.5	Die Photodynamische Therapie an Glioblastomen im klinischen Gebrauch	67
5.6	Kontroversen der Arbeit und Blick in die Zukunft.....	68
6	Schlussfolgerung	71
7	Literaturverzeichnis	72

1 Einleitung

1.1 Glioblastome

Glioblastome sind hirneigene Tumore, die zu der Gruppe der astrozytären Tumore gehören. Astrozyten zählen zu den Stütz- oder auch Gliazellen des Gehirns, weshalb man die zu dieser Gruppe gehörigen Tumore auch Gliome nennt. Glioblastome charakterisieren sich durch Anaplasie, mikrovaskuläre und endotheliale Proliferation und/oder Nekrose. [16]

Die Tumore bilden sich vor allem in den Großhirnhemisphären, wachsen typischerweise infiltrierend und liegen meist subkortikal. Generell können alle Hirnlappen betroffen sein. Sie kommen auch im Bereich des Balkens vor, von dem aus sie beidseits in die frontalen Marklager hineinwachsen und so das Bild eines Schmetterlingglioms entstehen lassen können. [17]

Der Ursprung für Glioblastome konnte bisher nicht identifiziert werden. [18, 19]

1.1.1 Einteilung

Gliome werden nach histologischen Eigenschaften in drei Hauptgruppen eingeteilt. Man unterscheidet Astrozytome, Oligodendrogliome und gemischte Oligoastrozytome. Astrozytome, zu denen auch die Glioblastome gehören, werden weiter nach Malignitätsgraden eingeteilt (Tabelle 1). Dabei ist die bösartigste Tumorregion für die Einteilung ausschlaggebend. [20] Nach der WHO-Klassifikation von 2007 zählen zu den Grad-1-Tumoren das pilozytische Astrozytom und das subependymale Riesenzell-Astrozytom. Als Grad-2-Tumor werden das diffuse Astrozytom, das pilomyxoide Astrozytom und das pleomorphe Xanthoastrozytom bezeichnet. Das anaplastische Astrozytom gehört zu den Grad-3-Tumoren und das Glioblastom, das Riesenzell-Glioblastom und das Gliosarkom zu den Grad-4-Tumoren. [16]

Astrozytärer Tumor	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Subependymales Riesenzell Astrozytom	X			
Pilozytisches Astrozytom	X			
Pilomyxoides Astrozytom		X		
Diffuses Astrozytom		X		
Pleomorphes Xanthoastrozytom		X		
Anaplastisches Astrozytom			X	
Glioblastom				X
Riesenzell-Glioblastom				X
Gliosarkom				X

Tabelle 1: **WHO-Klassifikation astrozytärer Tumore** [16]

1.1.2 Epidemiologie

Die Inzidenzrate für maligne Hirn- und ZNS-Tumore bei Erwachsenen liegt in den USA bei 6,5 Fällen/100.000 Einwohner pro Jahr. Die Inzidenzrate für Glioblastome in den USA, angepasst an die Standardpopulation in den USA, liegt bei ca. 3 Fällen/100.000 Einwohner pro Jahr. [21] Diese Inzidenzraten beinhalten nicht die sekundären Glioblastome, die sich aus niedriggradigeren Gliomen entwickelt haben, da nur die Erstdiagnose in Inzidenzraten einbezogen wird. Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Bei ihnen liegt die jährliche Inzidenzrate pro 100.000 bei 3,86, wobei sie bei Frauen nur bei 2,39 liegt. [22] Die Unterschiede in der Geschlechterverteilung werden um das Alter der Menarche evident, sind zum Alter der Menopause hin am größten, um danach wieder geringer zu werden. Dies lässt vermuten, dass weibliche Sexualhormone einen Schutzfaktor darstellen könnten. [23]

Insgesamt ist die Inzidenz der Glioblastome in den letzten drei Dekaden leicht angestiegen, was vor allem der verbesserten Diagnostik zugeschrieben wird. [24]

Desweiteren lässt sich ein Unterschied in der Verteilung der Glioblastome bei Weißen und Schwarzen in den USA feststellen. Weiße sind deutlich häufiger betroffen. Auch geographische Unterschiede scheinen einen Einfluss zu haben. Die Inzidenzrate für maligne Hirntumore ist in Japan weniger als halb so hoch

wie in Nordeuropa. Da die Ursachen für diese und auch für weitere Verteilungsunterschiede zwischen ethnischen Gruppen noch nicht hinreichend geklärt werden konnten, sind weitergehende Forschungen notwendig. [25]

Insgesamt sind die Inzidenzraten mit 0,13 pro 100.000 für die 0 bis 19 jährigen niedrig, steigen dann mit zunehmendem Alter stetig an und erreichen in der Altersgruppe der 65- bis 74-jährigen ihr Maximum. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 62 Jahren. [25]

1.1.3 Klinik

Hirntumore können sich im Allgemeinen durch vier verschiedene Symptomgruppen präsentieren. Dazu gehören Krampfanfälle, Zeichen des gesteigerten Hirndrucks, fokale neurologische Defizite und kognitive Dysfunktion. [20, 26]

Krampfanfälle treten bei ca. 25-37% der Glioblastompatienten auf. [27, 28] Sie präsentieren sich meist fokal mit sekundärer Generalisierung. [29] Alter und Geschlecht der Patienten haben keinen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit eines Krampfanfalles. Die Tumurlage ist dagegen von Bedeutung. Liegt der Tumor supratentoriell, ist ein Krampfanfall viel wahrscheinlicher als bei infratentorieller Lage. Anfälle treten auch häufiger auf, wenn der Tumor frontoparietal, frontotemporal, temporal oder parasaggital liegt, weniger wenn er okzipital oder multilokulär liegt. Leiden Patienten an Krampfanfällen, ist die Inzidenz für Kopfschmerzen, neurologische Defizite und mentale Beeinträchtigung signifikant niedriger. [28]

Zeichen des gesteigerten Hirndrucks sind Übelkeit, Erbrechen, progressive Kopfschmerzen, Schläfrigkeit und visuelle Abweichungen. Die visuelle Problematik äußert sich häufig mit einem Papillenödem oder Diplopie aufgrund einer Lähmung des Nervus abducens. [20] Kopfschmerzen treten bei 50% der Patienten mit Hirntumoren als erstes Symptom auf. [30] Sie sind in den Morgenstunden besonders stark, so dass Patienten teilweise von ihnen geweckt werden. Außerdem können sie häufig nicht von Spannungskopfschmerzen unterschieden werden. [31] Die Zeichen des gesteigerten Hirndrucks präsentieren sich oft relativ akut, da bei einem hohen

intrakraniellen Druck eine geringe Volumenzunahme reicht, um einen großen Druckanstieg zu verursachen. [32] Im schlimmsten Fall kann ein erhöhter intrakranieller Druck zu einer Einklemmung am Tentorium cerebelli oder der Kleinhirntonsillen führen, wodurch Koma und Tod folgen können. [20]

Neurologische Defizite können ein Hinweis auf die Tumorlokalisation sein. Supratentorielle Tumore können motorische oder sensible Defizite, Hemianopsie oder Aphasie verursachen. Infratentorielle Tumore können zu Hirnnervenlähmungen, Kleinhirnfunktionsstörungen oder Pyramidenbahnzeichen führen. [20]

Kognitive Dysfunktion tritt vor allem bei diffuser Hirninfiltration, meningealer Tumorausbreitung und Frontallappensyndrom auf. [20]

Die Inzidenz für Metastasen in extraneuralen Geweben liegt mit 0,2% auf einem sehr niedrigen Niveau. Wenn doch, kommen vor allem ossäre und pulmonale Metastasen vor. Metastasen treten hauptsächlich bei erwachsenen Patienten auf. [33, 34]

1.1.4 Tumorpathologie

Glioblastome können auf der Basis biologischer und genetischer Unterschiede in zwei Gruppen unterteilt werden. [31] Es gibt primäre Glioblastome, die de novo entstehen, und sekundäre Glioblastome, die aus niedriggradigen diffusen oder anaplastischen Astrozytomen entstehen. [35, 36]

Die primären Tumore kommen vor allem bei Patienten, die älter als 50 Jahre sind, vor und zeigen häufig eine Überexpression (mehr als 60%) und Amplifikation (40%) des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR). Alle Tumore, die eine Amplifikation besitzen, zeigen auch eine EGFR-Überexpression, wobei nur 70-90% der Tumore mit EGFR-Überexpression auch eine Amplifikation aufweisen. 25% der primären Glioblastome besitzen eine Mutation im PTEN (*phosphatase and tensin homology*) Gen. Dieses Gen codiert die Phosphatase PTEN, die die Hydrolyse verschiedener Phosphorsäureester katalysiert und wichtig für Zellmigration und Invasion ist. Eine Mutation im TP53 Gen, das Gen für den Tumorsuppressor P53, kommt dagegen seltener vor. [35]

Sekundäre Glioblastome zeigen sich häufiger bei jungen Patienten und gehen meist (65%) mit einer Mutation im TP53 Gen einher. [20, 22, 31] Eine Mutation im PTEN-Gen oder eine Amplifikation im EGFR kommt dagegen selten vor. Insgesamt macht die sekundäre Form nur 5 % aller Glioblastomfälle aus. [35]

Bei beiden Formen kann man zu 60-80% einen Verlust der Heterozygotie an der Stelle 10q feststellen. Morphologisch sind beide Typen nicht zu unterscheiden und auch das Ansprechen auf Therapien ist ähnlich. Eventuell können auf diese Formen abgestimmte Therapien den Therapieerfolg steigern. [31, 35]

1.1.5 Diagnostik

Für die Diagnostik haben zusätzlich zu Anamnese und klinischer Präsentation vor allem die bildgebenden Verfahren einen hohen Stellenwert. Neben der Magnetresonanztomographie (MRT) und der Computertomographie (CT), spielen weitere Verfahren eine zunehmende Rolle.

Die MRT des Kopfes mit oder ohne Gadolinium als Kontrastmittel ist das Mittel der Wahl zur Tumordiagnose. Mit ihr lassen sich die Lokalisation des Tumors, die Größe, die Kontrastmittelanreicherung und der Grad des Ödems am besten bestimmen. [20] Gadolinium ist nicht Blut-Hirnschrankendurchlässig, so dass eine Störung der Blut-Hirn-Schranke mit einer Kontrastmittelanreicherung aufgezeigt werden kann. Glioblastome reichern Kontrastmittel nicht gleichmäßig an, wodurch es zu einem typischen girlandenförmigen Kontrastmittelring kommt. [37] Desweiteren zeigen sie eine zentrale Nekrose und ein ausgedehntes peritumorales Ödem. Steht keine MRT zur Verfügung, kann die weniger sensitive CT des Kopfes durchgeführt werden, um eine erste Einstufung vornehmen zu können. [20]

Die Protonen-Magnetresonanztomographie ist ein Verfahren, durch welches man Informationen über Metabolite im Gewebe erhält. Diese Methode lässt eine Unterscheidung zwischen Tumorgewebe, gutartigen Läsionen und Nekrosen zu. [37] Darüberhinausgehend ergeben sich Hinweise für die weitere Differenzierung der Tumore. Ein hoher Cholin-Peak, als Zeichen für einen erhöhten Membranumsatz, und ein niedriger N-acetyl-Aspartat-Peak, als

Hinweis für erniedrigte neuronale Zellaktivität, sind typische Werte für maligne Gliome. Das Vorhandensein eines Lipid- und Laktat-Peaks weist auf einen nekrotischen Grad-4-Tumor hin. [38]

Die Positronen-Emissions-Tomographie, die verschiedene Radiopharmaka benutzt, kann Stoffwechselfvorgänge darstellen. Sie gibt Hinweise auf das Therapieansprechen und kann die Diagnostik zudem verbessern. [39, 40]

Die funktionelle MRT vergleicht den oxygenierten Blutgehalt im Gewebe zwischen einem Experimentzeitpunkt und einem Kontrollzeitpunkt. Wichtige Bereiche, wie Motor- oder Sprachareale, können so ermittelt werden. Anschließend kann man eine Beziehung zwischen diesen Arealen und dem Tumor nachweisen oder ausschließen. Dies ist für die OP-Planung hilfreich. [38]

Die Diffusionsgewichtete-MRT und die Diffusions-Tensor-Bildgebung sind Methoden, um die Diffusionsbewegung von Wassermolekülen zu messen und darzustellen, welche sich bei manchen Erkrankungen charakteristisch verändert. Sie stellen eine Hilfe zur Diagnostik dar und geben Aufschluss über das Therapieansprechen. [38]

MRT-Aufnahmen nach einer Radiotherapie können bei 20 bis 30% der Patienten einen vergrößerten Herd zeigen, der im Rahmen einer Pseudoprogession auftritt. [41] Diese entsteht durch eine Zunahme der Gefäßpermeabilität. Die Herde verkleinern oder stabilisieren sich in der Regel ohne weitere Behandlung und bleiben meistens asymptomatisch. [42]

1.1.6 Therapieoptionen

Die Standardtherapie für Glioblastome beinhaltet, wenn möglich, eine maximale chirurgische Resektion, Radiotherapie und Chemotherapie. [31] Da Glioblastome als nicht heilbar gelten, liegt der Schwerpunkt der Therapie auf der Verbesserung der Defizite und dem Verlängern des Überlebens unter Berücksichtigung der Lebensqualität. Dazu sind symptomorientierte Behandlung, psychologische Unterstützung und Rehabilitationsmaßnahmen wichtige Ergänzungen. [20]

Die Patienten sollten, wenn es die Umstände erlauben, einer maximalen chirurgischen Resektion unterzogen werden. Diese sorgt für eine schnelle Reduktion der Tumormasse und den damit verbundenen Symptomen und lässt zusätzlich eine histologisch gesicherte Diagnose zu. [20] Außerdem verbessert sie das Überleben und kann möglicherweise die Wirksamkeit adjuvanter Therapien verbessern. [43-45] Die OP-Ergebnisse wurden durch Methoden wie der fluoreszenzgestützten Chirurgie, des intraoperativen Ultraschalls, der MRT-gestützten Neuronavigation, dem funktionellen und intraoperativen MRT zunehmend verbessert. [46, 47] Vor allem durch die fluoreszenzgestützte Chirurgie mit 5 Aminolävulinsäure (ALA) konnte die Anzahl an Patienten mit postoperativ radiologisch nicht mehr nachweisbarem Tumor von 36% auf 65% erhöht werden. Außerdem haben Patienten, die auf diese Weise operiert wurden, ein längeres progressionsfreies Intervall als Patienten, die ohne ALA operiert wurden. [46] Wenn der Tumor inoperabel ist, sollte eine stereotaktische Biopsie zur histologischen Diagnosesicherung durchgeführt werden.

Die anschließende Radiotherapie wird in einer Dosis von 60 Grey in 30 Fraktionen über sechs Wochen verabreicht. Durch sie kann das Überleben der Patienten von drei bis vier Monaten auf sieben bis zwölf Monate verlängert werden. [48] Versuche, das Überleben durch Brachytherapie oder stereotaktische Radiochirurgie zu verbessern, scheiterten. [49-51] Die Radiotherapie in Kombination mit unterstützenden Behandlungen verbessert auch das Überleben von Patienten, die älter als 70 Jahre alt sind, im Vergleich zu Patienten, die nur unterstützende Behandlung erhalten. Die Überlebenszeit kann von 16,9 Wochen auf 29,1 Wochen verlängert werden. [52] Da Patienten in dieser Altersgruppe empfindlicher auf eine Radiotherapie reagieren, kann eine reduzierte Radiotherapie mit nur 40 Grey in 15 Fraktionen über drei Wochen angewendet werden. Diese stellt keinen Nachteil im Überleben dar. [53]

Die Chemotherapie sollte gleichzeitig mit der Radiotherapie gestartet und adjuvant weitergeführt werden. Als Chemotherapeutikum wird das alkylierende Zytostatikum Temozolomid verwendet, das oral verabreicht wird. Es sorgt dafür, dass an der 06-Position des Guanins in der DNS Methyladdukte geformt werden. Durch diese Methyladdukte kommt es zu einer fälschlichen Paarung mit Thymin. In den folgenden Zyklen DNS-Replikation führt dies zu Strangbrüchen und eventuell dem Zelltod. [54] Während der sechswöchigen Radiotherapie werden täglich 75 mg Temozolomid pro m² Körperoberfläche verabreicht. Anschließend gibt man sechs Zyklen lang alle 28 Tage über jeweils

fünf Tage 150 bis 200 mg Temozolomid pro m² Körperoberfläche. Diese Behandlung verlängert das Überleben der Patienten im Mittel um 2,5 Monate im Vergleich zu solchen, die nur eine Radiotherapie erhalten. [1, 55] Die gleichzeitige Chemo- und Radiotherapie ist besonders sinnvoll, da die Radiosensitivität der Tumorzellen durch Temozolomid erhöht wird. [54]

Eine große Rolle spielt das DNS-Reparaturenzym MGMT (O⁶-methylguanin-DNS-methyltransferase). Das Ansprechen auf Temozolomid ist größer, wenn eine Methylierung der Promotorregion des MGMT-DNS-Reparaturgens vorliegt. [36] Die Methylierung, die bei 45% der Glioblastompatienten auftritt, schaltet dieses wichtige Reparaturenzym aus und die Wirksamkeit von Temozolomid ist gesteigert. Patienten mit dieser Methylierung überleben nach Radiotherapie kombiniert mit Temozolomid im Mittel 21,7 Monate. Erhalten diese Patienten nur eine Radiotherapie, liegt die mittlere Überlebensdauer bei 15,3 Monaten. Bei Patienten, die diese Methylierung nicht besitzen, war der Unterschied zwischen beiden Behandlungsgruppen nicht signifikant. [56]

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, nach Tumorresektion im Körper abbaubare Polymere eines Chemotherapeutikums in das Tumorbett zu implantieren. Dazu benutzt man Carmustin, ein Zytostatikum aus der Gruppe der Alkylantien. Dieses wird über einige Wochen langsam freigegeben und kann so die verbliebenen Tumorzellen töten. In einer randomisierten, placebokontrollierten Studie konnte gezeigt werden, dass die mittlere Überlebensdauer bei Patienten mit neu diagnostiziertem Gliom von 11,6 Monaten auf 13,9 gesteigert werden konnte. [31, 57] Leider sind die Halbwertszeit mit 1,5 Stunden und auch die Eindringtiefe mit 0,5 cm relativ gering (die Eindringtiefe ist definiert als die durchschnittliche Distanz zwischen Polymeroberfläche und Gewebe, indem die Medikamentenkonzentration einem Prozent der Konzentration, die auf der Polymeroberfläche herrscht, entspricht). Die fettlöslichen Carmustinmoleküle besitzen eine hohe transvaskuläre Permeabilität, was einen schnellen Abtransport über die systemische Zirkulation zur Folge hat. Diese Eigenschaften limitieren die Therapieeffektivität. [55]

Weltweit wird an neuen Therapieoptionen geforscht. Einer dieser Ansätze ist die Photodynamische Therapie, auf die in einem eigenen Kapitel näher eingegangen wird.

Desweiteren spielt die antiangiogenetische Therapie mit Bevacizumab eine Rolle. Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper der Gruppe IgG1 gegen VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Glioblastome gehören zu den sehr

gut vaskularisierten Tumoren und kommen deshalb für eine antiangiogenetische Therapie in Frage. Bei einem Glioblastomrezidiv sorgt es für eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls sowie für eine Verbesserung der Lebensqualität. Neue Studien zeigen auch einen Nutzen beim neu diagnostizierten Glioblastom in Kombination mit Radio- und Chemotherapie. [31, 58] Wird Bevacizumab mit Irinotecan (ein Zytostatikum) kombiniert angewendet, kann man beim rezidivierenden Glioblastom die Rate für das sechs monatige progressionsfreie Intervall im Vergleich zu Patienten, die nur Bevacizumab erhalten, um 8% steigern. [58, 59]

Einen weiteren Therapieansatz stellt die Gentherapie dar. Das Prinzip dieser Therapie besteht darin, dass ein Vektor spezielle Gene zum Tumor transportiert, die, angekommen im Tumor, diesen zerstören. Als Vektoren wurden zelluläre Vektoren (Bakterien und Fibroblasten), nicht-virale Vektoren (nackte DNS und Liposomen, die über eine Injektion oder einen Gewebebeschuss den Tumor erreichen und dort über Endozytose in die Zellen eindringen) sowie virale Vektoren getestet. Die viralen Vektoren können in nicht-replizierende Viren und in replikationskompetente Viren unterteilt werden. [60] Neue Vektoren stellen neuronale, mesenchymale und embryonale Stammzellen dar, die die Fähigkeit besitzen auch in Richtung verstreuter Tumorzellen zu migrieren. [61] Als therapeutische Transgene wurden Tumorsuppressorgene, für immunstimulatorische Moleküle codierende Gene, wichtige physiologische Funktionen unterdrückende Gene und Prodrug-aktivierende Gene verwendet. [60] Die Gentherapie stellt eine vielseitige adjuvante Therapieoption dar, die in verschiedenen klinischen Studien weiter optimiert wird. [61]

Forschungsansätze haben gezeigt, dass allogene Gliomzellen zur Herstellung von Vakzinen für autologe dendritische Zellen benutzt werden können. [62] Zudem können radioaktiv gekennzeichnete monoklonale Antikörper gegen das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin genutzt werden. [63] Eine andere Möglichkeit bietet das synthetisch hergestellte Chlorotoxin TM-601 (Chlorotoxin bindet vorzugsweise an Gliomzellen), welches mit Iodine-131 radioaktiv markiert werden kann. [64] Infusionen, die unter hohem Druck mit Hilfe von zerebralen Kathetern direkt in das Gehirn und umgebende Gewebe gegeben werden, stellen einen weiteren Weg dar, um Medikamente an den Zielort zu bringen. [65]

Ein neuer Ansatz ist die Therapie mit Valganciclovir. Bei den meist für eine CMV-Infektion positiven Glioblastomzellen wird den Patienten zusätzlich zur Standardtherapie Valganciclovir verabreicht. Dies sorgt für eine signifikante Verlängerung des medianen Überlebens von 12-14 Monaten auf 56,4 Monate [66]

1.1.7 Prognose

Trotz derzeitiger Fortschritte in der Glioblastomtherapie bleiben Morbidität und Mortalität des Glioblastoms sehr hoch. [66-68] Die ungünstigsten prognostischen Faktoren sind ein hohes Alter des Patienten, ein schlechter Karnofski-Index und ein nicht rezidierbarer Tumor. [31] Mit chirurgischer Resektion, Strahlentherapie und Chemotherapie liegt die mittlere Überlebenszeit bei 14,6 Monaten, die Überlebensrate nach zwei Jahren bei 27% und nach fünf Jahren bei 9,8%. [1, 69] Da nicht immer eine optimale Therapie erfolgen kann, überleben durchschnittlich weniger als 5% der Patienten fünf Jahre. [70] Deutlich wird die Wichtigkeit des Alters als prognostischer Faktor bei Betrachtung der relativen Überlebensraten der verschiedenen Altersgruppen. Die relative Zwei-Jahresüberlebensrate für die unter 20 jährigen liegt bei 27,9%, nimmt mit dem Alter stetig ab und liegt bei den über 75 jährigen bei 1,42%. [22]

1.2 Stammzellen

Stammzellen sind definiert als Zellen, die sowohl die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen als auch zur Generierung reifer Zellen bestimmten Gewebes. [71] Pluripotente embryonale Stammzellen leiten sich von der inneren Zellmasse der Blastozyste ab und können sich zu allen Zelltypen der drei Keimblätter entwickeln. Von ihnen leiten sich auch die multi- und unipotenten somatischen Stammzellen ab, die für die Entstehung der verschiedenen Gewebe und Organe zuständig sind. Sie verbleiben ein Leben lang in jeweils kleiner Anzahl in den verschiedenen Geweben und sind verantwortlich für Reparaturen nach Zellschädigung [72] sowie für das physiologische Gleichgewicht beim Zellumsatz. [73] Dort befinden sie sich an speziellen Orten, den so genannten Stammzellnischen, die sich durch eine spezielle Mikroumwelt charakterisieren. Diese Mikroumwelt ist wichtiger Bestandteil in der Regulation der Stammzellaktivität. [72]

1.2.1 Das Tumorstammzell-Modell

Traditionelle Ansichten gehen davon aus, dass alle Zellen in einem Tumor in der Lage sind, einen anderen Tumor hervorzurufen (siehe Abb. 1a). [74] Die Tumorstammzell-Theorie dagegen geht davon aus, dass nur eine kleine Population eines Tumors in der Lage ist, einen neuen Tumor hervorzurufen und diesen zu erhalten (siehe Abb. 1b). [12, 75] Diese kleine Population besteht aus einem Zelltyp, der die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzt. Die Zellen werden Tumorstammzellen oder stammzellähnliche Zellen genannt. Aus diesem Zelltyp geht auch der Rest des Tumors hervor, der phänotypisch unterschiedliche und zum Teil differenziertere Zellen besitzt. [74] Das Hervorbringen dieser Zellen wird, in Analogie zur Stammzelldifferenzierung, Pseudodifferenzierung genannt. Die so entstandenen Zellen haben selbst die Fähigkeit zur Pseudodifferenzierung und Selbsterneuerung verloren. [71]

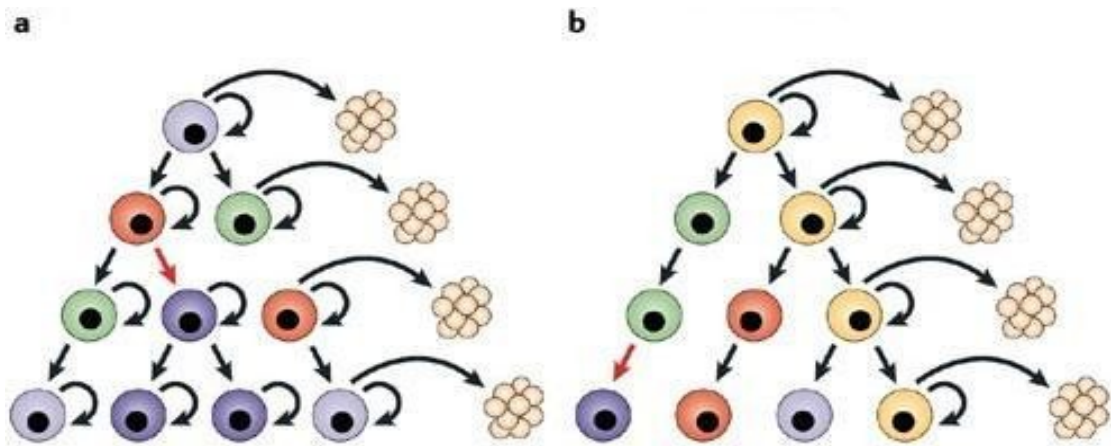


Abb.1: a) Schema zur traditionellen Sichtweise der Tumorentstehung; b) Schema zur Tumorentstehung nach der Tumorstammzelltheorie [76]

Da normale Stammzellen und Tumorstammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, lag die Vermutung nahe, dass Tumorstammzellen die Signalwege der Stammzellen nutzen könnten. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass verschiedene Wege, die zuerst mit Karzinomen assoziiert wurden, auch in der Regulation normaler Stammzellen gefunden werden konnten. [71] Dazu gehören der Notch- [77], der Sonic-Hedgehog- [78] und der Wnt-Signalweg [79]. Sie alle sind bei der Regulation der Selbsterneuerung von Stammzellen beteiligt und spielen bei der Krebsentstehung eine Rolle.

Bis jetzt konnte noch nicht geklärt werden, ob Tumorstammzellen von Stammzellen abstammen [74] oder doch von differenzierten Zellen, die sich durch Reprogrammierung oder Dedifferenzierung Stammzeleigenschaften angeeignet haben [80]. Der Ursprung aus Stammzellen wäre nicht unwahrscheinlich, da diese im Vergleich zu anderen Zellen relativ lange leben. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass sich multiple Mutationen ansammeln, die in einer malignen Entartung enden könnten. [81]

1.2.2 Tumorstammzellen in Glioblastomen

Die Existenz von Tumorstammzellen wurde erstmals 1997 für die akute myeloische Leukämie nachgewiesen. [82] Danach konnten in soliden Tumoren, wie dem Mamma-Karzinom, Tumorstammzellen identifiziert werden. [83] Inzwischen gelang auch in hirneigenen Tumoren, wie Medulloblastomen [84], Ependymomen [85] und Glioblastomen [9, 80], der Nachweis.

Gehirntumorstammzellen werden durch die Befähigung zur Selbsterneuerung, der Fähigkeit, nach orthotopischer Transplantation neue Tumore zu initiieren, und der Eigenschaft, sich in Zellen mit neuronalen, astrozytären oder oligodendrogialen Phänotyp zu differenzieren, definiert. Weiter charakterisieren sie sich durch die Expression neuronaler Stammzellantigene und dadurch, dass sie als nicht-adhärenente Spheren wachsen, wenn man sie unter serumfreien Bedingungen mit epidermalen und fibroblastischen Wachstumsfaktoren kultiviert. [12] Spheren sind dreidimensionale runde Zellgebilde, die nicht-adhärenent wachsen.

Gunther et al. etablierten 2008 unter neuronalen Stammzellbedingungen aus neun verschiedenen Glioblastomen Zelllinien mit Stammzeleigenschaften. Diese konnten nach ihrem Phänotyp in zwei Untergruppen eingeteilt werden:

Die Zellen der ersten Gruppe, GS3, GS8, GS5 und GS9 genannt, charakterisieren sich durch einen vollständigen stammzellähnlichen Phänotyp mit einem *in-vitro*-Wachstum als Spheren. Außerdem konnte eine Expression der für die Neuroentwicklung wichtigen Gene festgestellt werden. Durchflusszytometrisch konnte ein Anteil von 1,9 bis 6,4% CD133+ Zellen nachgewiesen werden [12]. CD133 ist ein transmembranes Glykoprotein [18], das als Marker für die Identifikation und Isolation von Stamm- und Progenitorzellen in verschiedenen Geweben dient. Eine typische Eigenschaft dieses Proteins ist eine schnelle Herunterregulierung bei Zelldifferenzierung. [86] Desweiteren konnten eine ausgedehnte neurogliale Differenzierungsfähigkeit und eine Tumorinitiierung *in vivo* mit invasivem Wachstum zu 100% festgestellt werden. [12]

Die Zellen der zweiten Gruppe, GS1, GS2, GS4, GS6 und GS7 genannt, zeigten nur einen eingeschränkten stammzellähnlichen Phänotyp. Hier dominierte vor allem die Expression Matrix-bezogener Gene. Es konnten außer bei der GS2-Zelllinie keine CD133+ Zellen nachgewiesen werden. Sie zeigten

ein semi-adhärentes oder adhärentes Wachstum *in vitro* und konnten *in vivo* nur bedingt Tumore initiieren. [12]

1.2.3 Klinische Bedeutung der Stammzelltheorie

Tumorstammzellen in Glioblastomen zeigen eine relative Resistenz gegenüber Radiotherapie [10] und Chemotherapie [11]. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass Patienten trotz zunächst radiologisch nachweisbarem Therapieansprechen Rezidive und Tumorprogression erleiden. Eine auf Tumorstammzellen zielgerichtete Therapie könnte die Effektivität der Behandlung verbessern (Abb. 2). [87] Es werden verschiedene Therapieansätze diskutiert. Dazu gehören: Angriff auf die vaskuläre Nische der Tumorstammzellen [59, 88], Angriff über spezifische Moleküle der Zelloberfläche, Blockade bestimmter Signalwege, Angriff auf Transkriptionsfaktoren und Induktion der Differenzierung [87] sowie das Ansprechen auf die Photodynamische Therapie, das den Inhalt dieser Arbeit darstellt.

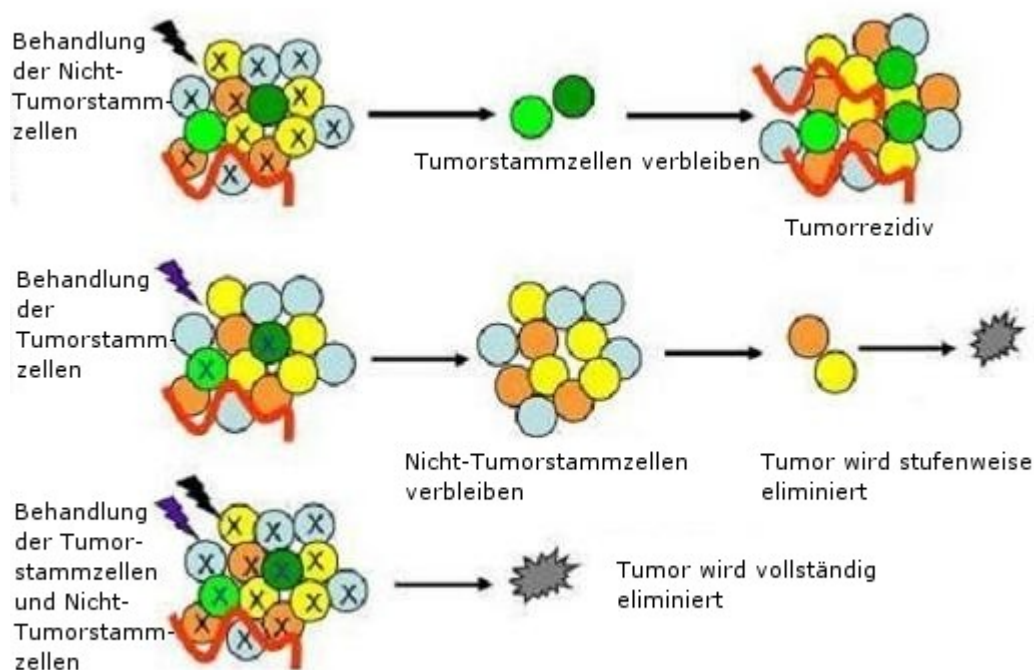


Abb.2: Vergleich zwischen der Behandlung von Nicht-Tumorstammzellen, von Tumorstammzellen und von Tumorstammzellen und Nicht-Tumorstammzellen auf der Grundlage der Tumorstammzelltheorie. Abbildung verändert nach L. Chen et al [87]

1.3 Photodynamische Therapie mit 5-Aminolävulinsäure

Die Photodynamische Therapie (PDT) beinhaltet die systemische oder lokale Gabe eines sich in den Tumorzellen anreichernden Photosensibilisators. Anschließend findet eine Bestrahlung mit Licht spezifischer Wellenlänge statt, die eine photochemische Reaktion zur Folge hat. [89] Dieses Konzept wurde erstmals vor ca. 100 Jahren erwähnt, als Herman von Tappheiner und Oscar Raab den letalen Effekt von Acridin-Orange in Kombination mit Licht auf Pantoffeltierchen beschrieben. [90]

1.3.1 Prinzip der PDT

5- δ -Aminolävulinsäure (ALA) ist ein Vorläufermolekül in der Hämbiosynthese, die in allen eukaryoten Zellen des Körpers ablaufen kann (Abb. 3). Durch verschiedene Enzyme des Hämstoffwechsels entsteht im vorletzten Schritt Protoporphyrin IX (PPIX), welches ein effektiver Photosensibilisator ist. Das aus diesem im letzten Schritt entstehende Häm wirkt über eine negative Rückkopplung hemmend auf die ALA-Synthese. [91] Wenn ALA exogen zugeführt wird, wird dieser Kontrollmechanismus umgangen und PPIX akkumuliert in der Zelle. Diese Akkumulation geschieht vor allem in Geweben mit einem ausgeprägten Zellumsatz. Gründe dafür könnten eine reduzierte Ferrochelataseaktivität [92, 93] und eine gesteigerte Aktivität der Porphobilinogen Deaminase in Tumoren sein. Komplette wurden die Gründe für die selektive Anreicherung in Tumoren noch nicht verstanden.[93]

Wenn sich nach einer Inkubationszeit genügend PPIX im Zielgewebe angereichert hat, fluoresziert es unter Anregung mit blauem Licht der Wellenlänge 400nm und hilft so z.B. in der Neurochirurgie bei hirneigenen Tumoren, eine möglichst vollständige Tumorresektion zu ermöglichen. [46, 94, 95]

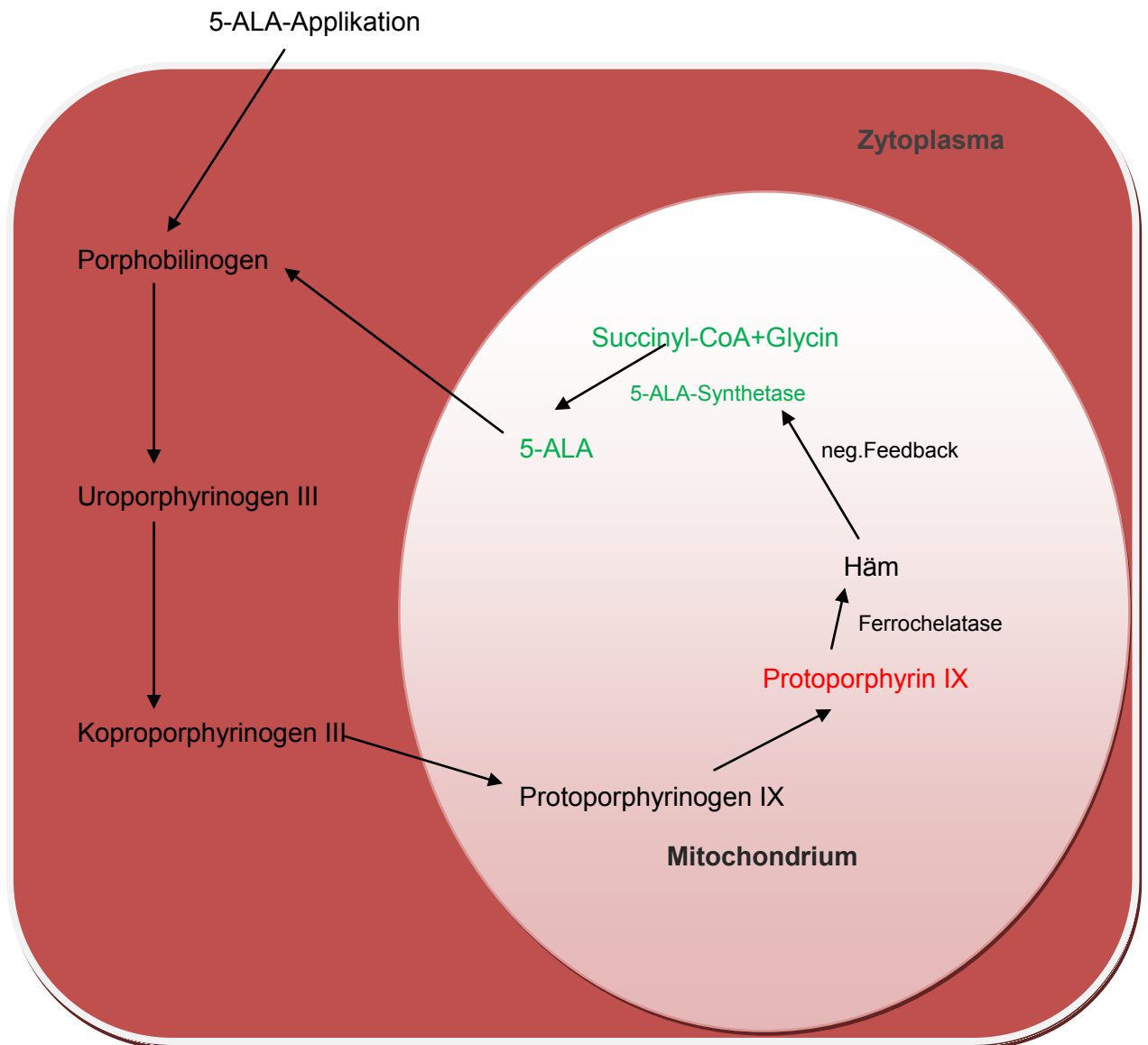


Abb.3: **Schematische Darstellung der Häm-Biosynthese** (ALA= 5-delta-Aminolävulinsäure, neg.=negativ, CoA=Coenzym A)

Zudem ist PPIX ein Photosensibilisator und kann durch Licht der Wellenlänge 635nm angeregt werden. [96] Dabei absorbieren die Moleküle des PPIX Photonen und werden dadurch in einen energiereicheren Zustand versetzt. [8, 97] Anschließend kann es zu zwei verschiedenen Reaktionen kommen. Bei der Typ I Reaktion reagiert der angeregte Photosensibilisator direkt mit Zellbestandteilen und es kommt durch eine Wasserstoffatomübertragung zur Entstehung von Radikalen. Diese Radikale wiederum reagieren mit Sauerstoff und so entstehen oxygenierte Produkte. [8] Bei der Typ II Reaktion kommt es zu einem Energieübertritt vom angeregten Photosensibilisatormolekül auf

niederenergetischen intrazellulären Sauerstoff. Durch diesen Prozess entstehen radikale Sauerstoffspezies, die Zellbestandteile durch Oxidation schädigen. [8, 96, 97] Den genauen Mechanismus der Tumordestruktion hat man zum derzeitigen Stand der Forschung noch nicht verstanden, jedoch geht man davon aus, dass Apoptose [98, 99] und Nekrose auftreten können, abhängig von der Inkubationszeit, der Medikamentenkonzentration und den Bestrahlungsparametern. [2] Daneben werden immunologische und inflammatorische Prozesse vermutet [100, 101], da der lokale Wirkungsradius des Singulett-Sauerstoffs mit $0,02\mu\text{m}$ relativ gering ist. [97]

1.3.2 Die Rolle von ALA und der PDT in der Neurochirurgie

ALA wird in verschiedenen Bereichen der Medizin für die Photodynamische Diagnostik (PDD) und Photodynamische Therapie (PDT) eingesetzt. So wird es zum Beispiel zur Detektion und Therapie von Tumoren in der Dermatologie [102], der Urologie [103], der Gastroenterologie [104], der Gynäkologie [105] sowie in der Pulmologie [106] genutzt.

In der Neurochirurgie wird ALA zur Fluoreszenz-gestützten Tumoresektion bei Gliomen verwendet. Dies erhöht die Sicherheit für den Operateur, den Tumor radikal operieren zu können, ohne dabei gesundes Gewebe zu entfernen. [107] Stummer et al. zeigten, dass mit dieser Methode der Tumorentfernung nach der Operation radiologisch kein Tumor mehr nachweisbar war, was für ein längeres progressionsfreies Intervall sorgte. [44, 46]

Zuerst wurde die PDT mit Erfolg experimentell an Gliomzelllinien und Sphäroiden getestet. [2] Heute wird sie in der Neurochirurgie vor allem bei rezidivierenden Gliomen angewendet. Dabei wird die Tumorkavität, nach präoperativer systemischer ALA-Gabe, intraoperativ bestrahlt. Es können auch inoperable Tumore über eine stereotaktische Bestrahlung behandelt werden. [3]

ALA ist für die Photodynamische Diagnostik und PDT das geeignete Mittel, da es sich selektiv im Tumorgewebe anreichert, das umliegende Hirngewebe nicht schädigt und keine nennenswerten Nebenwirkungen verursacht. [108] Zuvor verwendete Photosensibilisatoren (zum Beispiel Hämatoporphyrinderivate)

hatten zum Teil erhebliche Nebenwirkungen, wie eine bis zu mehreren Wochen andauernde kutane Phototoxizität. [109]

2 Fragestellung

Bisher gibt es noch keine Erfahrungen über die Wirkung der Photodynamischen Therapie mit ALA auf Tumorstammzellen von Glioblastomen. Ziel dieser Arbeit war es, dies zu überprüfen.

Dazu wurden Tumorstammzelllinien, die Gunther et al. 2008 aus verschiedenen Glioblastomen unter neuronalen Stammzellbedingungen etablierten und die mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Tumorbiologie, Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf bereitgestellt wurden, verwendet. Es wurde die potenteste Zelllinie GS5 mit vollständigem stammzellähnlichen Phänotyp ausgewählt. Diese wurde unter serumfreien Bedingungen kultiviert.

Zunächst sollte die ALA-Aufnahme der Glioblastom-Stammzellen isoliert als Vorbedingung für die PDT überprüft werden. Dies geschah an einem FACS-Gerät. Wir verglichen die ALA-Aufnahme der GS5-Zellen mit der ALA-Aufnahme der U373-Zellen.

Im nächsten Schritt wurde die Wirksamkeit der PDT auf die Tumorstammzelllinie GS5 im Vergleich zur Wirksamkeit auf die Kontroll-Glioblastomzelllinie U373 getestet. Dazu wurde der WST-1-Assay ausgewählt, der schon bei vorherigen Experimenten [4] als Vitalitäts- und Proliferationstest bei der Etablierung der Methode der PDT an Glioblastomzelllinien diente.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Material	Hersteller	Firmensitz
5-Aminolevulinic hydrochloride for biochemistry 500mg	Merck	Darmstadt
Aqua ad iniectabilia, 50ml	Delta Select	Dreireich
Aqua dest	Delta Select	Dreireich
B27 Supplement		
CD 133-1, PE, Clon:AC133/1	Miltenyi	Bergisch Gladbach
DMEM mit Phenolrot (+4,5g/l Glucose, +L -Glutamine,-Pyruvat)	Invitrogen	Darmstadt
DMEM ohne Phenolrot (+4,5g/lGlucose,+L-Glutamine,+25mM HEPES, -Sodium Pyruvat)	Invitrogen	Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich	Seelze
Ethanol 70% mit 1%Petrolether vergällt	Apotheke UKD	Düsseldorf
FCS Gold	PAA Laboratories	Cölbe
Fungizone	Invitrogen	Darmstadt
GIBCO DPBS 500ml	Invitrogen	Darmstadt
Glutamax	Invitrogen	Darmstadt
Heparin 25.000I.E.,5ml	Ratiopharm	Ulm
HSA	Octapharma	Langenfeld
IgG1 (mouse), FITC, Clon:679.1Mc7	Beckmann Coulter	Marseille
IgG1 (mouse), PE, Clon:679.1Mc7	Beckmann Coulter	Marseille
Neurobasal -A Medium, -Glutamine, -Phenolrot, 500ml	Invitrogen	Darmstadt
Neurobasal -A Medium, -L-Glutamine, +Phenolrot, 500ml	Invitrogen	Darmstadt
Paraformaldehyd, 4%	USB Corporation	Staufen
PenStrep (Penicillin Streptomycin)	Invitrogen	Darmstadt
Recombinant human EGF (Epidermal growth factor)	PeproTech	Hamburg
Recombinant human FGF-basic (Fibroblast growth factor)	PeproTech	Hamburg
RPMI-1640	Lonza	Verviers, Belgien
Sodium Pyruvat	Biochrom	Berlin
Trypanblau-Lösung, 4%	Sigma-Aldrich	Seelze
Trypsin EDTA 100ml	PAA Laboratories	Cölbe
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche	Mannheim

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Firmensitz
96-Well-Platten	Greiner BioOne	Frickenhausen
Cellstar tissue culture flasks (T75) mit Filtertop	Greiner BioOne	Frickenhausen
CellTrics Filter 50µm	Partec	Görlitz
Cryoröhrchen 2ml	Greiner BioOne	Frickenhausen
Falconröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner BioOne	Frickenhausen
Pasteurpipetten aus Glas		
Pipettenspitzen	StarLab	Ahrensburg

Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 50-1000µl	Eppendorf	Hamburg
Pipettenspitzen ep T.I.P.S. Filter 2-200µl	Eppendorf	Hamburg
Pipettenspitzen ep T.I.P.S. Racks 0,1-20µl	Eppendorf	Hamburg
Rundbodenröhrchen 5ml	BD Biosciences	Heidelberg
Safe lock Tubes 1,5ml	Eppendorf Biopur	Hamburg
Stripetten (5ml, 10ml, 25ml)	Corning	Wiesbaden

3.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller	Firmensitz
Autoklav	Systemec	Wettenberg
Bestrahlungsvorrichtung	Welabo	Düsseldorf
CO2 Inkubator	Binder	Tuttlingen
CO2 Inkubator	Thermo Scientific	Schwerte
Diodenlaser Ceralas	Biolitec	Jena
Durchflusszytometer Cytomics FC 500	Beckmann Coulter	Krefeld
Durchflusszytometer FACS Canto	BD Biosciences	Heidelberg
Kühlschrank, Typ Liebherr comfort	Liebherr	
Kühlschrank, Typ Öko Energiesparer	Privileg	
Lichtleiter Medlight FD1-947		
Microplate Reader, Modell 680	BIO-RAD	München
Mikroskop Axiovert25	Zeiss	Jena
Mikroskop CK2	Olympus	Hamburg
Mikroskop CKX41	Olympus	Hamburg
Multipette	Eppendorf	Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand	Wertheim
Pipetboy Pipetus	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
Research Pipette (0,5-10µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl, 1000-10.000µl)	Eppendorf	Hamburg
Sterilbank Lamin Air, Typ 1.8	Holten	Allerød, Dänemark
Sterilbank Lamin Air, Typ HA 2448	Heraeus	Hanau
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg
Tiefkühltruhe -80°C, Revco Ultima 2	Thermo Scientific	
Wasserbad	Köttermann	Uetze/Hänigsen
Wasserbad	Memmert	Schwabach
Zentrifuge 5810R	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen

3.2 Zellkultur

Die Tumorstammzelllinie GS5 wurde im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika mit freundlicher Genehmigung und intensiver Betreuung durch Herrn PD Dr. Sorg kultiviert. Die Gliomzelllinie U373, die als Vergleichszelllinie diente, wurde im Neuroonkologischen Labor der neurochirurgischen Klinik kultiviert.

3.2.1 Zellkultur der Stammzelllinien GS5

Die Kultivierung der Stammzelllinie GS5 erfolgte in T75-Kulturflaschen im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit. Als Medium wurde Neurobasal-A Medium mit Phenolrot inklusive Glutamax (10µl/ml), PenStrep (10µl/ml), Heparin (32I.E./ml), B27 (20µl/ml), EGF (20ng/ml), FGF (20ng/ml) und in den Sommermonaten zusätzlich mit Fungizone (10µl/ml) verwendet. Die Zellkulturflaschen der Größe T75 wurden mit insgesamt 20ml Medium befüllt.

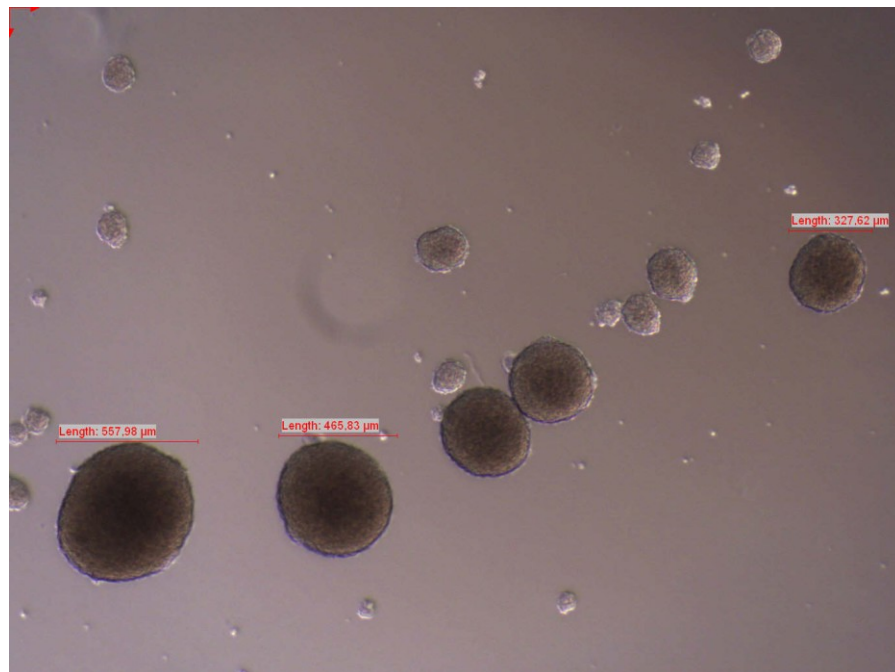


Abb.4: **Spheren der Zelllinie GS5** (20fache Vergrößerung) (µm= Mikrometer, Length= Länge, in diesem Fall Länge des Spheredurchmessers)

Das Zellwachstum der als Spheren wachsenden Zellen wurde mikroskopisch beobachtet. Wenn mehr als 50% der Spheren eine Größe von 200-500µm erreichten, wurden die Zellen passagiert (Abb. 4). Dies war meist nach 4-5 Tagen der Fall. Dazu wurde die komplette Zellsuspension in ein 50ml-Röhrchen überführt und bei 550g und 4°C für 7 Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 5ml Neurobasalmedium inklusive Glutamax, PenStrep und Fungizone aufgenommen und ausgiebig resuspendiert. Dann wurden 2,5ml dieser Zellsuspension in eine T75-Kulturflasche überführt, in die vorher 17,5ml Neurobasalmedium inklusive Glutamax, PenStrep und Fungizone vorgelegt worden waren. Heparin, B27, EGF und FGF in Mengen für 20ml wurden den T75-Kulturflaschen immer direkt hinzugefügt. Die Zellen wurden in der Regel alle 5-7 Tage passagiert. In der Zeit, kurz nachdem die Zellen aufgetaut worden waren, wuchsen sie langsamer, so dass nach 4-5 Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Die Prozedur erfolgte genauso wie beim Passagieren, nur wurden die kompletten 5ml, in die die Zellen nach dem Zentrifugieren aufgenommen wurden, in eine neue T75-Kulturflasche überführt. In diese Flasche wurden vorher nur 15ml Medium vorgelegt.

3.2.2 Zellkultur der Vergleichszelllinie U373

Die Kultivierung der Zelllinie U373 erfolgte in T75-Kulturflaschen im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit. Als Medium wurde DMEM mit Phenolrot inklusive 10% hitzeinaktiviertem FCS, 1% PenStrep und 1% NatriumPyruvat verwendet. Die Zellkulturflaschen der Größe T75 wurden mit insgesamt 20ml Medium befüllt.

Das Zellwachstum der adhärent wachsenden Zellen wurde mittels mikroskopischer Sichtkontrolle beobachtet und bei einer Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde zuerst das Medium mit einer Glaspipette abgesaugt, dann wurde die Flasche mit 10ml DPBS gespült und anschließend wurden 3ml Trypsin/EDTA in die Flasche gegeben. Dieses blieb für 3 Minuten bei 37°C auf den Zellen. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen vorsichtig vom Flaschenboden abgeschlagen. Das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde am Mikroskop kontrolliert und anschließend wurden zum Inaktivieren des Trypsin/EDTA 7ml DMEM inklusive aller Zusätze in die Flasche gegeben. Die so entstandenen 10ml Zellsuspension wurden gut

resuspendiert und je nach gewünschter Zellkonzentration wurden davon entsprechende Mengen in eine neue T75-Zellkulturflasche mit 20ml Medium überführt. Nach drei Tagen wurde das Medium gewechselt, indem das alte Medium abgesaugt, die Flasche mit 10ml DPBS gespült und anschließend wieder 20ml neues DMEM inklusive aller Zusätze auf die Zellen gegeben wurden. Bis eine Konfluenz von 80% erreicht wurde, dauerte es in der Regel sieben Tage.

3.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Sowohl die Stammzelllinie GS5 als auch die Kontrollzelllinie U373 wurden in einem Volumen von 1ml und einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 2ml Cryoröhrchen eingefroren. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert und anschließend in 500µl Einfriermedium, bestehend aus 8% HSA/RPMI-1640, aufgenommen. Nachdem man sie in ein Cryoröhrchen überführt hatte und 500µl DMSO/RPMI-1640 hinzugegeben worden waren, mussten die Zellen so schnell wie möglich bei -80°C eingefroren werden.

Um die Zellen aufzutauen, legte man 3ml Auftaumedium, bestehend aus 5% FCS/RPMI-1640, in ein 15ml-Röhrchen vor. Anschließend ließ man die Zellen antauen und überführte sie so schnell wie möglich in das Auftaumedium. Das Röhrchen wurde mit DPBS bis auf 15ml aufgefüllt und danach bei 550g und 4°C für 7 Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität in einem definierten Volumen Medium aufgenommen.

Von dieser Zellsuspension entnahm man 10µl und mischte sie mit 10µl Trypanblau. Trypanblau dringt in tote Zellen ein, sodass diese blau erscheinen, wohingegen vitale Zellen ungefärbt bleiben und sich deutlich hell darstellen. Diese Mischung wurde in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Die Zellen in zwei diagonal voneinander liegenden Großquadranten wurden gezählt, wobei man die Zellen auf den Außenlinien vernachlässigte (Abb. 5).

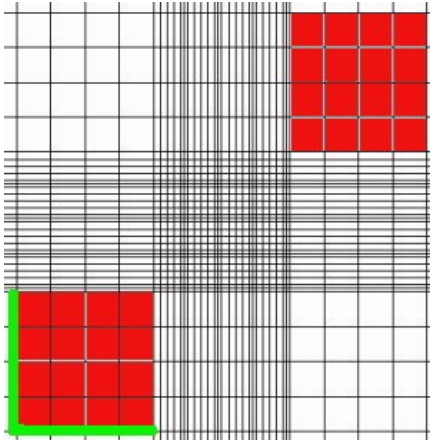


Abb.5: **Darstellung einer Neubauer Zählkammer.** Zwei Großquadranten wurden rot unterlegt; Die Außenlinien, auf denen die Zellen nicht mitgezählt wurden, wurden beispielhaft an einem Großquadranten grün markiert.

Die Zellzahl, die in beiden Quadranten gezählt wurde, wurde addiert. Um den Mittelwert zu erhalten, müsste man durch zwei dividieren. Da man aber mit zwei multiplizieren müsste, um den Verdünnungsfaktor heraus zu rechnen, heben sich diese Schritte gegenseitig auf. Ein Großquadrant der Zählkammer besitzt ein Volumen von $0,1\mu\text{l}$, sodass die Zellzahl zweier Großquadranten mit 10.000 multipliziert wurde, um den Wert für einen Milliliter zu erhalten. Um die Gesamtzellzahl zu erhalten, wurde dieses Ergebnis mit dem Gesamtvolumen multipliziert, in welchem die Zellen aufgenommen worden waren.

Nach dem Zählen wurde die gewünschte Zellzahl entnommen und in Kultur aufgenommen.

3.2.4 Einstellen einer Zellzahl in einem definierten Volumen

Bei der U373-Zelllinie wurde aus einer T75-Zellkulturflasche mit einer Konfluenz der Zellen von 80% zunächst das Medium abgesaugt. Dann wurde die Flasche mit 10ml DPBS gespült und anschließend mit 3ml Trypsin-EDTA für drei Minuten bei 37°C behandelt. Danach schlug man die Zellen vorsichtig vom Flaschenboden ab und kontrollierte das Ablösen am Mikroskop. Um die Aktivität des Trypsin-EDTAs zu stoppen, wurden 7ml DMEM mit Phenolrot und Zusätzen dazu gegeben. Diese Zellsuspension wurde in ein 50ml-Röhrchen überführt.

Die nicht adhärenzte Tumorstammzelllinie GS5 wurde einfach komplett mit ihrem Medium in ein 50ml-Röhrchen überführt.

Die 50ml-Röhrchen mit Zellsuspension wurden für 7 Minuten bei 550g und 4°C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen je nach Versuch entweder in einer definierten Menge farblosen Mediums inklusive Zusätze oder in DPBS aufgenommen, gut resuspendiert und anschließend gezählt. Das Zählen erfolgte vom Prinzip her wie oben beschrieben. Wurde die Zellzahl für einen WST-1-Assay eingestellt, wurden nicht zwei, sondern acht Großquadranten gezählt und die Zellen nicht 1:2 mit Trypanblau verdünnt, sondern 1:4. Diese Veränderungen mussten bei der Errechnung der Gesamtzellzahl beachtet werden.

Zunächst wurde die Gesamtzellzahl errechnet. Dann wurde die gewünschte Zellzahl mit dem Volumen multipliziert, in dem man die Zellen aufgenommen hatte. Dieses Ergebnis wurde durch die Gesamtzellzahl dividiert. Als Ergebnis erhielt man das Volumen, in dem sich die gewünschte Zellzahl befand.

Nun wurde die Menge Zellsuspension entnommen, die die gewünschte Zellzahl enthielt. Dann wurden die Zellen für 7 Minuten bei 37°C und 550g zentrifugiert und anschließend in eine definierte Menge des gewünschten Reagens aufgenommen.

3.2.5 Ansetzen der ALA-Verdünnungen

Zuerst wurde eine ALA-Stammlösung angesetzt. Mit dieser Stammlösung konnten alle weiteren ALA-Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen hergestellt werden.

Für das Ansetzen der Stammlösung wurden 10ml Aqua ad iniectabilia auf 500mg kristallines ALA gegeben, sodass eine ALA-Konzentration von 50mg/ml bzw. 50µg/µl entstand.

Um die weiteren Konzentrationen anzusetzen, wurden 50ml farbloses Medium ohne Zusätze in 50ml-Röhrchen gefüllt. Je nachdem, ob man einen Versuch mit GS5-Zelllinien oder mit U373-Zellen durchführen wollte, wurde farbloses Neurobasal bzw. farbloses DMEM als Medium verwendet. Aus diesen 50ml

Medium wurden entsprechende Mengen Medium wieder entnommen und durch die gleiche Menge an ALA-Stammlösung ersetzt. Wenn 1µl der ALA-Stammlösung, die 50µg ALA enthält, auf 50ml Medium gegeben wurde, lag danach 1µg ALA pro ml vor. Entsprechend lassen sich die anderen Konzentrationen berechnen (Tabelle 2). Da bei den Versuchen die Menge Medium bzw. Zellsuspension doppelt so groß war wie die Menge des zugegebenen ALA-Ansatzes, mussten die ALA-Ansätze dreifach konzentriert werden.

gewünschte ALA-Konzentration im Versuch	Aus dem 50ml-Röhrchen entnommene Menge Medium	In das 50ml-Röhrchen hinzugefügte Menge der ALA-Stammlösung	ALA-Konzentration im 50ml-Röhrchen
4µg/ml	12µl	12µl	12µg/ml
12,5µg/ml	37,5µl	37,5µl	37,5µg/ml
18µg/ml	54µl	54µl	54µg/ml
25µg/ml	75µl	75µl	75µg/ml
50µg/ml	150µl	150µl	150µg/ml
75µg/ml	225µl	225µl	225µg/ml
100µg/ml	300µl	300µl	300µg/ml

Tabelle 2: **ALA-Konzentrationen in den verschiedenen Versuchsschritten** (µl= Mikroliter, µg=Mikrogramm, ml= Milliliter, ALA= 5-delta-Aminolävulinsäure)

3.3 WST-1-Assay als Proliferationstest nach ALA und PDT

3.3.1 Allgemeine Informationen zum WST-1-Assay

Der WST-1-Assay (*water soluble tetrazolium*) ist ein nicht-radioaktiver Test zur Bestimmung von Zellproliferation, Zytotoxizität und Zellviabilität durch den Nachweis einer funktionierenden Atmungskette. Unter Zellviabilität versteht man die Gesamtaktivität einer Zellpopulation.

Dieser Test basiert auf der enzymatischen Umsetzung des hellrot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) zum dunkelrot gefärbten Formazan durch Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase System. Diese Farbveränderung kann photometrisch gemessen und ausgewertet werden, da ein Anstieg des Formazans direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen korreliert.

3.3.2 Ausplattieren der Zellen

Für das Ausplattieren der Zellen wurde zunächst eine Zellsuspension mit definierter Zellzahl angesetzt. Dann wurden pro Zelllinie drei 96-Well-Mikrotiterplatten nach einem festen Schema befüllt.

Für diesen Versuchsaufbau wurden 5000 U373-Zellen pro Well benötigt. Ein Well wurde mit 100µl Zellsuspension befüllt, sodass eine Suspension mit 5×10^4 Zellen/ml angesetzt werden musste. Als Medium wurde farbloses DMEM inklusive aller Zusätze verwendet. Von den Tumorstammzellen benötigte man 10.000 Zellen pro Well, sodass eine Zellsuspension mit 1×10^5 Zellen/ml angesetzt wurde. Hier wurde farbloses Neurobasalmedium mit allen Zusätzen benutzt. Es musste Medium mit Zusätzen verwendet werden, da die Zellen den mehrere Tage dauernden Versuch andernfalls nicht überlebten.

Alle Platten wurden nach dem gleichen Prinzip befüllt. In die randständigen Wells wurden als Schutz vor Verdunstung 200µl DPBS gegeben. Sechs Wells befüllte man mit 100µl Medium ohne Zellen. Es wurde das gleiche Medium

verwendet, das auch für die Zellen auf dieser Platte zur Verwendung kam. Diese Wells dienten als Blank. Mit Hilfe des Blanks konnte die spontane Absorption bestimmt werden, die auftritt, wenn das WST-1 auf Zellkulturmedium trifft. Im letzten Schritt wurden die Versuchswells und die Kontroll-Wells mit 100µl der angesetzten Zellsuspension befüllt (Tabelle 3). Zwei von drei Platten wurden gemäß der Abbildung befüllt. Bei der dritten Platte wurde von den vier Versuchsblöcken nur der Block 1 befüllt.

Neben den Versuchsblöcken mussten zwei Wells freigelassen werden, da beim Bestrahlen mit Laserlicht Streustrahlung entstand.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
2	PBS	Blank	Kontr.			1	1			3	3	PBS
3	PBS	Blank	Kontr.			1	1			3	3	PBS
4	PBS	Blank	Kontr.									PBS
5	PBS	Blank	Kontr.									PBS
6	PBS	Blank	Kontr.			2	2			4	4	PBS
7	PBS	Blank	Kontr.			2	2			4	4	PBS
8	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Tabelle 3: **Befüllungsschema einer 96-Well-Mikrotiterplatte**

PBS=200µl DPBS pro Well

Blank=100µl farbloses Medium mit Zusätzen ohne Zellen

Kontr.=100µl farbloses Medium mit Zusätzen inklusive 5.000 bzw. 10.000 Zellen

1-4=Versuchsblöcke mit 100µl farblosem Medium mit Zusätzen inklusive 5.000 bzw. 10.000 Zellen (µl=Mikroliter, Kontr.=Kontrolle, PBS= *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*)

Nach dem Ausplätieren wurden die Platten über Nacht in den CO₂-Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit gestellt. Insgesamt standen die Platten mit U373 Zellen 18 Stunden und die Platten mit GS5 Zellen 24 Stunden im Inkubator.

3.3.3 Inkubation der Zellen mit ALA

Nachdem die Zellen 18 bzw. 24 Stunden im Inkubator verbracht hatten, wurden die benötigten ALA-Ansätze hergestellt. Anschließend gab man diese Verdünnungen nach einem feststehenden Schema auf die Zellen.

Für den Versuch wurden ALA-Konzentrationen von 4 µg/ml, 12,5 µg/ml, 18 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml und 100 µg/ml benötigt. Die dreifach konzentrierten Ansätze wurden wie oben beschrieben angefertigt.

Nun wurden jeweils 50 µl einer ALA-Verdünnung, wie in der folgenden Tabelle (Tabelle 4) beschrieben, in die Versuchswells gegeben. Die Kontrollwells, der Blank und Block 1 der ersten Platte wurden mit 50 µl farblosen Mediums ohne Zusätze befüllt. Block 1 der ersten Platte wurde als Bestrahlungskontrolle benutzt (ALA 0 µg/ml mit normaler Bestrahlung). Dann wurden die Platten auf einem Thermomixer bei 37 °C und 700 rpm für 60 Sekunden gemixt. Anschließend inkubierten sie für 4 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator.

	Platte 1	Platte 2	Platte 3
Block 1	ALA 0 µg/ml	ALA 25 µg/ml	ALA 18 µg/ml
Block 2	ALA 4 µg/ml	ALA 50 µg/ml	nicht befüllt
Block 3	ALA 12,5 µg/ml	ALA 75 µg/ml	nicht befüllt
Block 4	ALA 18 µg/ml	ALA 100 µg/ml	nicht befüllt

Tabelle 4: **Befüllung der Versuchswells mit den verschiedenen ALA-Verdünnungen** (ml=Milliliter, µg=Mikrogramm, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

3.3.4 Prinzip der Bestrahlung mit einem Diodenlaser

Für die Bestrahlung der Zellen mit Lichtenergie wurde ein Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 635 nm benutzt. Die Bestrahlungsvorrichtung wurde extra für diese Art von Experimenten angefertigt. In ihr konnten 96-Well-Mikrotiterplatten fest justiert werden, sodass ein Verrutschen während des Experiments auszuschließen war. Die Vorrichtung ermöglichte die gleichzeitige Bestrahlung

von vier Wells. Zunächst wurde der Laser kalibriert. Anschließend wurde der Laserstrahl mit Hilfe eines Glasfaser-Lichtwellenleiters von unten auf die Platte gelenkt, da das Auftreffen des Laserstrahls auf eine konkave oder konvexe Flüssigkeitsoberfläche hohe Abweichungswahrscheinlichkeiten und viel Streustrahlung mit sich gebracht hätte. Am Ende des Glasfaser-Lichtwellenleiters wurde das Licht durch eine Diffusor-Linse in einem Kegel zerstreut.

In vorhergegangenen Arbeiten wurde eine Bestrahlungsdauer von 625 Sekunden mit einer Leistung von einem Watt als für diese Zwecke ideal herausgearbeitet. [4, 5] Daher wurden diese Parameter übernommen. Der Abstand zwischen der Diffusor-Linse und den zu bestrahlenden Wells lag bei 9,3cm. Der Laserstrahl wurde bei dieser Entfernung beim Auftreffen auf den Plattenunterboden auf eine Fläche von ca. 33cm² zerstreut. Die Bestrahlungsvorrichtung sorgte mit einer Blende dafür, dass nur vier Wells gleichzeitig im Licht lagen. Die vier zu bestrahlenden Wells nahmen eine Fläche von ca. einem cm² ein, sodass dort eine Leistung von ca. 30mW/cm² erreicht wurde. 2006 zeigten Hirschberg et al, dass eine Leistung von 25mW/cm² sicher zytotoxisch ist. [110]

3.3.5 Bestrahlung der Zellen im Versuchsaufbau

Nach der Inkubationszeit wurde zunächst ein Mediumwechsel durchgeführt. Dann wurden die Versuchsblöcke der Platten 1 und 2 bestrahlt. Block 1 der dritten Platte diente als ALA-Kontrolle (ALA 18µg/ml ohne Bestrahlung).

Bei den adhärennten U373 Zellen wurde das Medium vorsichtig mit einer Pipette aus den Wells entnommen. Dabei wurde die Platte in einem Winkel von ca. 30° gehalten und die Pipette beim Absaugen am Rand des Wells langsam nach unten bewegt. Die nicht adhärennten Tumorstammzelllinien mussten vor dem Mediumwechsel für 7 Minuten bei 550g und 4°C zentrifugiert werden. Dann wurde auch bei ihnen auf gleiche Art und Weise das Medium abgenommen. Anschließend wurden 150µl neues farbloses Medium ohne Zusätze auf die Zellen gegeben. Für die U373 Zellen wurde DMEM, für die Tumorstammzellen Neurobasalmedium benutzt. Für den Mediumwechsel wurden die Wells in Gruppen mit einer Anzahl von vier bis sechs Stück pro Gruppe

zusammengefasst. Erst wenn eine Gruppe fertig war, begann man mit der Prozedur bei der nächsten Gruppe, damit die Zellen nicht zu lange ohne Flüssigkeit auskommen mussten. Nach dem Mediumwechsel wurden die Platten zunächst für 60 Sekunden bei 37°C und 700rpm auf den Thermomixer und danach in die Bestrahlungseinheit gestellt. Die Versuchsblöcke wurden für 625 Sekunden bei einem Watt und einer Wellenlänge von 635nm in der Reihenfolge 1→2→3→4 bestrahlt. Nach der Bestrahlung stellte man die Versuchsplatten eine Stunde bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in den Inkubator.

3.3.6 Durchführung des WST-1-Assays mit anschließender Messung

Für den WST-1-Assay wurde zunächst das Reagenz in die Wells gegeben. Nach einer unterschiedlich langen Inkubationszeit konnten die Ergebnisse am BioRad-Reader gemessen werden.

Für den Test wird empfohlen pro 100µl Medium/Well 10µl WST-1-Reagenz hinzuzufügen. In diesem Versuchsaufbau lagen am Ende 150µl Medium in jedem Well vor. Es wurden 20µl WST-Reagenz in jedes Well hinzugegeben. Danach wurden die Platten für 60 Sekunden bei 37°C und 700rpm auf den Thermomixer gestellt. Anschließend kamen sie bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in den Inkubator.

Die Zellen der Linie U373 wurden nach 0,5h und 1h gemessen. Es stellte sich heraus, dass der ideale Messzeitpunkt bei 1 Stunde Inkubationszeit lag, sodass die weiteren Versuche mit dieser Linie nach 1h ausgewertet wurden. Die Tumorstammzelllinie GS5 wurde anfangs nach 0,5h, 1h, 1,5h, 5h, 6h, 11h und 24h gemessen. Für diese Zelllinie stellte sich ein guter Messzeitpunkt nach 12h heraus.

Vor jedem Messvorgang wurden die Platten für 60 Sekunden bei 37°C und 700rpm auf den Thermomixer gestellt. Dann wurden sie am BioRad-Reader ausgewertet, der zum Ablesen eine Wellenlänge von 415nm und als Referenzwellenlänge 655nm benutze.

3.4 Durchflusszytometrie

3.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Zellen hinsichtlich ihrer Zellgröße, Zellgranularität und ihrer Oberflächenmoleküle. Bei diesem Verfahren befinden sich die Zellen in einer Lösung, werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren dabei einzeln einen Laserstrahl. Ein Teil des Lichts wird beim Passieren der Zellen abgelenkt und von Photoelektronenvervielfachern gemessen. Durch das auftretende Vorwärtsstreulicht (FSC) kann die Zellgröße ermittelt werden. Die Zellgranularität wird durch das Seitwärtsstreulicht (SSC) bestimmt. Zusätzlich können Fluoreszenzfarbstoffe durch das Laserlicht angeregt werden, welche dadurch Licht spezifischer Wellenlänge emittieren. Dieses kann gemessen und zugeordnet werden. Dazu werden vorher bestimmte Zellbestandteile wie Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Antigene durch Antikörper markiert, die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Die Datenverarbeitung und Darstellung der Ergebnisse erfolgt durch verschiedene Softwareprogramme.

3.4.2 Durchflusszytometrische Messung der ALA-Aufnahme in Zellen

Die Zellen der Zelllinien GS5 und U373 wurden geerntet und es wurde eine Zellsuspension mit 5×10^5 Zellen/ml in farblosem Neurobasalmedium bzw. farblosem DMEM inklusive der entsprechenden Zusätze angesetzt. Jeweils ein Milliliter dieser Suspensionen wurde in ein Rundbodenröhrchen gegeben. Dann wurden dreifach konzentrierte ALA-Verdünnungen wie oben beschrieben mit $37,5 \mu\text{g ALA/ml}$ und $75 \mu\text{g ALA/ml}$ angesetzt. Von diesen Ansätzen wurden $500 \mu\text{l}$ auf den vorgelegten Milliliter Zellsuspension gegeben, sodass in den Rundbodenröhrchen ALA-Konzentrationen von $12,5 \mu\text{g/ml}$ bzw. $25 \mu\text{g/ml}$ vorlagen. Die Röhrchen wurden bei 37°C , 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit für zwei, vier oder sechs Stunden in einen Inkubator gestellt. Pro Zelllinie wurden für die drei verschiedenen Inkubationszeiten beide ALA-Konzentrationen getestet. Als Negativkontrolle dienten Röhrchen mit ungefärbten Zellen. Nach Ende der Inkubation gab man 1ml DPBS in die Röhrchen und zentrifugierte sie für 7 Minuten bei 550g und 4°C . Anschließend

wurden die Zellen in 350µl DPBS aufgenommen. Kurz vor der Messung ließ man die Zellsuspensionen über vorher mit DPBS angefeuchtete CellTrics Filter laufen.

Da die in vitale Zellen aufgenommene Aminolävulinsäure zu Protoporphyrin IX umgewandelt wurde, konnte man dieses mit Licht der Wellenlänge 500nm anregen und das emittierte Licht in einem Bereich von 630 bis 690nm messen. Dafür wurde das Durchflusszytometer Cytomics FC 500 benutzt. Diese spezielle Messung machte einen Umbau des Geräts nötig, sodass das Seitwärtsstreulicht außer Funktion gesetzt werden musste.

3.4.3 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten fand mit dem Programm Excel2007 von Microsoft statt. Die Berechnung der Signifikanzen wurde mit GraphPad Prism5 Version 5.01 (GraphPad, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Dazu wurde der Students T-Test verwendet (two-tailed, unpaired).

4 Ergebnisse

4.1 Durchflusszytometrische Messung der ALA-Aufnahme in Zellen

4.1.1 Allgemeine Informationen zur Messung

Zunächst wurde untersucht, ob die Zelllinien GS5 und U373 beide ALA aufnehmen. Falls die Zellen kein ALA aufgenommen hätten, wären die Experimente zur PDT nicht sinnvoll gewesen. Die Durchflusszytometrische Messung der ALA-Aufnahme wurde zunächst einige Male mit freundlicher Unterstützung des Institutes für Transplantationsmedizin und Zelltherapeutika in Düsseldorf getestet und optimiert. Die Messungen gestalteten sich relativ aufwändig, da an dem vorhandenen Gerät vor Messbeginn einige Umbauten vorgenommen werden mussten. Dabei musste auch die Einrichtung zur Messung des Seitwärtsstreulichts außer Funktion gesetzt werden. Abbildung 6 zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Auswertung der Zelllinie GS5. Zunächst wurden die ungefärbten Proben gemessen, um festlegen zu können, in welchem Bereich sich die nicht gefärbten Zellen befinden. Danach wurden die mit ALA gefärbten Zellen gemessen. In den Messdiagrammen befindet sich auf der Ordinate der Bereich *ALA red*. Eine Verschiebung auf der Ordinate nach oben aus dem für nicht gefärbte Zellen definierten Bereich in den *ALA red*-Bereich spiegelt das Vorhandensein von mit ALA gefärbten Zellen wider (Abb.6). Die Zellreihen wurden an zwei verschiedenen Versuchstagen getestet. Es wurden die ALA-Konzentrationen 12,5µg/ml und 25µg/ml verwendet. Für jede Konzentration wurden Inkubationszeiten von zwei, vier und sechs Stunden ausgewählt.

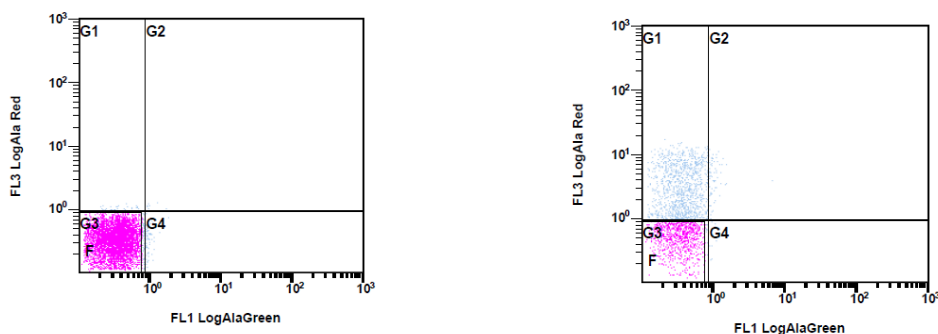


Abb.6: **Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Ergebnisse**; links unbehandelte GS5-Zellen und rechts GS5-Zellen, die sechs Stunden mit ALA 25µg/ml inkubierten. Rechts erkennt man die Verschiebung eines Zellanteils in den *ALA red*-Bereich (blaue Population), was für eine ALA-Anfärbung spricht (ml=Milliliter, µg=Mikrogramm, ALA= 5-delta-Aminolävulinsäure)

4.1.2 ALA-Aufnahme der GS5-Zellen

Die ALA-Aufnahme der GS5-Zellen zeigt Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten (Abb.7 und Tabelle 5). Der Versuch zeigt zwischen den ALA-Konzentrationen von 12,5µg/ml und 25µg/ml bei zwei Stunden Inkubationszeit knapp 10% mehr angefärbte Zellen in der Gruppe, die mit der höheren ALA-Konzentration behandelt wurde. Bei vier Stunden Inkubationszeit liegt der Unterschied bei 2% und bei sechs Stunden bei 28%. Innerhalb der Gruppe, die mit 12,5µg/ml ALA angefärbt wurde, lässt sich mit vier Stunden Inkubationszeit ein Maximum von 97% der Zellen anfärben. Bei zwei Stunden sind es nur 82% und bei sechs Stunden 71%. Die mit 25µg/ml ALA behandelte Gruppe zeigt nur Unterschiede zwischen knapp 92% bei zwei Stunden Inkubationszeit, 99% bei vier Stunden und knapp 100% bei sechs Stunden. Die ungefärbten Zellen zeigten keine nennenswerte Verschiebung in den positiven Bereich.

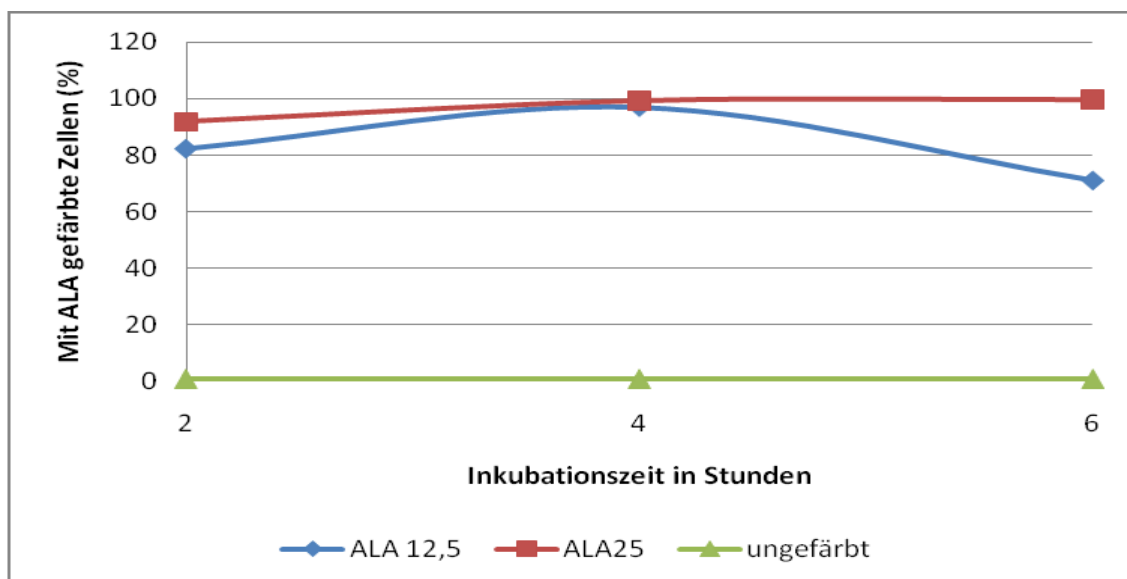


Abb. 7: ALA-Aufnahme der GS5-Zellen in Prozent bei ungefärbten, mit 12,5µg/ml oder 25µg/ml ALA gefärbten Zellen nach Inkubationszeiten von zwei, vier und sechs Stunden (ALA=5-delta-Aminolävulinsäure, µg=Mikrogramm, ml=Milliliter)

	2h	4h	6h
ALA 12,5 (%)	82,37	97,02	71,18
ALA 25 (%)	91,82	99,19	99,56
ungefärbt(%)	1,02	1,02	1,02

Tabelle 5: **ALA-Aufnahme der GS5-Zellen in Prozent bei ungefärbten Zellen, mit 12,5µg/ml oder 25µg/ml ALA gefärbten Zellen nach Inkubationszeiten von zwei, vier und sechs Stunden** (h=Stunde, ALA=5-delta-Aminolävulonsäure, µg=Mikrogramm, ml=Milliliter)

Der nächste Versuch zeigt insgesamt eine geringere ALA-Anfärbung mit einem Maximum von knapp 58% (Abb.8 und Tabelle 6). Auch hier nehmen die mit der höheren ALA-Konzentration behandelten Zellen mehr ALA auf. Bei zwei Stunden Inkubationszeit sind es bei den mit 25µg/ml ALA gefärbten Zellen knapp 23% mehr, bei vier Stunden 30% und bei sechs Stunden 10% mehr als in der mit 12,5µg/ml ALA behandelten Gruppe. Innerhalb der Gruppe, die mit 12,5µg/ml ALA gefärbt wurde, kann man einen stetigen Anstieg von knapp 18% gefärbten Zellen bei zwei Stunden Inkubationszeit auf 26% bei vier Stunden und knapp 48% bei sechs Stunden beobachten. In der mit 25µg/ml ALA behandelten Gruppe sieht man eine Erhöhung der Anzahl gefärbter Zellen von 40% bei zwei Stunden Inkubationszeit auf ein Plateau von 56% bei vier Stunden und knapp 58% bei sechs Stunden. Die ungefärbten Zellen zeigen auch hier keinen nennenswerten Anstieg in den positiven Bereich

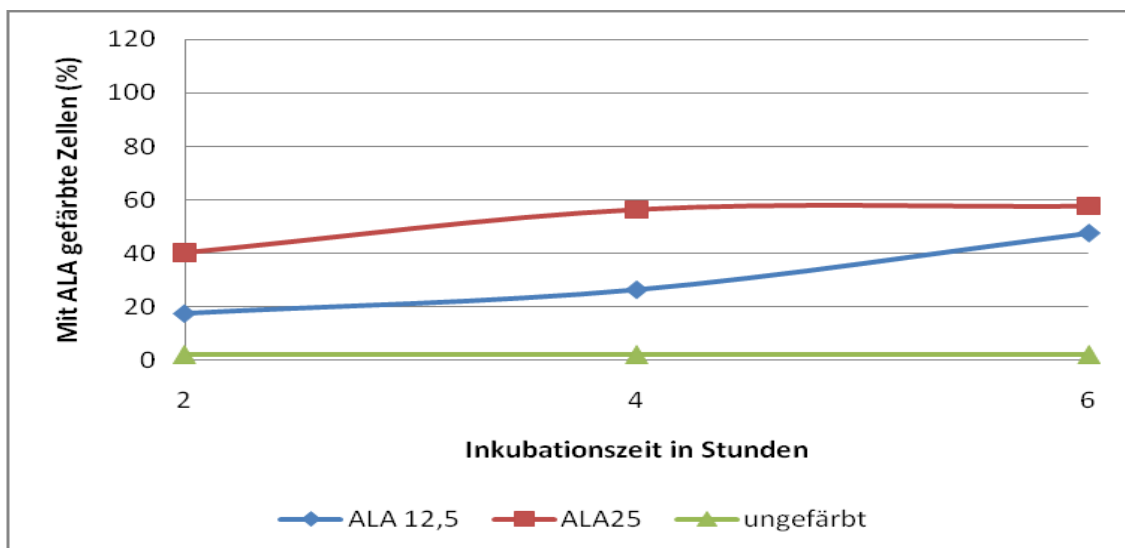


Abb. 8: **ALA-Aufnahme der GS5-Zellen in Prozent bei ungefärbten, mit 12,5µg/ml oder 25µg/ml ALA gefärbten Zellen nach Inkubationszeiten von zwei, vier und sechs Stunden** (ALA=5-delta-Aminolävulonsäure, µg=Mikrogramm, ml=Milliliter)

	2h	4h	6h
ALA 12,5 (%)	17,52	26,42	47,63
ALA 25 (%)	40,28	56,45	57,68
ungefärbt (%)	2,23	2,23	2,23

Tabelle 6: **ALA-Aufnahme der GS5-Zellen in Prozent bei ungefärbten Zellen, mit 12,5µg/ml oder 25µg/ml ALA gefärbten Zellen nach Inkubationszeiten von zwei, vier und sechs Stunden** (h=Stunde, ALA=5-delta-Aminolävulonsäure, µg=Mikrogramm, ml=Milliliter)

Insgesamt zeigen diese Versuche, dass die GS5-Zellen ALA aufnehmen und somit die Grundvoraussetzung für die weiteren Experimente zur PDT erfüllt ist. Ein klarer Zusammenhang zwischen ALA-Aufnahme und Inkubationszeit lässt sich nicht erkennen. Bei einer höheren ALA-Konzentration zeigt sich eine etwas höhere ALA-Aufnahme

4.1.3 ALA-Aufnahme der U373-Zellen

Die Versuche mit U373-Zellen zeigen Unterschiede für die verschiedenen ALA-Konzentrationen und Inkubationszeiten. Der Versuch (Abb.9 und Tabelle 7) zeigt für beide ALA-Konzentrationen keinen nennenswerten Unterschied bei einer Inkubationszeit von zwei Stunden. Bei einer vierstündigen Inkubationszeit lassen sich in der mit 25µg/ml ALA behandelten Gruppe knapp 10% und bei sechs Stunden 13% mehr Zellen anfärben. Beide Kurven liegen auf einem hohen Niveau. In der Gruppe, die mit 12,5µg/ml ALA versetzt wurde, zeigt sich von den Werten bei zweistündiger Inkubation ein leichter Abfall auf knapp 87% bei vierstündiger Inkubationszeit und ein weiterer Abfall auf knapp 74% bei sechs Stunden Inkubation. Die mit 25µg/ml ALA behandelten Zellen weisen einen minimalen Anstieg von zu 94% angefärbten Zellen nach zwei Stunden Inkubation auf knapp 97% nach vier Stunden auf. Nach sechs Stunden lassen sich nur noch knapp 87% anfärben. Die unbehandelten Zellen weisen keine nennenswerte Verschiebung in den positiven Bereich auf.

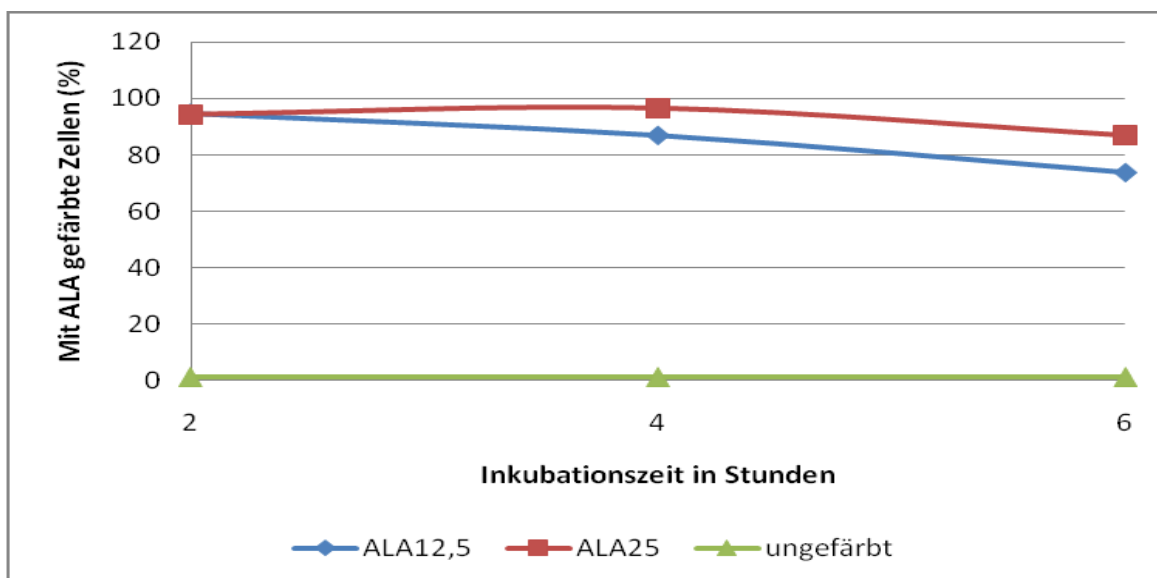


Abb. 9: ALA-Aufnahme der U373-Zellen in Prozent bei ungefärbten, mit 12,5µg/ml oder 25µg/ml ALA gefärbten Zellen nach Inkubationszeiten von zwei, vier und sechs Stunden (ALA=5-delta-Aminolävulonsäure, µg=Mikrogramm, ml=Milliliter)

	2h	4h	6h
ALA 12,5 (%)	94,68	86,85	73,65
ALA 25 (%)	94,36	96,56	86,94
ungefärbt (%)	1,24	1,24	1,24

Tabelle 7: ALA-Aufnahme der U373-Zellen in Prozent bei ungefärbten Zellen, mit 12,5µg/ml oder 25µg/ml ALA gefärbten Zellen nach Inkubationszeiten von zwei, vier und sechs Stunden (h=Stunde, ALA=5-delta-Aminolävulonsäure, µg=Mikrogramm, ml=Milliliter)

Der nächste Versuch (Abb.10 und Tabelle 8) zeigt bei zwei Stunden Inkubationszeit ebenfalls nur eine gering höhere ALA-Aufnahme von knapp 3% in der Gruppe, die mit 25µg/ml ALA behandelt wurde. Bei vier Stunden Inkubation liegt die Differenz bei knapp 29% und bei sechs Stunden bei knapp 33%. Die Kurve für die mit 25µg/ml ALA behandelten Zellen verläuft stetig steigend von knapp 46% nach zwei Stunden Inkubation auf 61% bei vierstündiger Inkubation, um dann bei knapp 85% nach sechs Stunden Inkubation zu enden. Die Kurve der mit 12,5µg/ml ALA behandelten Zellen fängt bei knapp 43% an, fällt dann auf knapp 33%, um nach sechsstündiger Inkubation bei knapp 52% zu enden. Die Kurve der unbehandelten Zellen liegt

etwas höher als bei den anderen Versuchen, aber immer noch deutlich unterhalb der behandelten Versuchsgruppen.

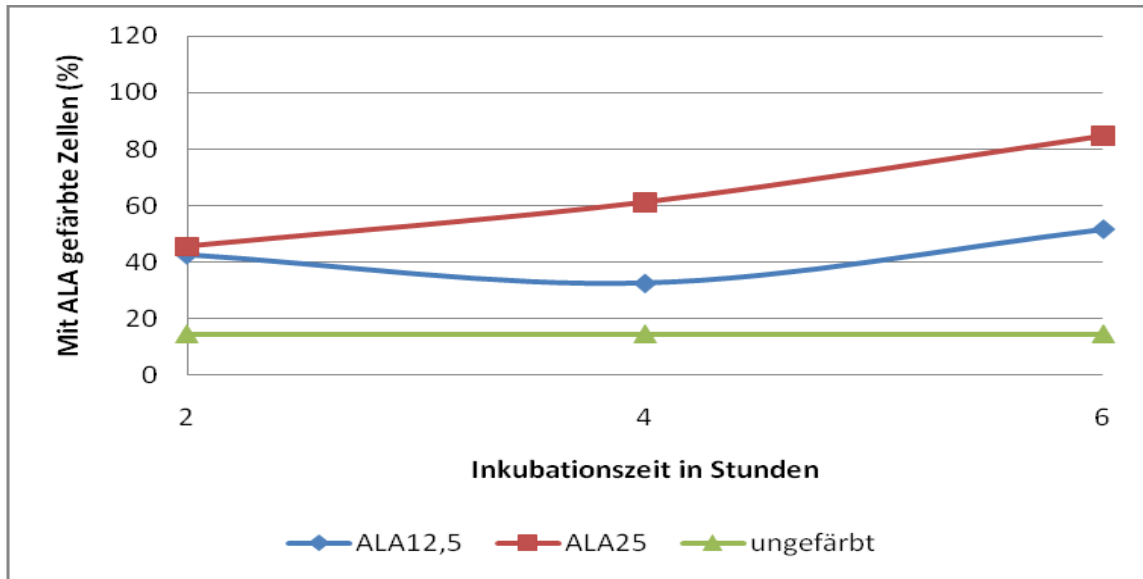


Abb. 10: ALA-Aufnahme der U373-Zellen in Prozent bei ungefärbten, mit 12,5µg/ml oder 25µg/ml ALA gefärbten Zellen nach Inkubationszeiten von zwei, vier und sechs Stunden (ALA=5-delta-Aminolävulonsäure, µg=Mikrogramm, ml=Milliliter)

	2h	4h	6h
ALA 12,5 (%)	42,84	32,73	51,84
ALA 25 (%)	45,61	61,26	84,76
ungefärbt (%)	14,69	14,69	14,69

Tabelle 8: ALA-Aufnahme der U373-Zellen in Prozent bei ungefärbten Zellen, mit 12,5µg/ml oder 25µg/ml ALA gefärbten Zellen nach Inkubationszeiten von zwei, vier und sechs Stunden (h=Stunde, ALA=5-delta-Aminolävulonsäure, µg=Mikrogramm, ml=Milliliter)

Diese Versuche zeigen, dass die U373-Zellen ALA aufnehmen und somit auch die Grundvoraussetzungen zur PDT erfüllen. Ein klarer Zusammenhang zwischen ALA-Aufnahme und Inkubationszeit lässt sich nicht erkennen. Bei einer höheren ALA-Konzentration zeigt sich eine etwas höhere ALA-Aufnahme.

4.2 WST-1 Test

4.2.1 Verhalten der GS5-Zelllinie im WST-1 Test

Vor der Durchführung der Versuche zur PDT wurde das Verhalten der GS5-Zelllinie im WST-1 Test untersucht, um einen möglichst idealen Ablesezeitpunkt für die folgenden Experimente zu finden. Um den zeitlichen Verlauf der Farbreaktion im WST-1 Test mit GS5-Zellen einschätzen zu können, wurden drei Vierfachansätze mit jeweils 10.000 Zellen pro Well angesetzt. Nach 30 Minuten wurde das WST-1-Reagenz hinzugefügt. Anschließend wurde die Extinktion nach 0,5h, 1h, 1,5h, 2,5h, 3,5h, 5h, 7h, 10h, 11h und 24h gemessen (Abb.11 und Tabelle 9). Es zeigte sich ein Extinktionsanstieg, der zunächst relativ steil verlief, um dann immer flacher zu werden. Im Zeitverlauf nahm die Standardabweichung immer weiter zu, sodass ein Ablesezeitpunkt von 12h als Kompromiss aus möglichst großer Extinktion und möglichst kleiner Standardabweichung als sinnvoll erachtet wurde. Da das WST-1 Reagenz mit dem Medium über die Zeit auch ohne vitale Zellen eine gewisse Extinktion entwickelte, wurde die Extinktion abzüglich der durchschnittlichen Extinktion des Blanks (in dem nur Zellmedium und WST-1 Reagenz enthalten waren) ergänzend dargestellt.

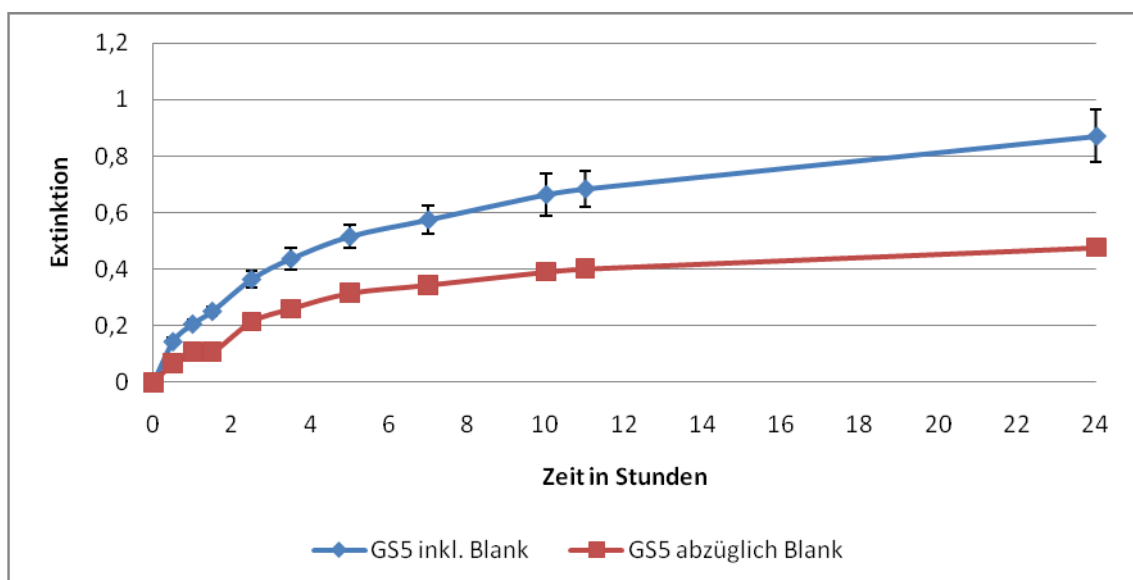


Abb. 11: Extinktionsanstieg im WST-1 Test mit GS5-Zellen im zeitlichen Verlauf; einmal inklusive Blank und Standardabweichung und einmal abzüglich des Blanks (WST-1= Water-soluble tetrazolium salt)

Zeit in Stunden	0,5h	1h	1,5h	2,5h	3,5h	5h	7h	10h	11h	24h
Mittelwert inklusive Blank	0,145	0,207	0,252	0,365	0,437	0,516	0,575	0,664	0,684	0,87
Standardabweichung inklusive Blank	0,011	0,013	0,015	0,028	0,037	0,041	0,048	0,074	0,065	0,093
Mittelwert abzüglich Blank	0,069	0,109	0,108	0,215	0,261	0,316	0,345	0,391	0,402	0,477

Tabelle 9: **Mittelwerte der Extinktion der GS5-Zellen inklusive und exklusive Blank und die Standardabweichung im zeitlichen Verlauf (h=Stunde)**

4.2.2 Entwicklung eines geeigneten Ablaufs für den WST-1 Test mit GS5-Zellen nach PDT

Um das Verhalten der GS5-Zelllinie im Versuchsablauf zur PDT zu beobachten, wurden verschiedene Abläufe getestet. Zunächst wurde eine Platte mit 10.000 GS5-Zellen pro Well nach der Versuchsvorlage angesetzt. Nach 30 Minuten wurde Aminolävulinsäure in verschiedenen Konzentrationen hinzu gegeben, sodass sich jeweils Vierfachansätze mit den ALA-Konzentrationen 0/4/12,5 und 18µg/ml ergaben. Dann inkubierte die Aminolävulinsäure wie oben beschrieben und anschließend wurden die Versuchsblöcke nach dem bekannten Schema bestrahlt und das WST-1 Reagenz hinzugefügt. Die Ablesung der Ergebnisse fand nach 12 Stunden statt. Für das folgende Diagramm (Abb.12 und Tabelle 10) wurde der Mittelwert der Kontrolle mit 100% gleichgesetzt und die anderen Werte prozentual darauf bezogen. Die Ergebnisse zeigten kaum Unterschiede bezüglich der Zellvitalität bei den verschiedenen ALA-Konzentrationen. Um den Zellen die Möglichkeit zu geben sich an die Situation in der Versuchsplatte zu gewöhnen, wurden die Ansätze für den nächsten Versuch 24h vor Zugabe der Aminolävulinsäure durchgeführt.

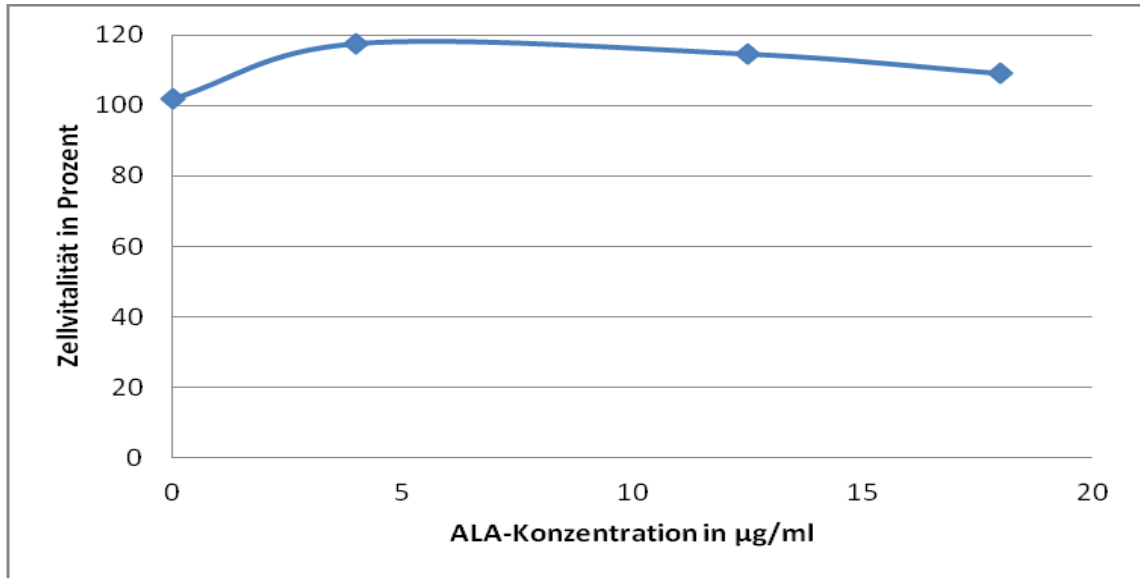


Abb. 12: **Zellvitalität der GS5-Zellen nach 12h in Prozent bei verschiedenen ALA-Konzentrationen**; die Zellen wurden 30 Minuten vor Versuchsbeginn auf die Platte gegeben und kamen in dieser Zeit in einen CO₂ Inkubator (µg=Mikrogramm, ml=Milliliter, h=Stunde ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

ALA-Konzentration (µg/ml)	0	4	12,5	18
Zellvitalität (%)	110,023	125,512	116,97	118,337
	105,125	109,339	115,49	107,062
	97,608	125,626	109,226	109,339
	94,647	110,251	116,97	101,708
Mittelwert (%)	101,85075	117,682	114,664	109,1115
Standardabweichung	7,00954884	9,11484953	3,69185554	6,93238461

Tabelle 10: **Zellvitalität und Mittelwert der Zellvitalität der GS5-Zellen in Prozent und Standardabweichung bei verschiedenen ALA-Konzentrationen mit 30Minuten Inkubation nach dem Aussähen** (µg=Mikrogramm, ml=Milliliter, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

Es wurde eine Platte auf die gleiche Art angesetzt. Bevor Aminolävulinsäure in die Wells gegeben wurden, kam die Platte allerdings für 24h bei 37 °C und 5% CO₂ in den Inkubator, damit sich die Zellen an die neue Situation gewöhnen konnten. Anschließend wurde genauso vorgegangen wie oben beschrieben. Die Extinktionen wurden nach 12h gemessen und der Mittelwert der Kontrolle wurde mit 100% gleichgesetzt. Die Versuchsergebnisse wurden prozentual darauf bezogen (Abb.13 und Tabelle11).

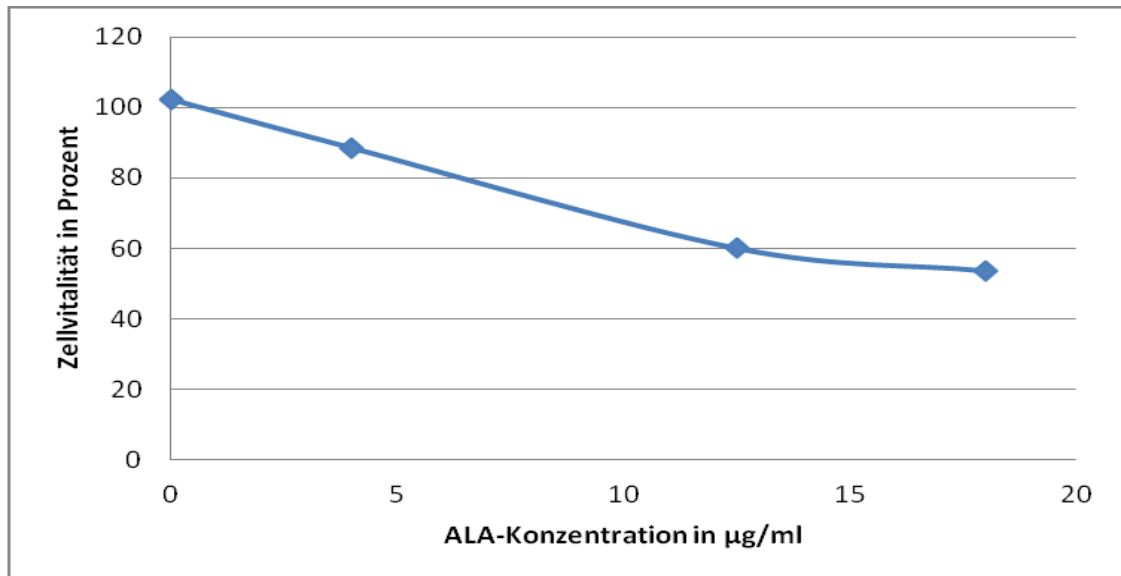


Abb. 13: **Zellvitalität der GS5-Zellen nach 12h in Prozent bei verschiedenen ALA-Konzentrationen**; die Zellen wurden 24h vor Versuchsbeginn auf die Platte gegeben und kamen in dieser Zeit in einen CO₂ Inkubator (µg=Mikrogramm, ml=Milliliter, h=Stunde, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

ALA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	4	12,5	18
Zellvitalität (%)	112,546	92,989	61,993	56,273
	91,144	91,328	64,760	59,225
	106,458	89,299	52,768	46,125
	99,077	80,443	60,701	52,952
Mittelwert (%)	102,306	88,515	60,056	53,644
Standardabweichung	9,258	5,589	5,145	5,629

Tabelle 11: **Zellvitalität und Mittelwerte der Zellvitalität der GS5-Zellen in Prozent sowie die Standardabweichung bei verschiedenen ALA-Konzentrationen mit 24h Inkubation nach dem Aussähen** (μg =Mikrogramm, ml=Milliliter, h=Stunde, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Platten. Ohne die Eingewöhnungszeit von 24 Stunden blieb die Kurve auf einem Niveau und es konnten keine Unterschiede in der Zellvitalität zwischen den verschiedenen ALA-Konzentrationen festgestellt werden. Mit einer Eingewöhnungszeit von 24h konnte ein Abfall der Kurve bei höheren ALA-Konzentrationen beobachtet werden. Für alle weiteren WST-1 Tests wurde die Zellsuspension 24 Stunden vor der Zugabe der Aminolävulinsäure auf die Versuchsplatten gegeben. Anschließend kamen alle Platten für 24 Stunden bei 37° C und 5% CO₂ in einen Inkubator.

4.2.3 Einführen eines Mediumwechsels

Es sollten auch höhere ALA-Konzentrationen getestet werden. Bei weiteren Versuchen wurden zusätzlich zu 4/12,5/18 und 25µg/ml ALA-Konzentrationen 50 und 75µg/ml verwendet. Für jede ALA-Konzentration wurden Vierfachansätze mit je 10.000 Zellen pro Well angesetzt. Vor Zugabe der Aminolävulinsäure standen die Versuchsplatten für 24h bei 36 ° C und 5% CO₂ in einem Inkubator. Die Messung fand 12h, nachdem das WST1-Reagenz hinzugegeben worden war, statt. Der Mittelwert der Kontrolle wurde mit 100% gleichgesetzt und die anderen Versuchsergebnisse wurden prozentual darauf bezogen. Es zeigte sich deutlich, dass die Zellvitalität in Prozent ab einer ALA-Konzentration von 25µg/ml wieder anstieg (Abb.14 und Tabelle12). Dieser Anstieg ist am ehesten auf die Eigenextension der Aminolävulinsäure zurückzuführen.

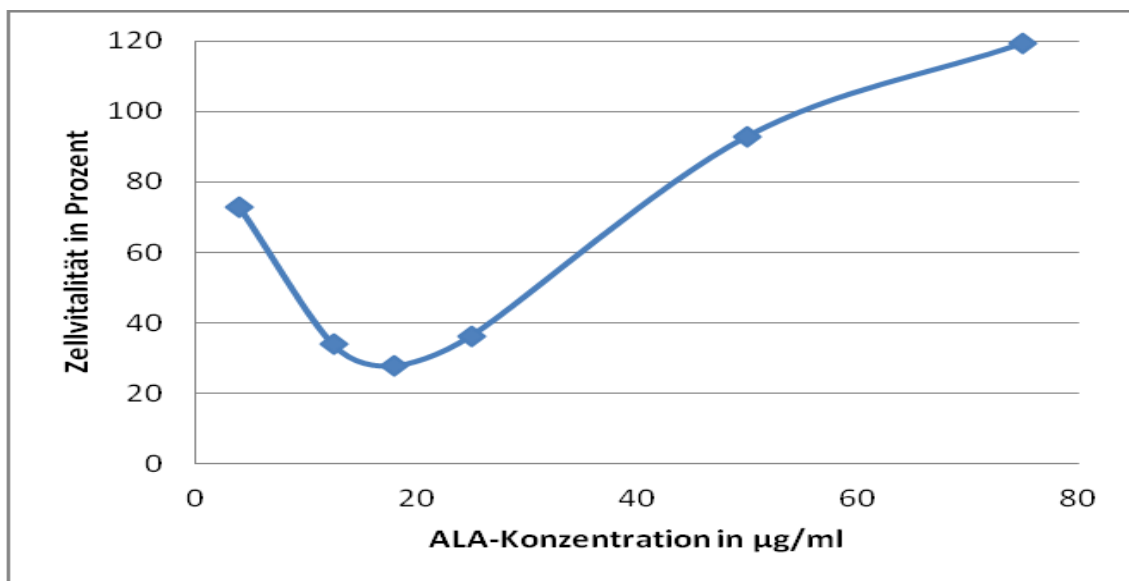


Abb. 14: Zellvitalität der GS5-Zellen nach 12h in Prozent bei verschiedenen ALA-Konzentrationen ohne Mediumwechsel vor der Bestrahlung. Ab einer ALA-Konzentration von 20µg/ml steigt die Kurve der Zellvitalität deutlich an (ALA=5-delta-Aminolävulinsäure, h=Stunde, µg=Mikrogramm, ml=Milliliter)

ALA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	4	12,5	18	25	50	75
Zellvitalität (%)	79,905	35,759	31,962	37,184	88,449	119,462
	67,247	36,234	25,000	36,234	81,478	121,677
	76,106	27,690	28,956	34,968	119,778	118,670
	68,829	35,601	25,158	36,867	82,278	117,880
Mittelwert (%)	73,022	33,821	27,769	36,313	92,996	119,422
Standardabweichung	5,995	4,096	3,340	0,980	18,124	1,636

Tabelle 12: **Zellvitalität und Mittelwert der Zellvitalität der GS5-Zellen nach 12h in Prozent sowie die Standardabweichung bei verschiedenen ALA-Konzentrationen** (ALA=5-delta-Aminolävulinsäure, h=Stunde, μg =Mikrogramm, ml=Milliliter)

Um das Messen der Eigenextinktion der Aminolävulinsäure auszuschließen, wurde in einem weiteren Versuch ein Mediumwechsel vor der Bestrahlung eingeführt. Das alte Medium wurde durch ein Medium ohne Zusätze ersetzt, sodass weder die Eigenextinktion des ALAs noch die der Mediumzusätze das Ergebnis beeinflussen konnten. Es wurden ALA-Konzentrationen von 0/4/12,5/18/25/50/75 und $100\mu\text{g/ml}$ verwendet. Für jede ALA-Konzentration wurde ein Vierfachansatz mit jeweils 10.000 Zellen pro Well angesetzt. Die Ablesung der Ergebnisse fand 12h nach Zugabe des WST1-Reagenz statt. Der Mittelwert der Kontrolle wurde mit 100% gleichgesetzt (Abb.15 und Tabelle13).

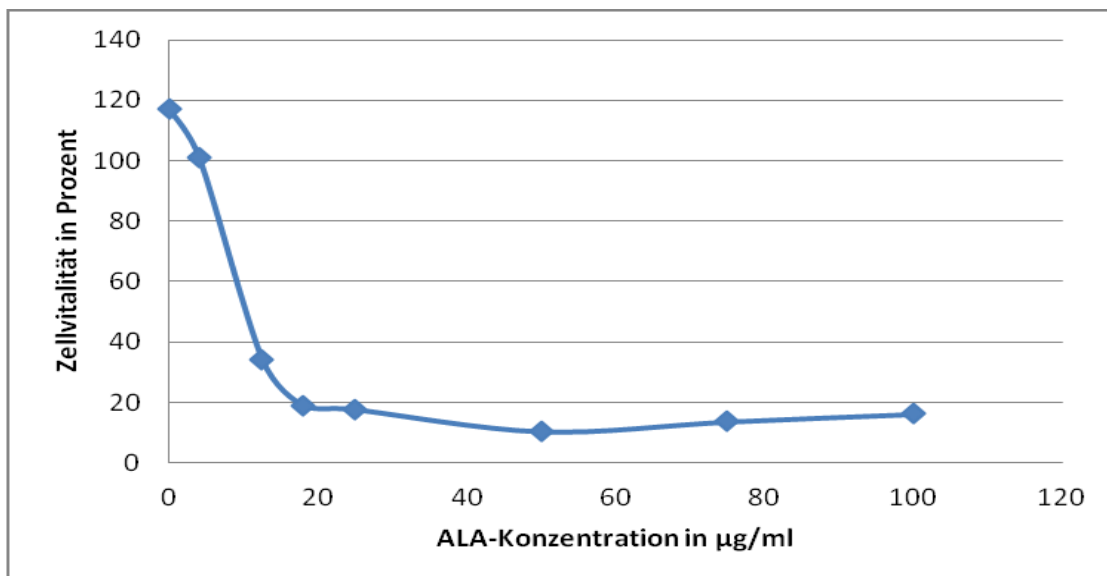


Abb.15: Zellvitalität der GS5-Zellen in Prozent 12h nach Zugabe des WST1-Reagenz bei verschiedenen ALA-Konzentrationen mit Mediumwechsel vor der Bestrahlung. Die prozentuale Zellvitalität bleibt auch bei höheren Konzentrationen auf einem niedrigen Niveau (h=Stunde, µg=Mikrogramm, ml=Milliliter, WST-1= *Water-soluble tetrazolium salt*, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

ALA-Konzentration (µg/ml)	0	4	12,5	18	25	50	75	100
Zellvitalität (%)	128,977	117,330	42,614	20,739	19,602	6,818	14,773	32,955
	111,648	87,216	25,852	21,306	14,489	13,636	6,341	13,068
	111,364	104,261	39,205	18,182	24,148	3,693	27,557	5,566
	117,045	95,170	29,261	16,193	12,784	17,614	5,966	13,068
Mittelwert (%)	117,259	100,994	34,233	19,105	17,756	10,440	13,659	16,164
Standardabweichung	8,238	12,927	7,957	2,370	5,153	6,333	10,118	11,739

Tabelle 13: Zellvitalität und Mittelwerte der Zellvitalität der GS5-Zellen 12h nach WST1-Reagenzzugabe sowie die Standardabweichung bei verschiedenen ALA-Konzentrationen (h=Stunde, µg=Mikrogramm, ml=Milliliter, WST-1= *Water-soluble tetrazolium salt*, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

Es zeigte sich ein schneller Abfall der Kurve bei steigenden ALA-Konzentrationen. Ab einer ALA-Konzentration von 18µg/ml pendelten sich die Werte auf einem Plateau ein. Der Mediumwechsel vor Bestrahlung wurde für alle weiteren Versuche beibehalten, da das Ergebnis auf diese Weise nicht

durch die Eigenextinktion von Zusätzen im Medium oder durch die Eigenextinktion der Aminolävulinsäure beeinflusst wurde.

4.2.4 WST-1 Test mit GS5-Zellen nach PDT inklusive eines Mediumwechsels

Es wurden mit drei verschiedenen Ansätzen Platten nach dem bekannten Schema befüllt. Bei jedem Ansatz wurden für die unterschiedlichen ALA-Konzentrationen von 0/4/12,5/18/25/50/75 und 100 µg/ml vier Wells mit je 10.000 Zellen pro Well angesetzt. Vor der Bestrahlung wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Ablesung der Extinktion fand 12 Stunden, nachdem das WST-1 Reagenz in die Wells gegeben worden war, statt. Der Mittelwert der Extinktion der Kontrollgruppe, die weder ALA noch Bestrahlung erhielt, wurde mit 100% gleichgesetzt. Auf diesen wurden die Versuchsergebnisse prozentual bezogen.

Die Ergebnisse der einzelnen Ansätze wichen leicht voneinander ab, da es durch die als Sphären vorliegenden Zellen sehr schwierig war, die Zellzahl exakt einzustellen. Man kann bei allen drei Ansätzen einen zunächst steilen Abfall der Zellvitalität bei steigender ALA-Konzentration beobachten. Ab einer ALA-Konzentration von 18µg/ml wird der Abfall plötzlich flacher, um sich bei den folgenden Konzentrationen auf ein niedriges Plateau einzupendeln (Abb.16 und Tabellen 14,15 und 16). Ein Zusammenhang zwischen ALA-Konzentration und Zellvitalität lässt sich erkennen. Für den Vergleich mit unbehandelten Zellen und Zellen die entweder nur bestrahlt oder nur mit ALA behandelt wurden, wurde eine ALA-Konzentration von 18µg/ml gewählt.

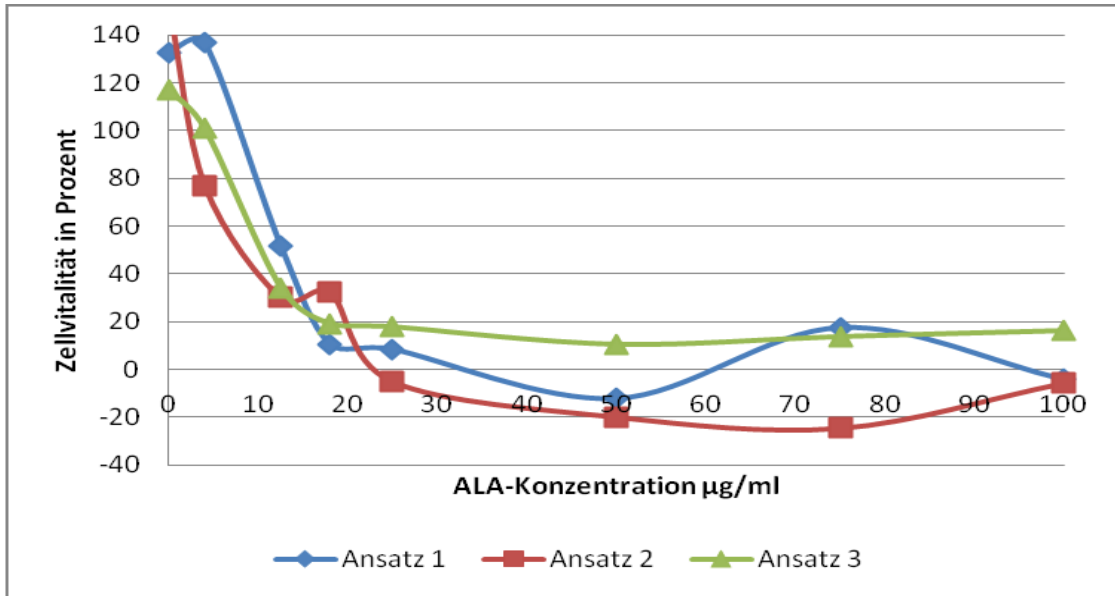


Abb. 16: Zellvitalität der GS5-Zellen in Prozent nach PDT mit unterschiedlichen ALA-Konzentrationen 12h nach Zugabe des WST-1 Reagenz. Die Kurven der Zellvitalität fallen zunächst steil ab, um sich dann ab einer ALA-Konzentration von 18µg/ml auf einem niedrigen Niveau einzupendeln (h=Stunde, µg=Mikrogramm, ml=Milliliter, WST-1= *Water-soluble tetrazolium salt*, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

ALA-Konzentration (µg/ml)	0	4	12,5	18	25	50	75	100
Zellvitalität (%)	138,462	144,729	60,696	11,966	18,803	-11,112	4,558	13,960
	122,222	154,131	39,601	1,994	4,558	-10,826	15,670	-8,547
	133,618	144,445	62,393	10,826	7,123	-15,954	10,826	-10,826
	135,897	103,134	44,445	17,664	3,134	-10,826	39,031	-11,396
Mittelwert (%)	132,550	136,610	51,784	10,613	8,405	-12,180	17,521	-4,202
Standardabweichung	7,164	22,766	11,464	6,478	7,126	2,520	15,044	12,171

Tabelle 14: Zellvitalität in Prozent sowie Mittelwerte und Standardabweichung der GS5-Zelllinie (erster Ansatz) 12h nach Zugabe des WST-1 Reagenz (h=Stunde, µg=Mikrogramm, ml=Milliliter, WST-1= *Water-soluble tetrazolium salt*, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

ALA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	4	12,5	18	25	50	75	100
Zellvitalität (%)	85,593	66,102	6,780	33,898	-10,169	-19,492	-26,271	0,847
	194,068	83,898	31,356	33,050	-22,034	-15,254	-16,949	-15,254
	236,441	122,034	46,610	35,593	-16,102	-21,186	-33,898	21,186
	93,220	35,593	35,593	26,271	27,966	-23,729	-21,186	-29,661
Mittelwert (%)	152,331	76,907	30,085	32,203	-5,085	-19,915	-24,576	-5,721
Standardabweichung	74,754	36,097	16,814	4,094	22,560	3,562	7,290	21,841

Tabelle 15: Zellvitalität in Prozent sowie Mittelwerte und Standardabweichung der GS5-Zelllinie (zweiter Ansatz) 12h nach Zugabe des WST-1 Reagenz (h=Stunde, μg =Mikrogramm, ml=Milliliter, WST-1= *Water-soluble tetrazolium salt*, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

ALA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	4	12,5	18	25	50	75	100
Zellvitalität (%)	128,977	117,33	42,614	20,739	19,602	6,818	14,773	32,955
	111,648	87,216	25,852	21,306	14,489	13,636	6,341	13,068
	111,364	104,261	39,205	18,182	24,148	3,693	27,557	5,566
	117,045	95,17	29,261	16,193	12,784	17,614	5,966	13,068
Mittelwert (%)	117,259	100,994	34,233	19,105	17,756	10,440	13,659	16,164
Standardabweichung	8,238	12,927	7,957	2,370	5,153	6,333	10,118	11,739

Tabelle 16: Zellvitalität in Prozent sowie Mittelwerte und Standardabweichung der GS5-Zelllinie (dritter Ansatz) 12h nach Zugabe des WST-1 Reagenz (h=Stunde, μg =Mikrogramm, ml=Milliliter, WST-1= *Water-soluble tetrazolium salt*, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

Bei allen Versuchen wurden ein Vierfachansatz, der nur mit ALA (18µg/ml) aber ohne Bestrahlung behandelt wurde, und ein Vierfachansatz, der bestrahlt wurde, aber kein ALA erhielt, mit angesetzt. Im folgenden Diagramm (Abb.17 und Tabelle 17) werden sowohl die prozentualen Zellvitalitäten dieser beiden Gruppen als auch die der Kontrolle mit der Zellvitalität der Gruppe verglichen, die ALA (18µg/ml) und Bestrahlung erhielt. Im Vergleich zur Kontrolle, zur Gruppe „nur ALA18“ und zur Gruppe „nur Bestrahlung“ zeigt sich in allen Fällen eine signifikante Senkung ($p < 0,0001$; $n=12$) der Zellvitalität in der Gruppe „ALA18+Bestrahlung“. Im Vergleich der Kontrolle mit der Gruppe „nur ALA18“ zeigt sich keine signifikante Reduzierung der prozentualen Zellvitalität ($p > 0,05$; $n=12$). Vergleicht man die Kontrolle mit der Gruppe „nur Bestrahlung“, erhält man sogar eine leicht signifikante Erhöhung der prozentualen Zellvitalität ($p=0,0156$; $n=12$). Dieser Versuch zeigt, dass die PDT bei der Glioblastomstammzelllinie GS5 zu einem signifikanten Abfall der Zellvitalität führt.

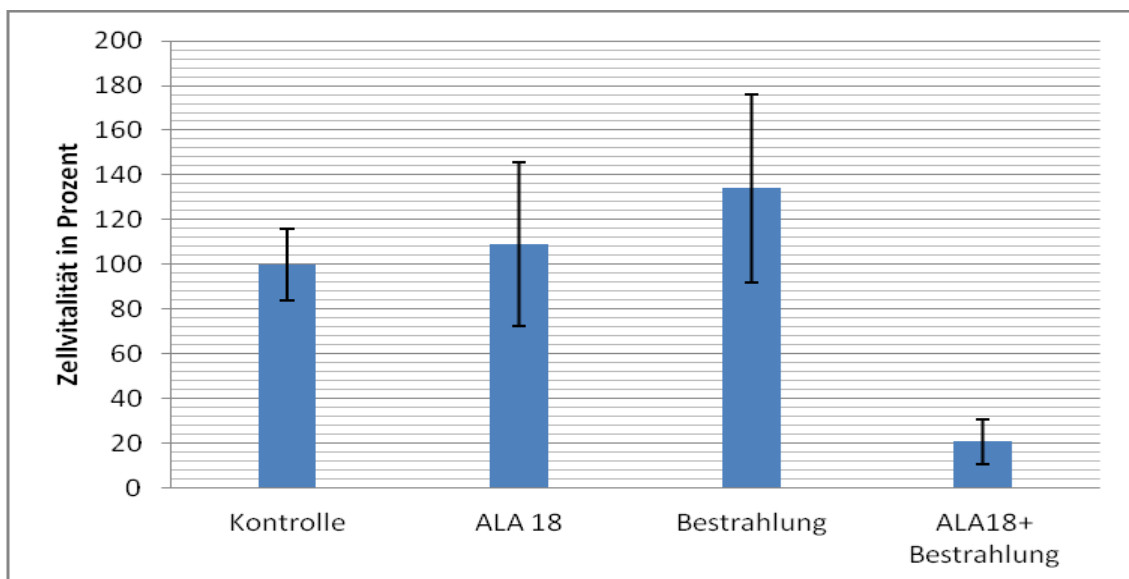


Abb. 17: Vergleich der Zellvitalität der GS5-Zelllinie in Prozent zwischen den Versuchsgruppen ohne Behandlung, nur mit ALA 18µg/ml, nur mit Bestrahlung und ALA 18µg/ml mit Bestrahlung und Darstellung der Standardabweichungen ($n=12$) (µg=Mikrogramm, ml=Milliliter, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

	Kontrolle	ALA18	Bestrahlung	ALA18+Bestrahlung
Zellvitalität (%)	76,271	201,695	85,593	33,898
	85,593	115,254	194,068	33,050
	124,576	128,813	236,441	35,593
	113,559	74,576	93,220	26,271
	113,636	84,091	128,977	20,739
	99,716	75,000	111,648	21,306
	103,977	81,534	111,364	18,182
	82,386	73,580	117,045	16,193
	85,755	102,564	138,462	11,966
	89,459	116,809	122,222	1,994
	118,519	123,077	133,618	10,826
	105,983	129,345	135,897	17,664
Mittelwert (%)	99,953	108,862	134,046	20,640
Standardabweichung	15,849575	36,5671381	42,2068733	10,1776794

Tabelle 17: Zellvitalität und dazugehörige Mittelwerte und Standardabweichungen der GS5-Zelllinie in Prozent zwischen den Versuchsgruppen ohne Behandlung, nur mit ALA 18µg/ml, nur mit Bestrahlung und ALA 18µg/ml und Bestrahlung und Darstellung der Standardabweichungen (n=12) (µg=Mikrogramm, ml=Milliliter, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

4.2.5 WST-1 Test mit U373-Zellen nach PDT

Der WST-1 Test nach PDT an Gliomzelllinien wurde in vorangegangenen Arbeiten bereits etabliert. Er wurde hier wieder aufgegriffen, um einen Vergleich zwischen einer Glioblastomstammzelllinie und einer Gliomzelllinie ziehen zu können. Zusätzlich diente er als Kontrolle für die Methodik. Es wurden insgesamt drei Versuche mit jeweils Vierfachansätzen für die ALA Konzentrationen 0/4/12,5/18/25/50/75 und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durchgeführt. In jedem Well befanden sich 10.000 Zellen. Auch hier wurden die Zellen 24h vor ALA-Zugabe in die Versuchsplatten gegeben und vor der Bestrahlung wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt. Die Ablesung der Extinktion fand 1h nach Zugabe des WST-1 Reagenz statt. Der Extinktionsmittelwert der Kontrollgruppe, die weder ALA noch Bestrahlung erhielt, wurde mit 100% gleichgesetzt. Darauf wurden die anderen Versuchsergebnisse prozentual bezogen. In der folgenden Abbildung (Abb.18 und Tabellen 18,19 und 20) lässt sich für alle Versuchstage ein recht steiler Abfall der Zellvitalität bei steigender ALA-Konzentration beobachten. Ab einer ALA-Konzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wird der Abfall flacher und pendelt sich bei Konzentrationen von 75 und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ALA auf einem Plateau ein.

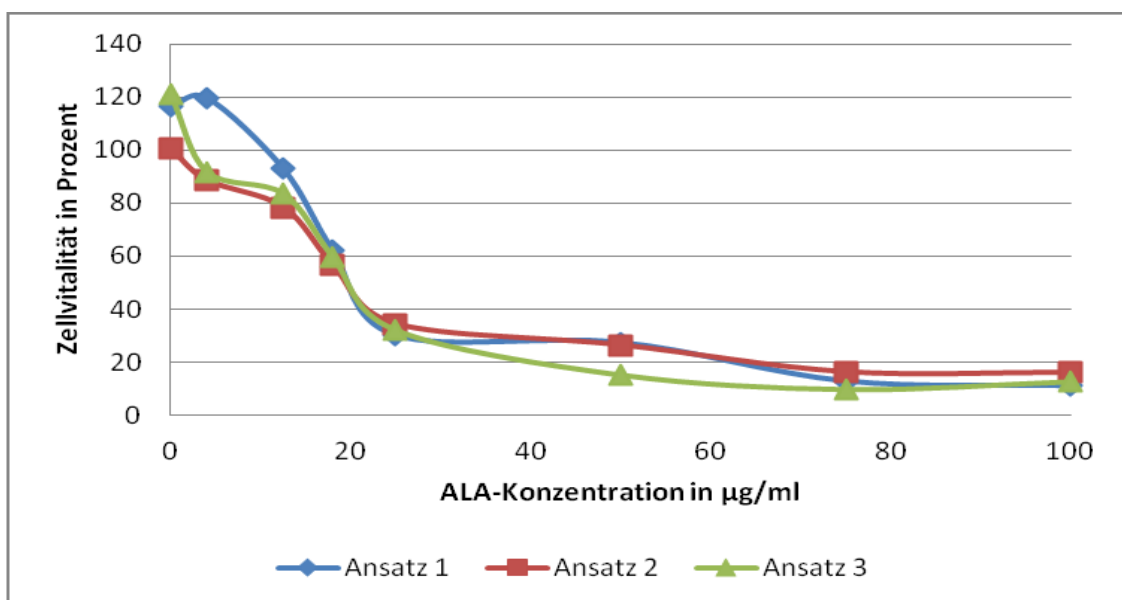


Abb. 18: Zellvitalität der U373-Zellen in Prozent nach PDT mit unterschiedlichen ALA-Konzentrationen 1h nach Zugabe des WST-1 Reagenz (h=Stunde, μg =Mikrogramm, ml=Milliliter, WST-1= *Water-soluble tetrazolium salt*, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

ALA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	4	12,5	18	25	50	75	100
Zellvitalität (%)	122,391	80,446	76,089	66,869	31,611	13,576	8,916	10,942
	115,603	91,996	92,300	68,896	34,245	14,792	11,854	14,995
	119,453	95,745	83,181	57,345	33,345	12,766	9,220	10,942
	126,444	98,683	82,472	45,491	28,977	19,452	8,612	13,576
Mittelwert (%)	120,973	91,718	83,511	59,650	32,045	15,147	9,651	12,614
Standardabweichung	4,586	7,997	6,671	10,699	2,319	2,989	1,490	2,015

Tabelle 18: **Zellvitalität in Prozent sowie Mittelwerte und Standardabweichung der U373-Zelllinie (dritter Versuchsansatz) 1h nach Zugabe des WST-1 Reagenz** (h=Stunde, μg =Mikrogramm, ml=Milliliter, WST-1= *Water-soluble tetrazolium salt*, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

ALA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	4	12,5	18	25	50	75	100
Zellvitalität (%)	102,055	95,810	83,083	55,336	35,415	24,190	15,890	16,680
	102,846	87,747	84,743	58,103	38,577	27,273	17,549	17,787
	95,889	87,036	72,648	58,893	28,695	26,967	16,354	13,123
	100,711	83,478	72,964	54,387	34,782	27,036	15,099	16,443
Mittelwert (%)	100,375	88,518	78,360	56,680	34,367	26,367	16,223	16,008
Standardabweichung	3,118	5,208	6,450	2,159	4,130	1,457	1,025	2,011

Tabelle 19: **Zellvitalität in Prozent sowie Mittelwerte und Standardabweichung der U373-Zelllinie (zweiter Versuchsansatz) 1h nach Zugabe des WST-1 Reagenz** (h=Stunde, μg =Mikrogramm, ml=Milliliter, WST-1= *Water-soluble tetrazolium salt*, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

ALA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	4	12,5	18	25	50	75	100
Zellvitalität (%)	128,878	114,797	96,420	65,632	25,298	24,702	12,291	8,950
	120,883	119,690	92,840	69,332	33,294	30,310	15,036	14,200
	109,427	124,344	93,556	57,876	30,430	24,224	10,382	12,530
	106,324	119,928	88,902	55,251	31,504	30,430	13,723	8,711
Mittelwert (%)	116,378	119,690	92,930	62,023	30,132	27,417	12,858	11,098
Standardabweichung	10,423	3,901	3,099	6,570	3,432	3,416	1,995	2,707

Tabelle 20: **Zellvitalität in Prozent sowie Mittelwerte und Standardabweichung der U373-Zelllinie (erster Versuchsansatz) 1h nach Zugabe des WST-1 Reagenz** (h=Stunde, μg =Mikrogramm, ml=Milliliter, WST-1= *Water-soluble tetrazolium salt*, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

Bei allen drei Versuchen wurden ein Vierfachansatz, der nur mit ALA (18µg/ml), aber ohne Bestrahlung behandelt wurde, und ein Vierfachansatz, der bestrahlt wurde, aber kein ALA erhielt, mit angesetzt. Das folgende Diagramm (Abb.19 und Tabelle 21) vergleicht die prozentuale Zellvitalität der Kontrolle, die weder ALA noch Bestrahlung erhielt, mit diesen beiden Gruppen und mit der Zellvitalität der Gruppe, die ALA (18µg/ml) und Bestrahlung erhielt. Im Vergleich zur Kontrolle, zur Gruppe „nur ALA18“ und zur Gruppe „nur Bestrahlung“ zeigt sich in allen Fällen eine signifikante Senkung ($p < 0,0001$; $n=12$) der Zellvitalität in der Gruppe „ALA18+Bestrahlung“. Im Vergleich der Kontrolle mit der Gruppe „nur ALA18“ zeigt sich keine signifikante Reduzierung der prozentualen Zellvitalität ($p > 0,05$; $n=12$). Vergleicht man die Kontrolle mit der Gruppe „nur Bestrahlung“, erhält man sogar eine leicht signifikante Erhöhung der prozentualen Zellvitalität ($p = 0,014$; $n=12$). Dieser Versuch zeigt, dass die PDT bei der Gliomzelllinie U373 für einen signifikanten Abfall der Zellvitalität sorgt.

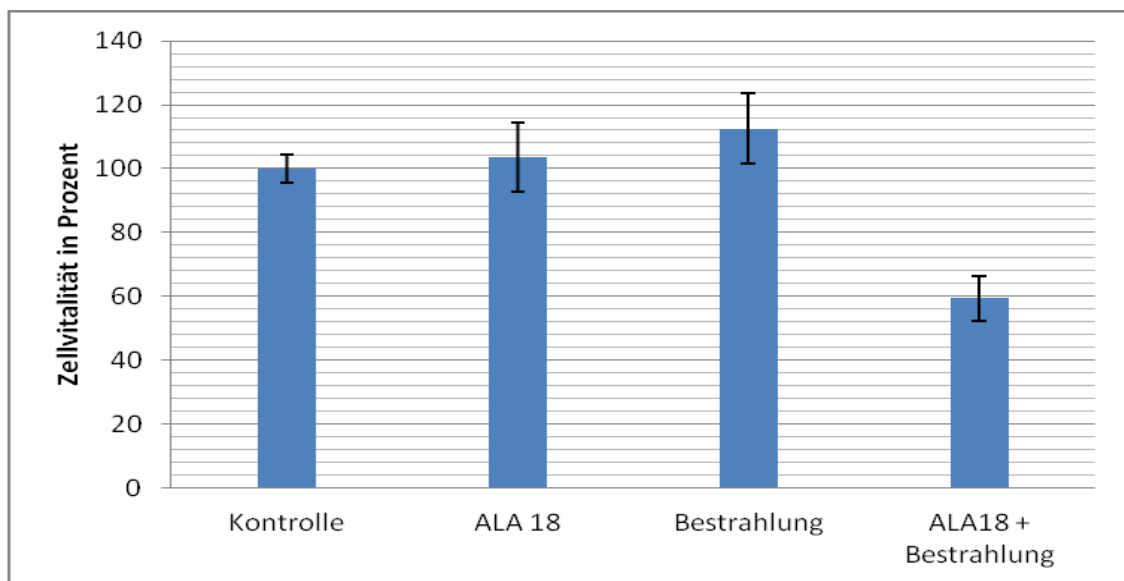


Abb. 19: Vergleich der Mittelwerte der Zellvitalität der U373-Zellen in Prozent zwischen den Versuchsgruppen ohne Behandlung, nur mit ALA 18µg/ml, nur Bestrahlung und ALA 18µg/ml und Bestrahlung und Darstellung der Standardabweichungen ($n=12$) (μg =Mikrogramm, ml=Milliliter, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

	Kontrolle	ALA18	Bestrahlung	ALA 18+Bestrahlung
Zellvitalität (%)	96,251	89,868	122,391	66,869
	93,921	90,578	115,603	68,896
	102,330	92,908	119,453	57,345
	107,294	95,441	126,444	45,491
	101,660	98,340	102,055	55,336
	99,842	102,767	102,846	58,103
	100,632	110,909	95,889	58,893
	97,945	103,004	100,711	54,387
	107,040	121,957	128,878	65,632
	94,272	108,831	120,883	69,332
	97,494	118,974	109,427	57,876
	101,313	109,905	106,324	55,251
Mittelwert(%)	100,000	103,624	112,575	59,451
Standardabweichung	4,342	10,709	11,092	7,033

Tabelle 21: Zellvitalität und dazugehörige Mittelwerte und Standardabweichungen der U373-Zellen in Prozent zwischen den Versuchsgruppen ohne Behandlung, nur mit ALA18 µg/ml, nur Bestrahlung und ALA 18µg/ml und Bestrahlung und Darstellung der Standardabweichungen (n=12) (µg=Mikrogramm, ml=Milliliter, ALA=5-delta-Aminolävulinsäure)

5 Diskussion

5.1 Tumorstammzellen und Glioblastom-Stammzellen

Tumorstammzellen konnten erstmals 1997 für die AML nachgewiesen werden. Sie machten nur einen sehr kleinen Anteil der Tumormasse aus, waren aber die einzigen Zellen, die eine AML übertragen konnten. [82] Inzwischen konnte auch für verschiedene solide Tumore, wie dem Glioblastom [18], dem Mamma-Karzinom [83] oder dem Medulloblastom [84] die Existenz von Tumorstammzellen erwiesen werden. Bis jetzt ist noch unklar, ob Tumorstammzellen aus differenzierten Zellen, die sich durch Dedifferenzierung und Reprogrammierung Stammzeleigenschaften angeeignet haben, entstehen [80] oder in Stammzellen ihren Ursprung haben [74]. Gehirntumorstammzellen sind zur Selbsterneuerung befähigt, können nach orthotoper Transplantation neue Tumore initiieren und sich zu Zellen mit neuronalen, astrozytären oder oligodendrogialen Phänotyp differenzieren. [12] Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Tumorstammzellen in Glioblastomen für eine Therapieresistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie verantwortlich sind. [10, 111] Dies könnte ein wichtiger Faktor für die trotz optimaler Therapie nur sehr geringe mittlere Überlebenszeit von 14,6 Monaten sein. [1] Aus diesem Grund ist es nötig, neue Therapieoptionen an Tumorstammzellen zu testen. Die PDT mit ALA wurde schon in anderen Arbeiten an Gliomzelllinien erfolgreich etabliert. [2] Diese Arbeit sollte ausgehend von der Tumorstammzelltheorie prüfen, ob insbesondere Tumorstammzellen von Glioblastomen ALA aufnehmen und auf PDT mit ALA reagieren. Dazu wurde die Glioblastomstammzelllinie GS5 mit vollständigem stammzellähnlichen Phänotyp ausgewählt, die von Gunther et al. 2008 unter neuronalen Stammzellbedingungen etabliert wurde. Diese Zellen zeichnen sich durch ein *in-vitro*-Wachstum als Spheren, eine ausgeprägte neurogliale Differenzierungsfähigkeit und eine Tumorinitiierung *in vivo* mit invasivem Wachstum zu 100% aus. Das für die Identifikation und Isolation von Stamm- und Progenitorzellen verwendete transmembrane Glykoprotein CD133 wurde bei diesen Zellen zu einem Anteil von 1,9 bis 6,4% nachgewiesen. [12] Zum Vergleich und zur Kontrolle der Methodik wurden die ALA-Aufnahme und der Einfluss der PDT mit ALA an der Gliomzelllinie U373 getestet. Für diese Zelllinie wurde schon in vorherigen Dissertationen die Methodik im neuroonkologischen Labor der Universität Düsseldorf etabliert und es konnte ein Effekt der PDT mit ALA im WST-1 Test nachgewiesen werden. Für die

alleinige Behandlung mit ALA oder Bestrahlung konnte dabei kein signifikanter Wert nachgewiesen werden. [4]

5.2 Durchflusszytometrische Messung der ALA-Aufnahme

Die ALA-Aufnahme wurde an der Gliomzelllinie U373 und an der Glioblastomstammzelllinie GS5 durchflusszytometrisch untersucht. Dafür wurden die ALA-Konzentrationen 12,5µg/ml und 25µg/ml verwendet, die jeweils für zwei, vier und sechs Stunden mit den Zellen inkubierten. Die Messungen gestalteten sich relativ aufwändig, da an dem vorhandenen Gerät einige Umbauten vorgenommen werden mussten. Unter anderem wurde die Messeinheit zur Erfassung des Seitwärtsstreulichtes außer Funktion gesetzt, was zur Folge hatte, dass die Granularität der Zellen nicht erfasst werden konnte. Die von den Zellen aufgenommene Aminolävulinsäure wurde intrazellulär zu Protoporphyrin IX umgewandelt. Dieses konnte mit Licht der Wellenlänge 514nm angeregt werden, um anschließend das emittierte Licht messen zu können. Stummer et al. wiesen 1998 die ALA-Aufnahme und Umwandlung zu Protoporphyrin IX in kultivierten C6 Gliomzellen von Ratten nach. [112] Sie nutzten zur Anregung des Protoporphyrin IX Licht der Wellenlänge 514nm und erfassten das emittierte Licht mit einem Filter. Um Effekte wie die Autofluoreszenz der Zellen messen zu können, blieb als Kontrolle immer eine Probe ungefärbt. Auch Uehlinger et al. verwendeten 2000 zur Detektion der Autofluoreszenz eine ungefärbte Kontrolle. [93] Gemessen wurde die Anzahl der Zellen, die ALA aufgenommen und dieses zu Protoporphyrin IX umgewandelt hat, und die Anzahl der Zellen, die kein ALA aufgenommen hat und somit auch kein Protoporphyrin bilden konnte. Daraus wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen von der Gesamtzahl der Zellen berechnet.

Die ALA-Aufnahme der GS5 Zellen und die intrazelluläre Umwandlung zu Protoporphyrin IX zeigten Unterschiede für die zwei Konzentrationen und die verschiedenen Inkubationszeiten. In beiden Versuchen nahmen bei einer ALA-Konzentration von 25µg/ml mehr Zellen ALA auf als bei einer Konzentration von 12,5µg/ml. Die Unterschiede lagen zwischen 2% bei vier Stunden Inkubationszeit und 28% bei sechs Stunden Inkubationszeit am ersten Versuchstag und zwischen 10% bei sechs Stunden und 30% bei vier Stunden

Inkubationszeit am zweiten Versuchstag. Am ersten Versuchstag lässt sich bei einer ALA-Konzentration von 25µg/ml ein geringer Anstieg von knapp 92% gefärbter Zellen bei zwei Stunden Inkubationszeit auf knapp 100% bei sechs Stunden Inkubation feststellen. Bei einer ALA-Konzentration von 12,5µg/ml stieg der Anteil gefärbter Zellen von 82% bei zwei Stunden Inkubationszeit auf 97% bei vier Stunden, um danach wieder auf 71% bei sechs Stunden abzufallen. Am zweiten Versuchstag konnte bei einer ALA-Konzentration von 25µg/ml bei zwei Stunden Inkubationszeit ein Anteil von 40% gefärbter Zellen nachgewiesen werden, der bei vier Stunden Inkubationszeit auf 56% und bei sechs Stunden Inkubation auf 58% anstieg. Bei einer ALA-Konzentration von 12,5µg/ml stieg der Anteil der gefärbten Zellen von knapp 18% bei zwei Stunden Inkubationszeit auf 26% bei vier Stunden und knapp 48% bei sechs Stunden Inkubation. Die ungefärbten Zellen zeigten einen Anteil von 1% am ersten Versuchstag und von 2% am zweiten Versuchstag, was durch die Autofluoreszenz der Zellen zu erklären ist.

Die ALA-Aufnahme der U373-Zelllinie zeigte am ersten Versuchstag nur geringe Unterschiede zwischen den zwei ALA-Konzentrationen. Bei einer Konzentration von 25µg/ml stieg der Anteil der gefärbten Zellen von 94% bei zwei Stunden Inkubationszeit auf knapp 97% bei vier Stunden, um dann bei sechs Stunden Inkubationszeit auf knapp 87% abzufallen. Bei einer ALA-Konzentration von 12,5µg/ml fiel der Anteil gefärbter Zellen von knapp 95% bei zwei Stunden Inkubationszeit auf knapp 87% bei vier Stunden und knapp 74% bei sechs Stunden Inkubationszeit. Am zweiten Versuchstag ist der Teil der Zellen, die ALA aufgenommen und umgewandelt haben, bei zwei Stunden Inkubationszeit mit knapp 43% bei einer ALA-Konzentration von 25µg/ml fast gleich groß wie bei 12,5µg/ml mit einem Anteil von knapp 46%. Bei der höheren ALA-Konzentration stieg der Anteil gefärbter Zellen auf 61% bei vier Stunden und knapp 85% bei sechs Stunden Inkubationszeit an. Bei einer ALA-Konzentration von 12,5µg/ml fiel der Anteil der Zellen, die ALA aufgenommen haben, bei vier Stunden Inkubation auf knapp 33% ab, um bei sechs Stunden Inkubationszeit wieder auf knapp 52% anzusteigen. Daraus erschließt sich, dass bei einer höheren ALA-Konzentration ein größerer Anteil der Zellen ALA aufnimmt und umwandelt. Welche Inkubationszeit die besten Ergebnisse liefert, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Zellen der beiden Zelllinien ALA aufgenommen haben. Des Weiteren lässt sich feststellen, dass bei der höheren ALA-Konzentration mehr Zellen ALA aufnahmen als bei der niedrigeren. Vor

allein bei der hohen ALA-Konzentration von 25µg/ml bilden die Kurven des prozentualen Anteils der Zellen, die ALA aufgenommen haben, eher ein Plateau als eine ansteigende Kurve. Auch Stummer et al. konnten 1998 für die ALA-Aufnahme bis 120 Minuten nach ALA-Zugabe bei C6 Gliomzellen einen plateauartigen Verlauf des prozentualen Anteils mit gefärbten Zellen feststellen. [112] In weiteren Arbeiten könnte man die Fluoreszenzintensität im zeitlichen Verlauf messen, die bei Stummer et al. über die Zeit zunahm. Um die Ergebnisse exakter reproduzieren zu können, wäre es von Vorteil, die Messmethodik so zu verändern, dass die Zellgranularität bestimmbar ist. So könnte man die Population exakter eingrenzen.

Ein weiterer zu beachtender Punkt ist die Enzymaktivität im Hämbiosyntheseweg. Man geht davon aus, dass sich Protoporphyrin IX vor allem in Zellen mit reduzierter Ferrochelataseaktivität anreichert. [93] Dazu könnte man diese Enzymaktivität in Tumorstammzellen messen und eventuell manipulieren.

5.3 Der WST-1 Test als Proliferationstest nach ALA und PDT

Der WST-1 Test ist ein Test zur Bestimmung von Zellproliferation, Zytotoxizität und Zellviabilität. Er nutzt dafür den Nachweis einer funktionierenden Superoxid Dismutase in den Zellen. Schon in vielen Arbeiten wurde dieser Test zur Erfassung der Zellviabilität und Zellproliferation verwendet. [113, 114] Auch nach Behandlung der Gliomzelllinien U373 und A172 mit ALA und PDT wurde er zur Bestimmung der Zellviabilität verwendet. [4] 2006 konnte eine sehr gute Korrelation zwischen dem WST-1 Test und der NBT-Methode (Nitro-Blau-Tetrazolium-Methode), die als Referenzmethode zum Nachweis der Superoxid Dismutase-Aktivität benutzt wurde, nachgewiesen werden. [115] Somit war dieser Test sehr gut für die Bestimmung der zytotoxischen Auswirkung von ALA und PDT im Vergleich zu unbehandelten oder nur mit einem Teilschritt behandelten Gruppen geeignet.

Zunächst musste das Verhalten der GS5 Zellen im WST-1 Test überprüft werden. Dazu wurden drei Vierfachansätze in einer 96-Well-Platte ausplattiert, um 30 Minuten später das WST-1 Reagenz hinzuzugeben. Anschließend wurde die Extinktion zehn Mal zwischen 0,5 und 24 Stunden gemessen. Für die GS5

Zellen ließ sich ein stetiger Anstieg der Extinktion über die Zeit feststellen. Es konnte ein Ablesezeitpunkt von 12 Stunden nach Reagenzzugabe ermittelt werden, da die Kurve nach diesem Zeitpunkt nur noch gering anstieg und die Standardabweichung noch nicht zu hoch war.

Anschließend wurde für die GS5 Zelllinie ein geeigneter Versuchsablauf entwickelt. Dazu wurden die Zellen genauso wie im Versuch mit ALA und PDT behandelt. Es stellte sich heraus, dass es von Vorteil war, die Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf die Wells der Versuchsplatte zu verteilen. So konnten sich die Zellen an die neue Umgebung gewöhnen. In weiteren Versuchen wurden ALA-Konzentrationen bis 100µg/ml getestet. Dabei fiel auf, dass ab einer ALA-Konzentration von 25µg/ml die Extinktion und so anscheinend auch die Zellvitalität wieder anstieg. Da dies unlogisch erschien, wurde ein Mediumwechsel vor der Bestrahlung eingeführt. Auf diese Weise konnte eine Autofluoreszenz durch hohe ALA-Konzentrationen ausgeschlossen werden. In den folgenden Versuchsdurchläufen stieg die Extinktion bei hohen ALA-Konzentrationen nicht mehr an, sondern pendelte sich erwartungsgemäß auf einem niedrigen Plateau ein.

Der Mediumwechsel vor Bestrahlung wurde für alle folgenden Versuche beibehalten. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchstage wichen leicht voneinander ab. Dies lässt sich durch die als Spheren vorliegenden GS5-Zellen erklären und die damit verbundene Schwierigkeit, die Zellzahl exakt einzustellen. Insgesamt verliefen die Kurven der einzelnen Versuchstage aber sehr ähnlich. Bis zu einer ALA-Konzentration von 18µ/ml fielen die Kurven recht steil ab, um sich bei noch höheren ALA-Konzentrationen auf einem niedrigen Plateau einzupendeln. Es zeigte sich eine signifikante Senkung der Zellvitalität ($p < 0,0001$; $n=12$) zwischen der Gruppe „ALA18 + Bestrahlung“ und den Kontrollgruppen „nur ALA18“, „nur Bestrahlung“ und „keine Bestrahlung, kein ALA“. Zwischen der Gruppe „nur ALA18“ und „nur Bestrahlung“ konnte im Vergleich zur Gruppe „keine Bestrahlung, kein ALA“ keine Signifikante Senkung der prozentualen Zellvitalität beobachtet werden. Dies macht deutlich, dass weder ALA noch Bestrahlung alleine für eine geringere Zellvitalität verantwortlich sind. Nur in Kombination kommt es zu einer Reduzierung der Anzahl lebendiger Zellen (siehe Abb. 22).

Zum Vergleich wurde der WST-1 Test in genau gleicher Art und Weise auch mit der Gliomzelllinie U373 durchgeführt. Lediglich die Inkubationszeit nach Zugabe des WST-1 Reagenz lag mit einer Stunde deutlich unter der Inkubationszeit der

Tumorstammzellen. Die drei Kurven der prozentualen Zellvitalität bei steigender ALA-Konzentration der einzelnen Versuchstage verliefen fast gleich. Es konnte ein recht steiler Kurvenabfall bis zu einer ALA-Konzentration von 25µg/ml beobachtet werden, der danach flacher wurde, um sich dann auf einem niedrigen Niveau zu halten. Im Vergleich zu den Gruppen „keine Bestrahlung, kein ALA“, „nur ALA18“ und „nur Bestrahlung“ liegt die prozentuale Zellvitalität der Gruppe „ALA18 + Bestrahlung“ signifikant niedriger ($p < 0,0001$; $n=12$). Im Vergleich der Gruppen „nur ALA18“ und „nur Bestrahlung“ zur Gruppe „keine Bestrahlung, kein ALA“ lässt sich keine signifikante Reduzierung der Zellvitalität feststellen. Dies zeigt auch hier, dass für eine erfolgreiche Verminderung der prozentualen Zellvitalität sowohl ALA als auch Bestrahlung nötig sind (siehe Abb. 24).

Mögliche zytotoxische Effekte, wie Wärmeentwicklung unter Bestrahlung, konnten durch die Kontrollgruppe „nur Bestrahlung“ ausgeschlossen werden. Selbst wenn während der Bestrahlung eine Wärmeentwicklung aufgetreten war, sorgte dies nicht für eine Reduktion der Zellvitalität. Hirschberg et al. stellten 2004 fest, dass eine Temperaturerhöhung bis 49°C keinen Einfluss auf das Überleben der von ihnen verwendeten Sphäroidmodelle hatte. Allerdings konnte ein synergistischer Effekt einer Hyperthermiebehandlung in Kombination mit PDT beobachtet werden. [116] Ob dieser synergistische Effekt bei unseren Versuchen eine Bedeutung hatte, lässt sich nicht sagen, da es weder die Möglichkeit zur Temperaturmessung gab, noch die Option zur Kühlung unter Bestrahlung bestand.

Die Experimente zur Messung der Zellvitalität nach ALA+PDT wurden für diese Arbeit so durchgeführt, dass die Zellen nach der Inkubation mit ALA einem Mediumwechsel unterzogen wurden. Somit konnten wir eine Beeinflussung der Bestrahlung durch ALA und Zellmediumzusätze ausschließen. Außerdem wurden die Extinktionsmessungen durch diesen Zwischenschritt nicht durch hohe ALA-Konzentrationen verfälscht. Dies hatte allerdings zur Folge, dass die Zellen ohne die für eine erfolgreiche Zellkultur nötigen Mediumbestandteile mehrere Stunden auskommen mussten. Dass die Reduktion der Zellvitalität trotzdem nicht durch Hungertod der Zellen verursacht wurde, konnten wir ausschließen, da unsere Kontrollgruppen der gleichen Prozedur unterzogen wurden. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied der Zellvitalität zwischen den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen. Aus diesem Grunde kann der Hungertod der Zellen als Ursache für die Reduktion der Zellvitalität ausgeschlossen werden.

5.4 Die Photodynamische Therapie an Gliom- und Glioblastomzellen sowie an Tumorstammzellen

Die PDT an Gliomzelllinien wurde in verschiedenen Arbeiten untersucht. Stummer et al. konnten 1998 einen linearen Anstieg der Protoporphyrin-IX-Fluoreszenz mit einem Plateau nach 85 Minuten in C6-Gliomzellen unter ALA-Anwesenheit feststellen. [112] Inzwischen werden dieser Methode verschiedene Wirkmechanismen wie Apoptose, Nekrose, Regulation der Angiogenese und immunologische Effekte zugeschrieben. [4, 6, 7] Für die lokalen Effekte spielt die Übertragung von Energie durch den durch Licht in einen energiereichen Zustand versetzten Photosensibilisator auf molekularen Sauerstoff eine entscheidende Rolle. Dadurch entstehen reaktive Sauerstoffspezies, die einen direkten Zelltod bewirken. Diese Reaktion wird Typ II Reaktion genannt. Bei der Typ I Reaktion kommt es zu einer Wasserstoffatomübertragung des angeregten Photosensibilisators auf Zellbestandteile mit anschließender Entstehung von Radikalen. [8] Für immunologische Effekte werden Mechanismen wie das Anlocken von dendritischen Zellen, die begünstigte Reifung dendritischer Zellen sowie die verbesserte T-Zell-Stimulation und der Anstieg von Interleukin-6 und -1 verantwortlich gemacht. [5, 117] Die vaskulären Effekte werden durch sofortige Vasokonstriktion und etwas verzögert auftretende Thrombusbildung hervorgerufen. Diese Effekte sorgen für eine verminderte Zunahme der Tumorgroße. [8]

Etminan et al. wiesen 2011 außerdem eine Veränderung der Invasivität nach PDT mit ALA an Glioblastomspheroiden der Zelllinien U373 und U87 nach. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Migration und Invasion in eine Kollagenmatrix lang anhaltend fast vollständig unterdrückt werden konnten. Dabei wurde mit einer verbleibenden Zellviabilität von 50% sichergestellt, dass der Effekt nicht nur durch eine direkte Zellschädigung hervorgerufen wurde. [4] Auch in anderen Arbeiten konnte nach PDT mit ALA oder Photofrin eine Reduktion der Invasivität von Gliomzellen hervorgerufen werden. [110, 118] Dieser Effekt wurde inzwischen für verschiedene Tumore, wie dem Mamma-Carcinom, dem malignen Melanom und dem Bronchial-Carcinom, nachgewiesen. [119, 120] Desweiteren fanden Etminan et al. 2011 Veränderungen der Zellmorphologie nach PDT von vorher länglichen Zellen mit vielen Ausstülpungen zu polygonalen und epithelähnlichen Zellen. Dieser Wandel wurde mit einer lang anhaltenden Umstellung des Aktin-Zytoskeletts der Zellen in Verbindung gebracht. [4] Ähnliche Phänomene wurden von

Uzdensky et al. beobachtet. [121] Da das Zytoskelett eine Rolle in der Zellinvasion spielt, können diese Veränderungen ein Grund für die verminderte Migration und Invasivität der Zellen sein. [122] Als dritte Modifikation stellten Etminan et al. eine Herunterregulierung der Matrixmetalloproteinasen 7 und 8 fest. [4] Die Expression von Matrixmetalloproteinasen wird mit der Invasivität von malignen Gliomen in Verbindung gebracht. [123]

2011 konnten Barth et al. erstmals einen Effekt der PDT an Leukämie-Tumorstammzellen nachweisen. Dazu benutzten sie als Photosensibilisator Indocyaningrün, das in spezielle Nanopartikel eingekapselt wurde. Diese Nanopartikel sorgten dafür, dass eine Bindung an die für Leukämietumorstammzellen typischen Oberflächenmarker CD96 und CD117 erfolgte. [7, 124]

Bisher gibt es keine Arbeiten zur PDT an Glioblastomstammzellen. Es konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass Glioblastomstammzellen resistent gegenüber Radio- und Chemotherapie sind. [10, 111] Desweiteren fanden Huang et al. 2008 heraus, dass Tumorstammzellen in Tumorrezidiven aggressiver waren als in Primärtumoren. Aus diesem Grund könnte ein Tumorprogress von Tumorstammzellen verursacht werden. [125] Ein weiterer interessanter Aspekt wurde von Chiao et al. 2011 hervorgebracht. Sie fanden heraus, dass Glioblastomstammzellen für die Vaskularisierung wichtige Moleküle exprimieren und daran beteiligt sind, gefäßähnliche Strukturen zu formen. Somit sind sie anscheinend ein wichtiger Bestandteil für die Gefäßversorgung des Tumors. [126]

Deshalb ist es von großem Interesse, neue und auch gegen Tumorstammzellen wirksame Therapien zu finden und zu optimieren.

5.5 Die Photodynamische Therapie an Glioblastomen im klinischen Gebrauch

In einer Phase III Studie an 27 Glioblastompatienten konnte ein signifikanter Vorteil für Patienten, die eine Kombination aus fluoreszenzgestützter Resektion mit ALA und Photofrin und wiederholter PDT erhalten haben, herausgestellt werden. Die Patienten der Versuchsgruppe überlebten im Mittel 52,8 Wochen im Gegensatz zur Kontrollgruppe, in der die Patienten im Mittel nur 24,6 Wochen überlebten. Auch das progressionsfreie Intervall war im Mittel mit 8,6 Monaten in der Versuchsgruppe signifikant länger als mit 4,8 Monaten in der Kontrollgruppe. Desweiteren lag der Karnofsky-Index sechs Monate nach Operation in der Versuchsgruppe im Mittel bei 80, wohingegen er in der Kontrollgruppe nur bei 70 lag. [127]

Stummer et al. konnten 2008 im Rahmen eines Fallberichtes zeigen, dass bei einer Patientin mit einem nicht resezierbaren Glioblastomrezidiv eine stereotaktische Behandlung mit PDT zu einem bildmorphologisch nicht mehr nachweisbaren Tumor führte. [128] Dieser Fallbericht lässt die Vermutung aufkommen, dass auch andere Mechanismen als Apoptose und Nekrose eine Rolle spielen könnten, da die Eindringtiefe des Laserlichts und die dadurch direkt ausgelösten Reaktionen nur begrenzt sind. Die Photodynamische Therapie wird aktuell bei umschriebenen Glioblastomrezidiven mit stereotaktisch eingebrachten Lichtleitern als experimentelles, individuelles Heilverfahren durchgeführt.

5.6 Kontroversen der Arbeit und Blick in die Zukunft

Die in dieser Arbeit dargestellten *In-Vitro*-Experimente sind nötige Grundvoraussetzung für das weitere Verständnis und eine mögliche Optimierung der Methodik. Es konnte gezeigt werden, dass die PDT auch bei Glioblastomstammzellen effektiv und wirksam ist. Damit stellt sie einen Behandlungsansatz dar, der für die Zukunft von großer Bedeutung sein kann. Auf dieser Grundlage können weitere *In-Vitro*- und auch *In-Vivo*-Experimente geplant werden.

Es stellt sich die Frage, warum nicht versucht worden ist eigene Tumorstammzellen zu generieren. Dies ist leicht nachzuvollziehen, wenn man sich die aufwändige Methodik zum sicheren Nachweis für Tumorstammzellen veranschaulicht. Dabei spielen verschiedene Marker eine Rolle. Für die Zelllinie GS5 konnten Gunther et al. 2008 durchflusszytometrisch CD133 positive Zellen nachweisen. Die ermittelten Werte lagen Werte zwischen 1,9 und 6,4%. Die durchflusszytometrische Bestimmung des CD133 positiven Zellanteils erfolgte, da das transmembrane Glykoprotein CD133 einen Marker zur Identifizierung von Tumorstammzellen und Progenitorzellen in verschiedenen Geweben darstellt. Vor allem die Eigenschaft, dass es sich bei Zelldifferenzierung herunter reguliert, macht es zu einem idealen Marker. [86] Insgesamt findet allerdings eine kontroverse Diskussion statt, ob dieses Verfahren wirklich eine geeignete Möglichkeit zur Identifizierung von Tumorstammzellen darstellt, da auch CD133 negative Zellen mit Tumorstammzelleigenschaften entdeckt wurden. [12, 129, 130] Gambelli et al. stellten 2011 die Vermutung auf, dass in angeblich CD133 negativen Tumorstammzellen nur so wenig CD133 exprimiert werde, dass dies durchflusszytometrisch nicht nachweisbar sei. Sie stützen ihre Vermutung auf die Tatsache, dass ein konkordanter Nachweis von CD133 mRNA mittels RT-PCR und von Protein mittels Western-Blot in per Durchflusszytometrie CD133 negativen Zellen möglich war. [13] Als einen weiteren Marker zur Identifizierung von undifferenzierten Zellstadien wird der Nachweis von Nestin verwendet. Durchflusszytometrisch konnten Gunther et al. 2008 für die GS5 Zelllinie eine hohe Nestinexpression nachweisen. Desweiteren konnten sie eine Tumorigenität in vivo mit invasivem Wachstum und eine neurogliale Differenzierungsfähigkeit feststellen [12]. Die auf diesem Wege sicher als Tumorstammzellen identifizierten Zellen konnten so für unsere weiteren Experimente verwendet werden.

Ob ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von CD133 positiven Zellen, und somit dem Vorliegen von Tumorstammzellen, und der Prognose von Glioblastompatienten vorliegt, wird momentan kontrovers diskutiert. Inzwischen gibt es viele Arbeiten, die auf einen Zusammenhang hinweisen. 2008 fanden Pallini et al. heraus, dass die Expression von durchschnittlich über 2% CD133 positiver Zellen signifikant das Gesamtüberleben senkt und das progressionsfreie Intervall signifikant verkürzt. Das gleichzeitige Vorliegen von CD133 positiven Zellen und Ki67, einem Proliferationsmarker, war mit einem sehr schlechten Gesamtüberleben und einem sehr kurzem progressionsfreien Intervall assoziiert. [131, 132]

Zeppernick et al. untersuchten 2008 immunhistochemisch die CD133 Expression an 95 Gliomen. Auch in ihren Untersuchungen zeigten sich eine CD133 Expression von über 1% als signifikanter prognostischer Faktor für ein kürzeres Gesamtüberleben und ein kürzeres progressionsfreies Intervall unabhängig von Patientenalter, WHO-Grad und Resektionsausmaß. Zusätzlich stellten sie fest, dass bei steigender Malignität häufiger CD133 positive Zellgruppen (mehr als fünf Zellen) auftraten. Desweiteren stellte sich heraus, dass Patienten mit WHO-Grad II und III Tumoren mit über 1% CD133 positiven Zellen häufiger einen Rückfall erlitten und das Grad III Tumore mit über 1% CD133 Expression häufiger in Grad IV Tumore übergingen. [14]

Metellus et al. untersuchten 2011 mittels RT-PCR die quantitative Expression von CD133 Antigen-mRNA bei 48 Glioblastompatienten. Dabei galt eine Expression von weniger als 1% als niedrig und eine Expression von über 1% als hoch. Auch sie stellten fest, dass das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Intervall bei einer hohen Expression signifikant kürzer sind als bei niedriger Expression. Desweiteren untersuchten sie den Methylierungsstatus für MGMT und fanden heraus, dass sowohl in methylierten als auch in unmethylierten Patientengruppen das Expressionslevel von CD133 einen prognostischen Faktor darstellte. Sie teilten die Patienten bezüglich ihrer Prognose in drei Gruppen ein. Die Gruppe mit der besten Prognose wies eine MGMT-Methylierung und eine niedrige Expression von CD133 auf. Unmethylierter MGMT-Status und eine hohe CD133 Expression sorgten für die schlechteste Prognose. Eine mittlere Prognose ließ sich für die Gruppen unmethylierter MGMT-Status mit niedriger CD133 Expression und methylierter MGMT-Status mit hoher CD133 Expression feststellen. [15]

Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass der Nachweis von CD133 positiven Zellen, und so das Vorhandensein von Tumorstammzellen, einen wichtigen Prognosemarker darstellt. Desweiteren wird die Bedeutung von Therapien, die CD133 positive Zellen angreifen, deutlich.

Um eine noch genauere Aussage über die Bedeutung der PDT bei Glioblastomen treffen zu können sind weitere experimentelle und klinische Studien notwendig. Zum einen kann man das Ansprechen weiterer Glioblastom-Stammzelllinien auf die PDT testen, zum anderen könnten In-Vivo Experimente an Tumoren mit nachgewiesenem Tumorstammzellanteil durchgeführt werden. Diese Versuche würden zum weiteren Verständnis und so auch zur möglichen Optimierung dieses Therapieansatzes führen.

Einen weiteren Ansatzpunkt in der Therapieentwicklung stellt die aktive Immunisierung von Glioblastompatienten dar. Dabei wird davon ausgegangen, dass Glioblastome keine adäquate Immunantwort auslösen können (45). Li et al. konnten 2011 zeigen, dass durch PDT sowohl eine regionale als auch eine systemische Tumormunität bei Mäusen mit G422 Gliomen ausgelöst werden konnte. Eine gesteigerte Infiltration von Immunzellen und eine erhöhte Ausschüttung von Tumornekrosefaktor- α und Interferon- γ wurden bei den behandelten Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten festgestellt. Desweiteren konnten von behandelten Mäusen entnommene Lymphozyten in nicht behandelten Mäusen eine Tumormunität induzieren (67). 2011 konnten Etminan et al. zeigen, dass die Behandlung von Glioblastomsphäroiden mit PDT Dendritische Zellen anlockt, deren Reifung begünstigt und die T-Zell-Stimulation durch Dendritische Zellen stimuliert. Auf diesem Weg könnte somit eine Immunantwort initiiert werden. [5]

6 Schlussfolgerung

Die Photodynamische Therapie stellt eine vielversprechende neue Therapieoption für die Behandlung des Glioblastoms beim Menschen dar. Sowohl in experimentellen als auch in klinischen Untersuchungen konnte eine klare Wirksamkeit auf die Zellvitalität nachgewiesen werden. Um diese Methodik optimieren zu können, müssen die genauen Wirkmechanismen noch weiter verstanden werden. Einen anderen interessanten Forschungs- und Therapieansatz liefert die Stammzelltheorie, durch die sich unser Verständnis für die Behandlung bösartiger Tumore radikal verändert hat. Es scheint, als hätte man den Ort der Tumorentstehung und die Ursache für die ausgesprochene Therapieresistenz der Glioblastome identifiziert. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass Glioblastomstammzelllinien den Photosensitizer ALA aufnehmen und dass die Photodynamische Therapie bei diesen Zelllinien wirksam ist. Es konnte eine von der ALA-Konzentration abhängige Dosis-Wirkungskurve für die PDT erstellt werden. Wie auch schon in vorhergegangenen Versuchen mit Glioblastomzelllinien zeigte sich bei der Glioblastomstammzelllinie eine signifikante Reduzierung der lebenden Zellen in der Gruppe, die ALA und Bestrahlung erhielt, im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die nur ALA erhielt, und der Gruppe, die nur bestrahlt wurde.

Für weitere Versuche wäre es interessant, die Wirkung der PDT an Tumorstammzellen in einem größeren Umfang zu untersuchen und die Prozedur in *In-Vivo*-Experimenten zu wiederholen. Desweiteren wäre es wichtig herauszufinden, wie sich Tumorstammzellen, die eine photodynamische Therapie überlebt haben, verhalten und was dies für den Rest des Tumors bedeutet. Auch ist noch nicht klar, ob alle Glioblastomstammzelllinien in gleicher Weise auf die Behandlung reagieren, oder ob es resistenterere und empfindlichere Zelllinien gibt.

Insgesamt konnten wir zeigen, dass die PDT auch für die Behandlung von Tumorstammzellen eine effektive Therapieoption darstellt.

7 Literaturverzeichnis

1. Stupp, R., W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, R.O. Mirimanoff, *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
2. Zelenkov, P., R. Baumgartner, K. Bise, M. Heide, R. Meier, S. Stocker, R. Sroka, R. Goldbrunner, W. Stummer, *Acute morphological sequelae of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the C6 spheroid model*. J Neurooncol, 2007. **82**(1): p. 49-60.
3. Beck, T.J., F.W. Kreth, W. Beyer, J.H. Mehrkens, A. Obermeier, H. Stepp, W. Stummer, R. Baumgartner, *Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX*. Lasers Surg Med, 2007. **39**(5): p. 386-93.
4. Etminan, N., C. Peters, J. Ficnar, S. Anlasik, E. Bunemann, P.J. Slotty, D. Hanggi, H.J. Steiger, R.V. Sorg, W. Stummer, *Modulation of migratory activity and invasiveness of human glioma spheroids following 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment*. J Neurosurg, 2011. **115**(2): p. 281-8.
5. Etminan, N., C. Peters, D. Lakbir, E. Bunemann, V. Borger, M.C. Sabel, D. Hanggi, H.J. Steiger, W. Stummer, R.V. Sorg, *Heat-shock protein 70-dependent dendritic cell activation by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment of human glioblastoma spheroids in vitro*. Br J Cancer, 2011. **105**(7): p. 961-9.
6. Juzeniene, A., Q. Peng, J. Moan, *Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis*. Photochem Photobiol Sci, 2007. **6**(12): p. 1234-45.
7. Tselosky, D.M., A.E. Creecy, S.S. Shanmugavelandy, J.P. Smith, D.F. Claxton, J.H. Adair, M. Kester, B.M. Barth, *Calcium phosphosilicate nanoparticles for imaging and photodynamic therapy of cancer*. Discov Med, 2012. **13**(71): p. 275-85.
8. Dolmans, D.E., D. Fukumura, R.K. Jain, *Photodynamic therapy for cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 380-7.
9. Galli, R., E. Binda, U. Orfanelli, B. Cipelletti, A. Gritti, S. De Vitis, R. Fiocco, C. Foroni, F. Dimeco, A. Vescevi, *Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7011-21.
10. Bao, S., Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, M.W. Dewhirst, D.D. Bigner, J.N. Rich, *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. Nature, 2006. **444**(7120): p. 756-60.

11. Johannessen, T.C., J. Wang, K.O. Skaftnesmo, P.O. Sakariassen, P.O. Enger, K. Petersen, A.M. Oyan, K.H. Kalland, R. Bjerkvig, B.B. Tysnes, *Highly infiltrative brain tumours show reduced chemosensitivity associated with a stem cell-like phenotype*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2009. **35**(4): p. 380-93.
12. Gunther, H.S., N.O. Schmidt, H.S. Phillips, D. Kemming, S. Kharbanda, R. Soriano, Z. Modrusan, H. Meissner, M. Westphal, K. Lamszus, *Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria*. *Oncogene*, 2008. **27**(20): p. 2897-909.
13. Gambelli, F., F. Sasdelli, I. Manini, C. Gambarana, G. Oliveri, C. Miracco, V. Sorrentino, *Identification of cancer stem cells from human Glioblastomas: growth and differentiation capabilities and CD133/Prominin-1 expression*. *Cell Biol Int*, 2011. **36**(1): p. 29-38.
14. Zeppernick, F., R. Ahmadi, B. Campos, C. Dictus, B.M. Helmke, N. Becker, P. Lichter, A. Unterberg, B. Radlwimmer, C.C. Herold-Mende, *Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(1): p. 123-9.
15. Metellus, P., I. Nanni-Metellus, C. Delfino, C. Colin, A. Tchogandjian, B. Coulibaly, F. Fina, A. Loundou, M. Barrie, O. Chinot, L. Ouafik, D. Figarella-Branger, *Prognostic Impact of CD133 mRNA Expression in 48 Glioblastoma Patients Treated with Concomitant Radiochemotherapy: A Prospective Patient Cohort at a Single Institution*. *Ann Surg Oncol*, 2011. **18**(10): p. 2937-45.
16. Louis, D.N., H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvet, B.W. Scheithauer, P. Kleihues, *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. *Acta Neuropathol*, 2007. **114**(2): p. 97-109.
17. Hacke, W., *Neurologie*. Vol. 13. 2010, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
18. Hermann, P.C., S. Bhaskar, M. Cioffi, C. Heeschen, *Cancer stem cells in solid tumors*. *Semin Cancer Biol*, 2010. **20**(2): p. 77-84.
19. Schiffer, D., L. Annovazzi, V. Caldera, M. Mellai, *On the origin and growth of gliomas*. *Anticancer Res*, 2010. **30**(6): p. 1977-98.
20. Behin, A., K. Hoang-Xuan, A.F. Carpentier, J.Y. Delattre, *Primary brain tumours in adults*. *Lancet*, 2003. **361**(9354): p. 323-31.
21. Mrugala, M.M., *Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective*. *Discov Med*, 2013. **15**(83): p. 221-30.

22. Schwartzbaum, J.A., J.L. Fisher, K.D. Aldape, M. Wrensch, *Epidemiology and molecular pathology of glioma*. Nat Clin Pract Neurol, 2006. **2**(9): p. 494-503; quiz 1 p following 516.
23. McKinley, B.P., A.M. Michalek, R.A. Fenstermaker, R.J. Plunkett, *The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995*. J Neurosurg, 2000. **93**(6): p. 932-9.
24. Fisher, J.L., J.A. Schwartzbaum, M. Wrensch, J.L. Wiemels, *Epidemiology of brain tumors*. Neurol Clin, 2007. **25**(4): p. 867-90, vii.
25. Wrensch, M., Y. Minn, T. Chew, M. Bondy, M.S. Berger, *Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature*. Neuro Oncol, 2002. **4**(4): p. 278-99.
26. Omuro, A., L.M. DeAngelis, *Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review*. JAMA, 2013. **310**(17): p. 1842-50.
27. Le Blanc, F., Rasmussen, T., *Cerebral seizures and brain tumors*. Handbook of Clinical Neurology: The Epilepsies, ed. P.I. in Virken, Bruyn G.W. Vol. 15. 1974, Amsterdam: Elsevier.
28. Liigant, A., S. Haldre, A. Oun, U. Linnamagi, A. Saar, T. Asser, A.E. Kaasik, *Seizure disorders in patients with brain tumors*. Eur Neurol, 2001. **45**(1): p. 46-51.
29. Shamji, M.F., E.C. Fric-Shamji, B.G. Benoit, *Brain tumors and epilepsy: pathophysiology of peritumoral changes*. Neurosurg Rev, 2009. **32**(3): p. 275-84; discussion 284-6.
30. Forsyth, P.A., J.B. Posner, *Headaches in patients with brain tumors: a study of 111 patients*. Neurology, 1993. **43**(9): p. 1678-83.
31. Wen, P.Y., S. Kesari, *Malignant gliomas in adults*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 492-507.
32. Feen, E.S., J.I. Suarez, *Raised Intracranial Pressure*. Curr Treat Options Neurol, 2005. **7**(2): p. 109-117.
33. Pasquier, B., D. Pasquier, A. N'Golet, M.H. Panh, P. Couderc, *Extraneural metastases of astrocytomas and glioblastomas: clinicopathological study of two cases and review of literature*. Cancer, 1980. **45**(1): p. 112-25.
34. Blume, C., M. von Lehe, F. van Landeghem, S. Greschus, J. Bostrom, *Extracranial glioblastoma with synchronous metastases in the lung, pulmonary lymph nodes, vertebrae, cervical muscles and epidural space in a young patient - case report and review of literature*. BMC Res Notes, 2013. **6**: p. 290.

35. Ohgaki, H., P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1445-53.
36. Thon, N., S. Kreth, F.W. Kreth, *Personalized treatment strategies in glioblastoma: promoter methylation status*. Onco Targets Ther, 2013. **6**: p. 1363-1372.
37. Cha, S., *Update on brain tumor imaging: from anatomy to physiology*. AJNR Am J Neuroradiol, 2006. **27**(3): p. 475-87.
38. Young, G.S., *Advanced MRI of adult brain tumors*. Neurol Clin, 2007. **25**(4): p. 947-73, viii.
39. Chen, W., *Clinical applications of PET in brain tumors*. J Nucl Med, 2007. **48**(9): p. 1468-81.
40. Floeth, F.W., D. Pauleit, H.J. Witsack, K.J. Langen, G. Reifenberger, K. Hamacher, M. Messing-Junger, K. Zilles, F. Weber, W. Stummer, H.J. Steiger, G. Woebker, H.W. Muller, H. Coenen, M. Sabel, *Multimodal metabolic imaging of cerebral gliomas: positron emission tomography with [18F]fluoroethyl-L-tyrosine and magnetic resonance spectroscopy*. J Neurosurg, 2005. **102**(2): p. 318-27.
41. Wen, P.Y., D.R. Macdonald, D.A. Reardon, T.F. Cloughesy, A.G. Sorensen, E. Galanis, J. Degroot, W. Wick, M.R. Gilbert, A.B. Lassman, C. Tsien, T. Mikkelsen, E.T. Wong, M.C. Chamberlain, R. Stupp, K.R. Lamborn, M.A. Vogelbaum, M.J. van den Bent, S.M. Chang, *Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group*. J Clin Oncol, 2010. **28**(11): p. 1963-72.
42. Brandsma, D., L. Stalpers, W. Taal, P. Sminia, M.J. van den Bent, *Clinical features, mechanisms, and management of pseudoprogression in malignant gliomas*. Lancet Oncol, 2008. **9**(5): p. 453-61.
43. Stummer, W., M.A. Kamp, *The importance of surgical resection in malignant glioma*. Curr Opin Neurol, 2009. **22**(6): p. 645-9.
44. Stummer, W., H.J. Reulen, T. Meinel, U. Pichlmeier, W. Schumacher, J.C. Tonn, V. Rohde, F. Opperl, B. Turowski, C. Woiciechowsky, K. Franz, T. Pietsch, *Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias*. Neurosurgery, 2008. **62**(3): p. 564-76; discussion 564-76.
45. Lacroix, M., D. Abi-Said, D.R. Fourny, Z.L. Gokaslan, W. Shi, F. DeMonte, F.F. Lang, I.E. McCutcheon, S.J. Hassenbusch, E. Holland, K. Hess, C. Michael, D. Miller, R. Sawaya, *A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival*. J Neurosurg, 2001. **95**(2): p. 190-8.
46. Stummer, W., U. Pichlmeier, T. Meinel, O.D. Wiestler, F. Zanella, H.J. Reulen, *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for*

resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. Lancet Oncol, 2006. **7**(5): p. 392-401.

47. Asthagiri, A.R., N. Pouratian, J. Sherman, G. Ahmed, M.E. Shaffrey, *Advances in brain tumor surgery.* Neurol Clin, 2007. **25**(4): p. 975-1003, viii-ix.
48. Walker, M.D., E. Alexander, Jr., W.E. Hunt, C.S. MacCarty, M.S. Mahaley, Jr., J. Mealey, Jr., H.A. Norrell, G. Owens, J. Ransohoff, C.B. Wilson, E.A. Gehan, T.A. Strike, *Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial.* J Neurosurg, 1978. **49**(3): p. 333-43.
49. Selker, R.G., W.R. Shapiro, P. Burger, M.S. Blackwood, V.C. Arena, J.C. Gilder, M.G. Malkin, J.J. Mealey, Jr., J.H. Neal, J. Olson, J.T. Robertson, G.H. Barnett, S. Bloomfield, R. Albright, F.H. Hochberg, E. Hiesiger, S. Green, *The Brain Tumor Cooperative Group NIH Trial 87-01: a randomized comparison of surgery, external radiotherapy, and carmustine versus surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine.* Neurosurgery, 2002. **51**(2): p. 343-55; discussion 355-7.
50. Souhami, L., W. Seiferheld, D. Brachman, E.B. Podgorsak, M. Werner-Wasik, R. Lustig, C.J. Schultz, W. Sause, P. Okunieff, J. Buckner, L. Zamorano, M.P. Mehta, W.J. Curran, Jr., *Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **60**(3): p. 853-60.
51. Tsao, M.N., M.P. Mehta, T.J. Whelan, D.E. Morris, J.A. Hayman, J.C. Flickinger, M. Mills, C.L. Rogers, L. Souhami, *The American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) evidence-based review of the role of radiosurgery for malignant glioma.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **63**(1): p. 47-55.
52. Keime-Guibert, F., O. Chinot, L. Taillandier, S. Cartalat-Carel, M. Frenay, G. Kantor, J.S. Guillo, E. Jadaud, P. Colin, P.Y. Bondiau, P. Menei, H. Loiseau, V. Bernier, J. Honnorat, M. Barrie, K. Mokhtari, J.J. Mazon, A. Bissery, J.Y. Delattre, *Radiotherapy for glioblastoma in the elderly.* N Engl J Med, 2007. **356**(15): p. 1527-35.
53. Roa, W., P.M. Brasher, G. Bauman, M. Anthes, E. Bruera, A. Chan, B. Fisher, D. Fulton, S. Gulavita, C. Hao, S. Husain, A. Murtha, K. Petruk, D. Stewart, P. Tai, R. Urtasun, J.G. Cairncross, P. Forsyth, *Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial.* J Clin Oncol, 2004. **22**(9): p. 1583-8.
54. Kil, W.J., D. Cerna, W.E. Burgan, K. Beam, D. Carter, P.S. Steeg, P.J. Tofilon, K. Camphausen, *In vitro and in vivo radiosensitization induced by the DNA methylating agent temozolomide.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(3): p. 931-8.

55. Nishikawa, R., *Standard therapy for glioblastoma--a review of where we are*. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2010. **50**(9): p. 713-9.
56. Hegi, M.E., A.C. Diserens, T. Gorlia, M.F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J.E. Bromberg, P. Hau, R.O. Mirimanoff, J.G. Cairncross, R.C. Janzer, R. Stupp, *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
57. Westphal, M., D.C. Hilt, E. Bortey, P. Delavault, R. Olivares, P.C. Warnke, I.R. Whittle, J. Jaaskelainen, Z. Ram, *A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma*. *Neuro Oncol*, 2003. **5**(2): p. 79-88.
58. Narita, Y., *Drug review: Safety and efficacy of bevacizumab for glioblastoma and other brain tumors*. *Jpn J Clin Oncol*, 2013. **43**(6): p. 587-95.
59. Friedman, H.S., M.D. Prados, P.Y. Wen, T. Mikkelsen, D. Schiff, L.E. Abrey, W.K. Yung, N. Paleologos, M.K. Nicholas, R. Jensen, J. Vredenburgh, J. Huang, M. Zheng, T. Cloughesy, *Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(28): p. 4733-40.
60. Fulci, G., E.A. Chiocca, *The status of gene therapy for brain tumors*. *Expert Opin Biol Ther*, 2007. **7**(2): p. 197-208.
61. Kwiatkowska, A., M.S. Nandhu, P. Behera, E.A. Chiocca, M.S. Viapiano, *Strategies in gene therapy for glioblastoma*. *Cancers (Basel)*, 2013. **5**(4): p. 1271-305.
62. Zhang, J.G., J. Eguchi, C.A. Kruse, G.G. Gomez, H. Fakhrai, S. Schroter, W. Ma, N. Hoa, B. Minev, C. Delgado, H.T. Wepsic, H. Okada, M.R. Jadus, *Antigenic profiling of glioma cells to generate allogeneic vaccines or dendritic cell-based therapeutics*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(2 Pt 1): p. 566-75.
63. Reardon, D.A., G. Akabani, R.E. Coleman, A.H. Friedman, H.S. Friedman, J.E. Herndon, 2nd, R.E. McLendon, C.N. Pegram, J.M. Provenzale, J.A. Quinn, J.N. Rich, J.J. Vredenburgh, A. Desjardins, S. Gururangan, M. Badruddoja, J.M. Dowell, T.Z. Wong, X.G. Zhao, M.R. Zalutsky, D.D. Bigner, *Salvage radioimmunotherapy with murine iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: phase II study results*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(1): p. 115-22.
64. Mamelak, A.N., S. Rosenfeld, R. Bucholz, A. Raubitschek, L.B. Nabors, J.B. Fiveash, S. Shen, M.B. Khazaeli, D. Colcher, A. Liu, M. Osman, B. Guthrie, S. Schade-Bijur, D.M. Hablitz, V.L. Alvarez, M.A. Gonda, *Phase I single-dose study of intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(22): p. 3644-50.

65. Ferguson, S., M.S. Lesniak, *Convection enhanced drug delivery of novel therapeutic agents to malignant brain tumors*. *Curr Drug Deliv*, 2007. **4**(2): p. 169-80.
66. Soderberg-Naucler, C., A. Rahbar, G. Stragliotto, *Survival in patients with glioblastoma receiving valganciclovir*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(10): p. 985-6.
67. Surawicz, T.S., F. Davis, S. Freels, E.R. Laws, Jr., H.R. Menck, *Brain tumor survival: results from the National Cancer Data Base*. *J Neurooncol*, 1998. **40**(2): p. 151-60.
68. Singh, D., J.M. Chan, P. Zoppoli, F. Niola, R. Sullivan, A. Castano, E.M. Liu, J. Reichel, P. Porrati, S. Pellegatta, K. Qiu, Z. Gao, M. Ceccarelli, R. Riccardi, D.J. Brat, A. Guha, K. Aldape, J.G. Golfinos, D. Zagzag, T. Mikkelsen, G. Finocchiaro, A. Lasorella, R. Rabadan, A. Iavarone, *Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma*. *Science*, 2012. **337**(6099): p. 1231-5.
69. Stupp, R., M.E. Hegi, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M.J. Taphoorn, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A.A. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C.J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J.G. Cairncross, R.O. Mirimanoff, *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(5): p. 459-66.
70. Soffietti, R., R. Ruda, E. Trevisan, *New chemotherapy options for the treatment of malignant gliomas*. *Anticancer Drugs*, 2007. **18**(6): p. 621-32.
71. Reya, T., S.J. Morrison, M.F. Clarke, I.L. Weissman, *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
72. Mimeault, M., Batra, S.K., *Stem Cell Applications in Disease Research: Recent Advances in Stem Cell and Cancer Stem Cell Biology and Their Therapeutic Implications*. *Progress in Stem Cell Applications*, ed. A.V. Faraday, Dyer, J.T. Vol. 1. 2008: Nova Science Publishers.
73. Fuchs, E., T. Tumber, G. Guasch, *Socializing with the neighbors: stem cells and their niche*. *Cell*, 2004. **116**(6): p. 769-78.
74. Nakano, I., H.I. Kornblum, *Brain tumor stem cells*. *Pediatr Res*, 2006. **59**(4 Pt 2): p. 54R-8R.
75. Clarke, M.F., J.E. Dick, P.B. Dirks, C.J. Eaves, C.H. Jamieson, D.L. Jones, J. Visvader, I.L. Weissman, G.M. Wahl, *Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells*. *Cancer Res*, 2006. **66**(19): p. 9339-44.

76. Vescovi, A.L., R. Galli, B.A. Reynolds, *Brain tumour stem cells*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 425-36.
77. Ellisen, L.W., J. Bird, D.C. West, A.L. Soreng, T.C. Reynolds, S.D. Smith, J. Sklar, *TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms*. Cell, 1991. **66**(4): p. 649-61.
78. Taipale, J., P.A. Beachy, *The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 349-54.
79. Polakis, P., *Wnt signaling and cancer*. Genes Dev, 2000. **14**(15): p. 1837-51.
80. Yuan, X., J. Curtin, Y. Xiong, G. Liu, S. Waschmann-Hogiu, D.L. Farkas, K.L. Black, J.S. Yu, *Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme*. Oncogene, 2004. **23**(58): p. 9392-400.
81. Beachy, P.A., S.S. Karhadkar, D.M. Berman, *Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 324-31.
82. Bonnet, D., J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
83. Al-Hajj, M., M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison, M.F. Clarke, *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
84. Hemmati, H.D., I. Nakano, J.A. Lazareff, M. Masterman-Smith, D.H. Geschwind, M. Bronner-Fraser, H.I. Kornblum, *Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15178-83.
85. Taylor, M.D., H. Poppleton, C. Fuller, X. Su, Y. Liu, P. Jensen, S. Magdaleno, J. Dalton, C. Calabrese, J. Board, T. Macdonald, J. Rutka, A. Guha, A. Gajjar, T. Curran, R.J. Gilbertson, *Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma*. Cancer Cell, 2005. **8**(4): p. 323-35.
86. Cheng, J.X., B.L. Liu, X. Zhang, *How powerful is CD133 as a cancer stem cell marker in brain tumors?* Cancer Treat Rev, 2009. **35**(5): p. 403-8.
87. Cheng, L., S. Bao, J.N. Rich, *Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(5): p. 654-65.
88. Miletic, H., S.P. Niclou, M. Johansson, R. Bjerkvig, *Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms*. Expert Opin Ther Targets, 2009. **13**(4): p. 455-68.

89. Malik, Z., H. Lugaci, *Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins*. Br J Cancer, 1987. **56**(5): p. 589-95.
90. Ackroyd, R., C. Kelty, N. Brown, M. Reed, *The history of photodetection and photodynamic therapy*. Photochem Photobiol, 2001. **74**(5): p. 656-69.
91. Peng, Q., K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, J.M. Nesland, *5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research*. Photochem Photobiol, 1997. **65**(2): p. 235-51.
92. Eleouet, S., N. Rousset, J. Carre, L. Bourre, V. Vonarx, Y. Lajat, G.M. Beijersbergen van Henegouwen, T. Patrice, *In vitro fluorescence, toxicity and phototoxicity induced by delta-aminolevulinic acid (ALA) or ALA-esters*. Photochem Photobiol, 2000. **71**(4): p. 447-54.
93. Uehlinger, P., M. Zellweger, G. Wagnieres, L. Juillerat-Jeanneret, H. van den Bergh, N. Lange, *5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells*. J Photochem Photobiol B, 2000. **54**(1): p. 72-80.
94. Stummer, W., S. Stocker, S. Wagner, H. Stepp, C. Fritsch, C. Goetz, A.E. Goetz, R. Kiefmann, H.J. Reulen, *Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence*. Neurosurgery, 1998. **42**(3): p. 518-25; discussion 525-6.
95. Stummer, W., A. Novotny, H. Stepp, C. Goetz, K. Bise, H.J. Reulen, *Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients*. J Neurosurg, 2000. **93**(6): p. 1003-13.
96. Kostron, H., A. Obwegeser, R. Jakober, *Photodynamic therapy in neurosurgery: a review*. J Photochem Photobiol B, 1996. **36**(2): p. 157-68.
97. Moan, J., K. Berg, *The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen*. Photochem Photobiol, 1991. **53**(4): p. 549-53.
98. Agarwal, M.L., M.E. Clay, E.J. Harvey, H.H. Evans, A.R. Antunez, N.L. Oleinick, *Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells*. Cancer Res, 1991. **51**(21): p. 5993-6.
99. Karmakar, S., N.L. Banik, S.J. Patel, S.K. Ray, *5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells*. Neurosci Lett, 2007. **415**(3): p. 242-7.
100. Korbely, M., B. Stott, J. Sun, *Photodynamic therapy-generated vaccines: relevance of tumour cell death expression*. Br J Cancer, 2007. **97**(10): p. 1381-7.

101. Chen, W.R., M. Korbelik, K.E. Bartels, H. Liu, J. Sun, R.E. Nordquist, *Enhancement of laser cancer treatment by a chitosan-derived immunoadjuvant*. Photochem Photobiol, 2005. **81**(1): p. 190-5.
102. Fritsch, C., K. Lang, W. Neuse, T. Ruzicka, P. Lehmann, *Photodynamic diagnosis and therapy in dermatology*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 1998. **11**(6): p. 358-73.
103. Kriegmair, M., R. Baumgartner, R. Knuchel, H. Stepp, F. Hofstadter, A. Hofstetter, *Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence*. J Urol, 1996. **155**(1): p. 105-9; discussion 109-10.
104. Regula, J., A.J. MacRobert, A. Gorchein, G.A. Buonaccorsi, S.M. Thorpe, G.M. Spencer, A.R. Hatfield, S.G. Bown, *Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal, and colorectal tumours using 5 aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX--a pilot study*. Gut, 1995. **36**(1): p. 67-75.
105. Olejek, A., I. Kozak-Darmas, S. Kellas-Slecza, K. Steplewska, T. Biniszkiwicz, B. Birkner, A. Jarek, L. Nowak, K. Stencel-Gabriel, A. Sieron, *Effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of lichen sclerosus: cell changes in immunohistochemistry*. Neuro Endocrinol Lett, 2009. **30**(4): p. 547-51.
106. Fayter, D., M. Corbett, M. Heirs, D. Fox, A. Eastwood, *A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of pre-cancerous skin conditions, Barrett's oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin*. Health Technol Assess, 2010. **14**(37): p. 1-288.
107. Gautschi, O.P., K. van Leyen, D. Cadosch, G. Hildebrandt, J.Y. Fournier, *[Fluorescence guided resection of malignant brain tumors - breakthrough in the surgery of brain tumors]*. Praxis (Bern 1994), 2009. **98**(12): p. 643-7.
108. Olzowy, B., C.S. Hundt, S. Stocker, K. Bise, H.J. Reulen, W. Stummer, *Photoirradiation therapy of experimental malignant glioma with 5-aminolevulinic acid*. J Neurosurg, 2002. **97**(4): p. 970-6.
109. Dougherty, T.J., M.T. Cooper, T.S. Mang, *Cutaneous phototoxic occurrences in patients receiving Photofrin*. Lasers Surg Med, 1990. **10**(5): p. 485-8.
110. Hirschberg, H., C.H. Sun, T. Krasieva, S.J. Madsen, *Effects of ALA-mediated photodynamic therapy on the invasiveness of human glioma cells*. Lasers Surg Med, 2006. **38**(10): p. 939-45.
111. Eramo, A., L. Ricci-Vitiani, A. Zeuner, R. Pallini, F. Lotti, G. Sette, E. Pilozzi, L.M. Larocca, C. Peschle, R. De Maria, *Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells*. Cell Death Differ, 2006. **13**(7): p. 1238-41.

112. Stummer, W., S. Stocker, A. Novotny, A. Heimann, O. Sauer, O. Kempfski, N. Plesnila, J. Wietzorrek, H.J. Reulen, *In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid*. J Photochem Photobiol B, 1998. **45**(2-3): p. 160-9.
113. Napolitano, A.P., D.M. Dean, A.J. Man, J. Youssef, D.N. Ho, A.P. Rago, M.P. Lech, J.R. Morgan, *Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels*. Biotechniques, 2007. **43**(4): p. 494, 496-500.
114. Israel, I., G. Blass, C. Reiners, S. Samnick, *Validation of an amino-acid-based radionuclide therapy plus external beam radiotherapy in heterotopic glioblastoma models*. Nucl Med Biol, 2011. **38**(4): p. 451-60.
115. Zhou, J.Y. ,P. Prognon, *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. **40**(5): p. 1143-8.
116. Hirschberg, H., C.H. Sun, B.J. Tromberg, A.T. Yeh, S.J. Madsen, *Enhanced cytotoxic effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy by concurrent hyperthermia in glioma spheroids*. J Neurooncol, 2004. **70**(3): p. 289-99.
117. Gollnick, S.O., X. Liu, B. Owczarczak, D.A. Musser, B.W. Henderson, *Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo*. Cancer Res, 1997. **57**(18): p. 3904-9.
118. Jiang, F., M. Chopp, M. Katakowski, K.K. Cho, X. Yang, N. Hochbaum, L. Tong, T. Mikkelsen, *Photodynamic therapy with photofrin reduces invasiveness of malignant human glioma cells*. Lasers Med Sci, 2002. **17**(4): p. 280-8.
119. Casas, A., G. Di Venosa, S. Vanzulli, C. Perotti, L. Mamome, L. Rodriguez, M. Simian, A. Juarranz, O. Pontiggia, T. Hasan, A. Batlle, *Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy*. Cancer Lett, 2008. **271**(2): p. 342-51.
120. Tsai, T., H.T. Ji, P.C. Chiang, R.H. Chou, W.S. Chang, C.T. Chen, *ALA-PDT results in phenotypic changes and decreased cellular invasion in surviving cancer cells*. Lasers Surg Med, 2009. **41**(4): p. 305-15.
121. Uzdensky, A., E. Kolpakova, A. Juzeniene, P. Juzenas, J. Moan, *The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1722**(1): p. 43-50.
122. Tate, M.C. ,M.K. Aghi, *Biology of angiogenesis and invasion in glioma*. Neurotherapeutics, 2009. **6**(3): p. 447-57.
123. Binder, D.K. ,M.S. Berger, *Proteases and the biology of glioma invasion*. J Neurooncol, 2002. **56**(2): p. 149-58.

124. Barth, B.M., I.A. E, S.S. Shanmugavelandy, J.M. Kaiser, D. Crespo-Gonzalez, N.A. DiVittore, C. McGovern, T.M. Goff, N.R. Keasey, J.H. Adair, T.P. Loughran, Jr., D.F. Claxton, M. Kester, *Targeted indocyanine-green-loaded calcium phosphosilicate nanoparticles for in vivo photodynamic therapy of leukemia*. ACS Nano, 2011. **5**(7): p. 5325-37.
125. Huang, Q., Q.B. Zhang, J. Dong, Y.Y. Wu, Y.T. Shen, Y.D. Zhao, Y.D. Zhu, Y. Diao, A.D. Wang, Q. Lan, *Glioma stem cells are more aggressive in recurrent tumors with malignant progression than in the primary tumor, and both can be maintained long-term in vitro*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 304.
126. Chiao, M.T., Y.C. Yang, W.Y. Cheng, C.C. Shen, J.L. Ko, *CD133+ glioblastoma stem-like cells induce vascular mimicry in vivo*. Curr Neurovasc Res, 2011. **8**(3): p. 210-9.
127. Eljamel, M.S., C. Goodman, H. Moseley, *ALA and Photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial*. Lasers Med Sci, 2008. **23**(4): p. 361-7.
128. Stummer, W., T. Beck, W. Beyer, J.H. Mehrkens, A. Obermeier, N. Etminan, H. Stepp, J.C. Tonn, R. Baumgartner, J. Herms, F.W. Kreth, *Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report*. J Neurooncol, 2008. **87**(1): p. 103-9.
129. Joo, K.M., S.Y. Kim, X. Jin, S.Y. Song, D.S. Kong, J.I. Lee, J.W. Jeon, M.H. Kim, B.G. Kang, Y. Jung, J. Jin, S.C. Hong, W.Y. Park, D.S. Lee, H. Kim, D.H. Nam, *Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas*. Lab Invest, 2008. **88**(8): p. 808-15.
130. Beier, D., P. Hau, M. Proescholdt, A. Lohmeier, J. Wischhusen, P.J. Oefner, L. Aigner, A. Brawanski, U. Bogdahn, C.P. Beier, *CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles*. Cancer Res, 2007. **67**(9): p. 4010-5.
131. Pallini, R., L. Ricci-Vitiani, G.L. Banna, M. Signore, D. Lombardi, M. Todaro, G. Stassi, M. Martini, G. Maira, L.M. Larocca, R. De Maria, *Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(24): p. 8205-12.
132. Christensen, K., H.D. Schroder, B.W. Kristensen, *CD133+ niches and single cells in glioblastoma have different phenotypes*. J Neurooncol, 2011. **104**(1): p. 129-43.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

21.06.2013, Sarah Christa Jauernik

Unterschrift