

Diplomarbeit

**5-AMINOLÄVULINSÄURE INDUZIERTE PROTOPORPHYRIN IX
FLUORESZENZ UND FERROCHELATASE-EXPRESSION BEI
NIEDRIGGRADIGEN GLIOMEN**

eingereicht von

Katharina Rauch

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Neurochirurgie

unter der Anleitung von

Univ.-Ass. Priv.-Doz. Dr. med. Gord von Campe

Sen.Scientist Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ rer. nat. Silke Patz

Graz, am 30.09.2019

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 30.09.2019

Katharina Rauch eh

DANKSAGUNGEN

Mein größter Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mir dieses Studium überhaupt ermöglicht haben und auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen kann. Danke für eure Großzügigkeit, Fürsorge und Wertschätzung. Ich möchte mich auch bei meinem Bruder, vor allem für die stetige Hilfe in technischen Belangen, bedanken und dafür, dass auf ihn immer Verlass ist. Weiters bedanke ich mich bei meinem Lebenspartner Johannes für die Anregung zu wissenschaftlichem und kritischem Denken und natürlich auch für seinen Beistand in jeder Lebenslage.

Ein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Priv.-Doz. Gord von Campe und Priv.-Doz.ⁱⁿ Silke Patz für ihre immerwährende Unterstützung bei dieser Diplomarbeit. Danke für eure Anregungen, Bemühungen, Ermutigung und eure Expertise – Ich konnte bei diesem Projekt viele Erfahrungen sammeln und Erkenntnisse erwerben. Außerdem danke ich euch für eure Geduld, Zeit und dafür, dass ihr den Humor bei der ganzen Arbeit nie vergessen habt.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des ZMF sowie der Universitätsklinik für Neurochirurgie in Graz für ihre Hilfe bedanken, ohne die die Durchführung der Diplomarbeit nicht möglich gewesen wäre. Ein großes Dankeschön auch an Assoz.Prof.ⁱⁿ Beate Rinner und ihr Team für die Wissensvermittlung über Zellkulturen und das Arbeiten in wissenschaftlichen Laboren.

INHALTSVERZEICHNIS

Danksagungen	ii
Inhaltsverzeichnis	iii
Abkürzungen	vi
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xi
Zusammenfassung	xiii
Abstract	xv
1 Einleitung	17
1.1 <i>Gliome</i>	17
1.1.1 Definition	17
1.1.2 Epidemiologie	17
1.1.3 Ätiologie	18
1.1.4 Symptomatik	18
1.1.5 Diagnostik	19
1.1.6 Klassifikation von Gliomen	21
1.1.7 Die häufigsten Gliome und ihre molekularen Marker	25
1.1.8 Allgemeine Therapieempfehlungen	26
1.1.9 Prognose und beeinflussende Faktoren	28
1.1.10 Nachsorge und Kontrollen	29
1.1.11 Rezidive	29
1.2 <i>Die fluoreszenzgestützte Resektion</i>	31
1.2.1 5-Aminolävulinsäure	31

1.2.2	Mechanismen der PpIX-Akkumulation.....	32
1.2.3	Fluoreszenz.....	35
1.2.4	Protoporphyrin IX-Fluoreszenz.....	39
1.2.5	Klinischer Einsatz von 5-ALA.....	42
1.3	<i>Ziel dieser Arbeit</i>	47
1.3.1	Fragestellung.....	47
2	Material und Methoden	48
2.1	<i>Studiendesign</i>	48
2.1.1	Einschlusskriterien.....	48
2.1.2	Gewebe von Operationen	48
2.2	<i>Zellkulturen</i>	50
2.2.1	Tumorproben	50
2.2.2	Zelllinie U-87 MG.....	50
2.3	<i>Färbungen</i>	53
2.3.1	Inkubation mit 5-ALA und Hoechst	53
2.3.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	54
2.4	<i>ABCG2- und Ferrochelatase-Expression</i>	55
2.4.1	Semi-Dry Western Blot.....	55
2.4.2	PCR	63
2.5	<i>Datenauswertung und Statistik</i>	67
3	Ergebnisse	68
3.1	<i>Studienkollektiv</i>	68
3.2	<i>Molekulargenetische Untersuchungsergebnisse</i>	71
3.3	<i>Intraoperative Fluoreszenz</i>	72

3.4	<i>In Vitro</i> Fluoreszenz der Zelllinie.....	73
3.5	<i>In Vitro</i> Fluoreszenz der Tumorproben.....	75
3.5.1	Fluoreszenz 2 Stunden nach 5-ALA-Exposition	75
3.5.2	Fluoreszenz 24 Stunden nach 5-ALA-Exposition	76
3.6	Korrelation zwischen Kontrastmittelaufnahme und Fluoreszenz bei niedriggradigen Gliomen	78
3.6.1	Intraoperativ Fluoreszenz-positive LGGs.....	78
3.6.2	Intraoperativ Fluoreszenz-negative LGGs	80
3.6.3	Nicht kontrastmittelaufnehmende Tumoren und <i>in vitro</i> Fluoreszenz.....	82
3.7	ABCG2- und FECH-Proteinexpressionslevel	84
3.8	mRNA-ExpressionsLevel (qRT-PCR)	85
3.8.1	ABCG2 mRNA-Expression in Gliomen.....	85
3.8.2	FECH mRNA-Expression in Gliomen	87
3.8.3	Statistische Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse.....	88
4	Diskussion.....	90
4.1	Fluoreszenz in niedriggradigen Gliomen	91
4.2	Ferrochelatase-Expression in Gliomen	92
4.3	ABCG2-Expression in Gliomen	93
4.4	Zusammenfassung der Erkenntnisse dieser Arbeit.....	94
4.5	Limitierungen der Arbeit	94
4.6	Ausblick	95
	Literaturverzeichnis	96
	Anhang	105

ABKÜRZUNGEN

5-ALA	5-aminolevulinic acid
AA	anaplastisches Astrozytom
ABC	adenosine triphosphate (ATP) binding cassette
AD	Aqua destillata
APS	Ammoniumpersulfat
ATRX	alpha-thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked
BP	Bandpass
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CLSM	confocal laser scanning microscope
CT	Computertomographie
DA	diffuses Astrozytom
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
FBS	fetal bovine serum
FECH	Ferrochelatase
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GMB	Glioblastoma multiforme
Gy	Gray
HGG	high-grade glioma
HRP	horseradish peroxidase
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
LGG	low-grade glioma
LP	Langpass
MGMT	O ₆ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NOS	not otherwise specified
ODG	Oligodendrogliom
P/S	Penicillin-Streptomycin
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PCV	Procarbazin, CCNU (Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea = Lomustin) und Vincristin
PEPT	Peptidtransporter

PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PMT	photomultiplier tube
PpIX	Protoporphyrin IX
PPV	positive predictive value
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
rpm	revolutions per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering ribonucleic acid
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TERT	Telomerase reverse Transkriptase
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
ZMF	Zentrum für Medizinische Forschung

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Biosynthese von Porphyrinen und Häm [43]	34
Abbildung 2: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops [44]	37
Abbildung 3: Aufbau eines CLSM [44].....	38
Abbildung 4: Spektrum der PpIX-Fluoreszenz [47].....	40
Abbildung 5: Geschlechterverteilung in den Gruppen der LGGs und HGGs	69
Abbildung 6: Altersverteilung in den Gruppen der LGGs und HGGs.....	70
Abbildung 7: In vitro Fluoreszenz der U-87 MG-Zellen nach 2 Stunden.....	73
Abbildung 8: In vitro Fluoreszenz der U-87 MG-Zellen nach 24 Stunden.....	74
Abbildung 9: In vitro Fluoreszenz von GBM5	77
Abbildung 10: In vitro Fluoreszenz der intraoperativ Fluoreszenz-positiven LGGs	78
Abbildung 11: In vitro Fluoreszenz von ODG2	79
Abbildung 12: In vitro Fluoreszenz von DA4.....	79
Abbildung 13: In vitro Fluoreszenz der intraoperativ Fluoreszenz-negativen LGGs	80
Abbildung 14: In vitro Fluoreszenz von ODG5	81
Abbildung 15: In vitro Fluoreszenz von ODG1	82
Abbildung 16: In vitro Fluoreszenz von DA2.....	83
Abbildung 17: In vitro Fluoreszenz von AA3.....	83
Abbildung 18: Nachweis der Proteinexpression von ABCG2 und FECH mit Western Blot.....	84

Abbildung 19: mRNA-Expressionslevel des ABCG2-Transporters.....	85
Abbildung 20: In vitro Fluoreszenz und ABCG2-Expression in Gliomen	86
Abbildung 21: mRNA-Expressionslevel der Ferrochelatase	87
Abbildung 22: Boxplot der mRNA-Expression von ABCG2	88
Abbildung 23: Boxplot der mRNA-Expression von FECH	89

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Symptommhäufigkeit bei LGGs und HGGs [6]	18
Tabelle 2: WHO Klassifikation der diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren [10]	23
Tabelle 3: WHO Klassifikation ependymaler Tumoren und anderer Gliome [10] .	24
Tabelle 4: Gliome und deren Prognose [25,26]	28
Tabelle 5: Zusammensetzung des NP-40-Puffers	57
Tabelle 6: Zusammensetzung des Inhibitor-Cocktails	57
Tabelle 7: Zusammensetzung des NP-40-Lysepuffers	57
Tabelle 8: Bestandteile des Trenngels	58
Tabelle 9: Bestandteile des Sammelgels	59
Tabelle 10: Zusammensetzung des Towbin-Puffers	60
Tabelle 11: TBS-Stock	61
Tabelle 12: Zusammensetzung des TBS-Tween	61
Tabelle 13: Zusammensetzung der Puffer für die RNA-Gelelektrophorese	64
Tabelle 14: Zusammensetzung des Formaldehyd-Agarose-Gels	64
Tabelle 15: Ablauf der qRT-PCR	65
Tabelle 16: Primer für qRT-PCR	66
Tabelle 17: Studienkollektiv	68
Tabelle 18: Molekulargenetische Untersuchungsergebnisse	71
Tabelle 19: Kontrastmittelaufnahme und intraoperative Fluoreszenz bei Gliomen WHO Grade II-IV	72

Tabelle 20: In vitro Fluoreszenz 2 Stunden nach 5-ALA-Exposition..... 75

Tabelle 21: In vitro Fluoreszenz 24 Stunden nach 5-ALA-Exposition..... 76

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: In der Therapie von Gliomen ist das Resektionsausmaß für das progressionsfreie Überleben entscheidend. Als hirneigene Tumoren zeigen Gliome ein infiltratives Wachstum, daher ist es herausfordernd zwischen malignem Gewebe und gesundem Hirn zu unterscheiden. Deshalb wird 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) zur fluoreszenzgestützten Resektion von hochgradigen Gliomen (Abk. HGG, engl. für *high-grade glioma*) in der Neurochirurgie eingesetzt. 5-ALA ist ein Metabolit der Häm-Biosynthese, der unter physiologischen Umständen zu Häm verstoffwechselt wird. In malignen Gliomzellen kommt es aus noch unvollständig geklärten Gründen zur pathologischen intrazellulären Akkumulation von fluoreszierendem Protoporphyrin IX (PpIX), einem Zwischenprodukt des Häm-Stoffwechsels. Als mögliche Ursache werden einerseits eine selektive Aufnahme von 5-ALA in die Gliomzellen und andererseits Veränderungen in der Expression von an der PpIX-Synthese beteiligten Enzymen und Transportern diskutiert.

Ziel dieser Arbeit: Nur ungefähr 10 bis 20 % der niedriggradigen Gliome (Abk. LGG, engl. für *low-grade glioma*) zeigen intraoperativ eine sichtbare Fluoreszenz nach Gabe von 5-ALA. Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Ursachen für die fehlende Fluoreszenz zu untersuchen. Durch *in vitro* Experimente sollte erforscht werden, ob niedriggradiges Gliomgewebe eine detektierbare PpIX-Fluoreszenz zeigt, wenn 5-ALA frei verfügbar ist. Darüber hinaus wurde die Aktivität des Enzyms Ferrochelatase (FECH) und des adenosine triphosphate (ATP) binding cassette Transporters G2 (ABCG2) analysiert.

Material und Methoden: Für die Studie wurde operativ entferntes Gliomgewebe von 19 Personen untersucht. Gliomproben und Gliom-Zelllinien wurden *in vitro* mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5-ALA inkubiert und anschließend wurde die Fluoreszenz mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop detektiert. Außerdem wurden Western Blot und PCR (Abk. engl. für *polymerase chain reaction*) zur Bestimmung der FECH- und ABCG2-Expression eingesetzt.

Ergebnisse: 2 Stunden nach der Inkubation mit 5-ALA zeigten 56 % der LGGs und 50 % HGGs Fluoreszenz. 24 Stunden nach 5-ALA-Exposition war in allen Gliomen (n=15), die in die Auswertung eingeschlossen wurden, Fluoreszenz detektierbar. Die FECH-Expression war in allen Gliomen verglichen mit gesundem Hirngewebe reduziert, wobei in Glioblastomen die niedrigsten Werte gemessen wurden. Die ABCG2-Expression in Glioblastomen war gegenüber den Oligodendrogliomen signifikant vermindert ($p < 0,012$). Gliome, die 2 Stunden nach 5-ALA-Exposition Fluoreszenz-positiv waren, wiesen eine geringere ABCG2-Expression auf, als jene ohne Fluoreszenz.

Schlussfolgerung: Unsere Forschungsergebnisse demonstrieren, dass niedriggradige Gliome zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inkubation mit 5-ALA *in vitro* eine detektierbare PpIX-Fluoreszenz aufweisen.

ABSTRACT

Background: In the surgical treatment of gliomas the extent of resection plays a critical role on progression-free survival. As gliomas are intrinsic brain tumours, they exhibit an infiltrative growth pattern, making it challenging to intraoperatively distinguish malignant tissue from healthy brain. To partly overcome this difficulty, 5-aminolevulinic acid (5-ALA) has been used successfully in the fluorescence-guided resection of *high*-grade gliomas (HGGs). 5-ALA is a metabolite of hem-biosynthesis, which is catalysed to hem under physiological conditions. In malignant glioma cells there is, for yet not fully understood reasons, a pathological intracellular accumulation of fluorescing protoporphyrin IX (PpIX), a product of hem-metabolism. A selective uptake of 5-ALA in glioma cells and/or alterations in the expression of enzymes and transporters of PpIX-synthesis are discussed as possible causes.

Aim of this study: Intraoperatively only about 10 to 20 % of *low*-grade gliomas (LGGs) demonstrate visible fluorescence after administration of 5-ALA. Aim of the study was to investigate the potential causes for this absence of fluorescence. Through *in vitro* experiments it should be explored, if low-grade glioma tissue displays detectable fluorescence when 5-ALA is freely available. Furthermore, the activity of the enzyme ferrochelatase (FECH) and of adenosine triphosphate (ATP) binding cassette transporter G2 (ABCG2) were analysed.

Methods: Surgically removed glioma tissue from 19 patients was examined for this study. Glioma tissue and glioma cell lines were incubated *in vitro* with different concentrations of 5-ALA and afterwards the fluorescence was examined with a confocal laser scanning microscope. Additionally, western blot analysis and polymerase chain reaction (PCR) were performed to determine the expression of FECH and ABCG2.

Results: 2 hours after incubation with 5-ALA 56 % of LGGs and 50 % of HGGs revealed fluorescence. 24 hours after exposure to 5-ALA, fluorescence was detectable in all gliomas which were included in the analysis (n=15). FECH-expression was reduced in all glioma samples compared to healthy brain tissue, whereas the lowest value was measured in glioblastomas. Compared to oligodendrogliomas, ABCG2-expression in glioblastomas was significantly decreased ($p < 0,012$). Gliomas with positive fluorescence 2 hours after exposure to 5-ALA featured a lower ABCG2-expression than those without fluorescence.

Conclusion: Our results demonstrate that detectable PpIX-fluorescence can be elicited in LGGs at different time points after *in vitro* incubation with 5-ALA.

1 EINLEITUNG

1.1 GLIOME

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit Gliomen im Allgemeinen. Es wird auf die verschiedenen Unterarten, Häufigkeit und mögliche Ursachen, sowie auf die Symptomatik eingegangen. In weiteren Abschnitten werden Diagnostik, Klassifikation, Therapie und Prognose von diesen hirneigenen Tumoren behandelt.

1.1.1 Definition

Gliome sind intrakranielle Tumoren, die aus hirneigenem, neuroepithelalem Gewebe hervorgehen. Gliazellen machen einen großen Anteil (ca. 90 %) der im zentralen Nervensystem vorkommenden Zellen aus und haben wichtige, unterstützende Funktionen für neuronale Vorgänge. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Gliazellen des peripheren und des zentralen Nervensystems. Zu letzteren zählen die Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikro- oder Mesoglia sowie Ependymzellen. Je nachdem von welcher Zellart der Tumor ausgeht, spricht man von Astrozytomen, Oligodendrogliomen oder Ependymomen [1].

1.1.2 Epidemiologie

Weltweit treten Gliome mit einer Inzidenz von 6 Erkrankungen pro 100.000 Menschen pro Jahr auf und sind die häufigsten primären Hirntumoren [2]. Standardmäßig werden Gliome in 4 World Health Organisation (WHO)-Malignitätsgrade eingeteilt: WHO Grade I und II werden auch als niedriggradige Gliome (Abk. LGG, engl. für *low-grade glioma*) bezeichnet, WHO Grade III und IV als hochgradige Gliome (Abk. HGG, engl. für *high-grade glioma*).

1.1.3 Ätiologie

Die Ätiologie von Hirntumoren im Allgemeinen ist bisher nicht ausreichend geklärt. In unter 5 Prozent der Fälle liegt eine Assoziation mit hereditären Risikofaktoren vor: Zu erwähnen sind das Li-Fraumeni-Syndrom, die familiäre adenomatöse Polyposis, das Lynch-Syndrom, die Neurofibromatose Typ 1 sowie das familiär gehäufte Auftreten von Glioblastomen und Melanomen [3,4]. Für Verwandte ersten Grades eines Menschen mit Gliom besteht ein zweifach erhöhtes Risiko ebenfalls einen Hirntumor zu entwickeln [3]. Von den untersuchten Umweltfaktoren wie zum Beispiel Rauchen, Handynutzung oder Ernährung, konnte lediglich die ionisierende Strahlung als eindeutiger Risikofaktor identifiziert werden [5].

1.1.4 Symptomatik

Die klinische Symptomatik von hirneigenen Tumoren hängt vorwiegend von der Lokalisation und der Wachstumsgeschwindigkeit ab. Es wird zwischen fokalen und generalisierten neurologischen Symptomen unterschieden. Schnell wachsende Tumoren führen zu einem Anstieg des Hirndrucks, was sich als Kopfschmerzen, Doppelbilder, Übelkeit und/oder Erbrechen äußern kann. Zu den fokalen Zeichen zählen senso-motorische Ausfälle, Sprachstörungen, Wesensänderungen oder Gesichtsfeldeinschränkungen [6]. Die Symptomatik variiert mit der Tumorentität. Eine rasch progrediente Hemiparese spricht eher für ein HGG, während neu aufgetretene epileptische Anfälle eher bei LGGs beobachtet werden. Die häufigsten Symptome bei LGGs und HGGs sind in *Tabelle 1* aufgelistet [6].

Symptom	LGGs	HGGs
Kopfschmerzen	40 %	50 %
Epileptische Anfälle	65 – 95 %	15 – 25 %
Hemiparesen	5 – 15 %	30 – 50 %
Wesensänderungen	10 %	40 – 60 %

Tabelle 1: Symptomhäufigkeit bei LGGs und HGGs [6]

1.1.5 Diagnostik

Bildgebung in der Primärdiagnostik

Die Methode erster Wahl zur Hirntumordiagnostik ist die Magnetresonanztomographie (MRT) mit zumindest T1-gewichteten Sequenzen vor und nach Kontrastmittelapplikation (typischerweise wird ein Gadolinium-haltiges Mittel verwendet) sowie T2-gewichtete und FLAIR (Abk. engl. für *fluid attenuated inversion recovery*)-Sequenzen [7]. Für eine aussagekräftige Bildgebung sind eine Schichtdicke unter 5 Millimeter und Aufnahmen in mehreren Ebenen optimal.

Niedriggradige Gliome stellen sich in der MRT meist als eine diffuse, nicht kontrastmittelaufnehmende Expansion dar, die am besten auf T2- oder FLAIR-Aufnahmen als hyperintense Läsion zu erkennen ist. Klassischerweise sind diese Tumoren kaum von perifokalem Ödem umgeben. Oligodendrogliome weisen in 50 % der Fälle Verkalkungen auf und haben durch Zysten und Einblutungen oft ein heterogenes Erscheinungsbild. Hochgradige Gliome und vor allem Glioblastome präsentieren sich durch die Kontrastmittelaufnahme, zunehmende Nekrosen sowie das peritumorale Ödem in der Bildgebung typischerweise polymorph [8].

Zusätzlich zur MRT können weitere bildgebende Verfahren eingesetzt werden: Die Computertomographie (CT) ist vor allem zur Notfalldiagnostik (Blutungen) und zur Erkennung von fokalen Verkalkungen geeignet, die (in diesem Zusammenhang heutzutage selten angewendete) zerebrale Angiographie kann zur Operationsplanung genutzt werden und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) stellt metabolische Hotspots dar, die bei der genauen Zielführung von Biopsien von Bedeutung sein können [2].

Untersuchung von Tumorgewebe

Die formale Diagnosestellung erfolgt durch eine obligate histologische und molekulargenetische Untersuchung des pathologischen Gewebes. Die chirurgische Resektion ist daher sowohl eine diagnostische als auch therapeutische Intervention [2]. Wenn eine offene Tumorresektion nicht möglich ist, steht als alternative Methode zur Gewinnung von Tumormaterial die stereotaktisch geführte Biopsie zur Verfügung. Diese wird unter struktureller und/oder metabolischer Bildgebung (MRT/PET) durchgeführt und kann auch in Lokalanästhesie gemacht werden [9].

Neurologische und neuropsychologische Untersuchungen

Sorgfältige neurologische und neuropsychologische Untersuchungen sind erheblich für die Diagnostik sowie für die Beurteilung des Krankheitsverlaufes und des Therapieerfolges. Bei der Erstdiagnose werden neurologische Defizite dokumentiert und für weitere Verlaufsuntersuchungen als Ausgangsbefund genutzt. Neuropsychologische Testverfahren erheben kognitive Fähigkeiten, Verhalten und Affekt. Als Ergebnis der Untersuchungen wird auch der Karnofsky-Index bestimmt: Einschränkungen der Aktivität, Selbstversorgung und Selbstbestimmung der Patientinnen und Patienten, die durch die Erkrankung bedingt werden, können mit dem Index bewertet werden [2].

1.1.6 Klassifikation von Gliomen

Traditionell (vor 2016) wurden Gliome anhand der histologischen Untersuchungsergebnisse nach der WHO Klassifikation in verschiedene Gruppen und die Grade I bis IV eingeteilt. Das Gewebe wird nach Vorkommen zellulärer Atypien, der Anzahl an Mitosen, der mikrovaskulären Proliferation und den Nekrosen beurteilt. Die Bereiche mit der höchsten Malignitätsstufe entschieden damals den Tumorgrad. Fehler in der Diagnosestellung können auftreten, wenn wenig Gewebe, das nicht die Biologie des gesamten Tumors widerspiegelt, für die Untersuchung zur Verfügung steht. Das kann beispielsweise bei einer Biopsie der Fall sein („sampling bias“) [6,10].

2016 wurde die WHO Klassifikation von Tumoren des zentralen Nervensystems aktualisiert. Die neue Einteilung erfolgt erstmals unter Berücksichtigung von molekulargenetischen Parametern in Kombination mit der histomorphologischen Beurteilung. Der Genotyp übersteigt dabei den histologischen Phenotyp. Die neue Nomenklatur beinhaltet eine histopathologische Bezeichnung gefolgt von den genetischen Eigenschaften (siehe *Tabelle 2*). Die aktuellen Gruppierungen haben molekulare Gemeinsamkeiten wie zum Beispiel eine bestimmte Mutation, woraus ähnliche Prognosen und Therapieansätze resultieren. Tumoren ohne Mutationen werden als Wildtyp bezeichnet, wenn eine offizielle Entität existiert. Gibt es keine diagnostische Mutation oder liegen nicht ausreichend Informationen für eine genauere Bezeichnung vor, wird die Abkürzung NOS (not otherwise specified) verwendet [10].

Häufig untersuchte molekulare Marker

IDH-Mutationen

Mutationen der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) 1 oder seltener 2 sind charakteristisch für diffuse Astrozytome und Oligodendrogliome. Diese Mutation tritt vermutlich früh in der Gliomgenese auf. Neu diagnostizierte Glioblastome haben typischerweise einen IDH1-Wildtyp. Eine IDH1-Mutation beim Glioblastom weist auf die Entstehung aus einem niedriggradigen Vorläufer hin. Die molekularen Biomarker lassen somit Rückschlüsse auf die Tumorgenese zu und untermauern die Hypothese einer primären und sekundären Entwicklung des Glioblastoms [2,10].

1p/19q-Kodeletion

Der Verlust chromosomalen Materials auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 und dem langen Arm von Chromosom 19 ist als Biomarker – bei gleichzeitigem Auftreten einer IDH-Mutation – typisch für oligodendrogliale Tumoren [10].

Methylierung des MGMT-Promotors

Die O₆-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist ein Reparaturenzym, das gewisse DNA-Schäden beheben kann [11]. Die Methylierung des MGMT-Promotors hat keinen Einfluss auf die Diagnosestellung, ist jedoch für die Prognose und das Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Temozolomid von Interesse [10]. Durch die Methylierung wird das MGMT-Gen inaktiviert und es wird kein MGMT exprimiert. Folglich werden durch Alkylantien (wozu auch Temozolomid zählt) ausgelöste DNA-Schäden nicht repariert, was zu einem besseren Ansprechen auf die Behandlung führt [11].

Mutation im Histon 3 (H3-K27M-Mutation)

Diese Mutation definiert die neue Entität der diffusen Mittelliniengliome. Sie treten vorwiegend bei Kindern im Bereich der Mittellinie, also zum Beispiel im Thalamus, Hirnstamm oder im Rückenmark, auf. Diese Tumoren haben eine schlechte Prognose [10].

Mutationen des TERT-Promotors und ATRX-Gens

Die Mutationen im Telomerase reverse Transkriptase (TERT)-Promotor und im alpha-thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked (ATRX)-Gen bewirken eine Stabilisierung der Telomere. Sie haben Einfluss auf die Teilungsrate und die Unsterblichkeit der Tumorzellen und demnach auch auf die Prognose [10].

WHO Klassifikation 2016 der Gliome

Tabelle 2 zeigt die neue WHO Klassifikation 2016 der diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren mit Mutationsstatus und WHO Grad.

Diffuse astrozytäre und oligodendrogliale Tumoren	Grad
Diffuses Astrozytom, IDH-mutiert	II
• Gemistozytisches Astrozytom, IDH-mutiert	II
<i>Diffuses Astrozytom, IDH-Wildtyp</i>	II
Diffuses Astrozytom, NOS	II
Anaplastisches Astrozytom, IDH-mutiert	III
Anaplastisches Astrozytom, IDH-Wildtyp	III
Anaplastisches Astrozytom, NOS	III
Glioblastom, IDH-Wildtyp	IV
• Riesenzellglioblastom	IV
• Gliosarkom	IV
• <i>Epitheloides Glioblastom</i>	IV
Glioblastom, IDH-mutiert	IV
Glioblastom, NOS	IV
Diffuses Mittelliniengliom, H3-K27M-mutiert	IV
Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-codeletiert	II
Oligodendrogliom, NOS	II
Anaplastisches Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-codeletiert	III
<i>Anaplastisches Oligodendrogliom, NOS</i>	III
<i>Oligoastrozytom, NOS</i>	II
<i>Anaplastisches Oligoastrozytom, NOS</i>	III
Andere astrozytäre Tumoren	Grad
Pilozytisches Astrozytom	I
• Pilomyxoides Astrozytom	II
Subependymales Riesenzellastrozytom	I
Pleomorphes Xanthoastrozytom	II
Anaplastisches pleomorphes Xanthoastrozytom	III

Tabelle 2: WHO Klassifikation der diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren [10]

Anmerkung: *Kursiv* geschriebene Einträge sind provisorisch, da keine ausreichende Evidenz vorliegt, um diese als eigene Tumorentitäten anzuerkennen.

Tabelle 3 listet die neue WHO Klassifikation 2016 der Ependymome und anderer Gliome mit Mutationsstatus und Tumorgrad auf.

Ependymale Tumoren	Grad
Subependymom	I
Myxopapilläres Ependymom	I
Ependymom	II
• Papilläres Ependymom	II
• Klarzelliges Ependymom	II
• Tanyzytisches Ependymom	II
Ependymom mit RELA-Fusion	II/III
Anaplastisches Ependymom	III
Andere Gliome	Grad
Chordoides Gliom des 3. Ventrikels	II
Angiozentrisches Gliom	I
Astroblastom	

Tabelle 3: WHO Klassifikation ependymaler Tumoren und anderer Gliome [10]

1.1.7 Die häufigsten Gliome und ihre molekularen Marker

Oligodendrogliome

Für die Diagnose eines Oligodendroglioms muss die Kombination der IDH-Mutation und 1p/19q-Kodeletion vorliegen. Besteht das histologische Bild eines Oligodendroglioms und ist keine der oben genannten Mutationen nachweisbar, sind Tumoren der Kindheit wie das pilozytische Astrozytom oder das klarzellige Ependymom auszuschließen [10]. Der Großteil der Oligodendrogliome weist außerdem eine TERT-Promotor-Mutation auf [2,12].

Diffuse und anaplastische Astrozytome

Diffuse Astrozytome WHO Grad II und anaplastische Astrozytome WHO Grad III haben typischerweise eine IDH-Mutation. Charakteristisch ist auch der Verlust der nukleären ATRX-Expression [2,10,12]. Die Diagnose IDH-Wildtyp ist bei diesen Tumorentitäten äußerst ungewöhnlich, daher ist eine sorgfältige Überprüfung empfohlen, um zum Beispiel eine Verwechslung mit einem Glioblastom zu vermeiden [10].

Glioblastome

Ungefähr 90 % der Glioblastome sind vom IDH-Wildtyp und werden klinisch als primäre Glioblastome bezeichnet, das heißt sie entstehen *de novo*. Diese Tumoren betreffen häufig Personen im Alter von über 55 Jahren. Die anderen 10 % werden sekundäre Glioblastome genannt und zeigen eine IDH-Mutation. Sie sind mit der vorbekannten Diagnose eines niedriggradigen diffusen Glioms vergesellschaftet und kommen bei jüngeren Menschen vor [10,13].

1.1.8 Allgemeine Therapieempfehlungen

Wenn möglich sollte primär immer eine (Teil)Resektion des Tumors angestrebt werden, da dadurch eine rasche Reduktion der Tumormasse bei gleichzeitiger histologischer Diagnosestellung erreicht wird. Bei Inoperabilität sollte eine diagnostische Biopsie durchgeführt werden. Gliome sind mit wenigen Ausnahmen rein chirurgisch nicht heilbar, da sie ein infiltratives Wachstum zeigen [14]. Bei Gliomen WHO Grade III und IV ist daher eine adjuvante postoperative Therapie indiziert. Eine Nachbehandlung von Gliomen WHO Grad II kann bei Vorliegen folgender Risikofaktoren diskutiert werden: Alter über 40 Jahre, subtotale Resektion, neurologische Ausfälle, unkontrollierbare Anfälle, Tumorgöße über 6 cm oder Überschreiten der Mittellinie [15]. Wurde makroskopisch eine komplette Entfernung erreicht und liegen keine der genannten Risikofaktoren vor, müssen auch WHO Grad II Tumoren postoperativ regelmäßig kontrolliert werden, da Rezidive in der Natur dieser Erkrankung liegen [2].

Präoperative Behandlung

Zur präoperativen Behandlung gehört die antiödematöse Therapie, um den eventuell durch große Tumormassen und das konsekutive Perifokalödem bewirkten erhöhten Hirndruck zu senken und um einem möglichen reaktiven postoperativen Ödem entgegenzuwirken. Zum Einsatz kommen hauptsächlich Kortikosteroide wie Dexamethason, sowie osmotisch wirksame Substanzen wie Mannitol. Patientinnen und Patienten mit rezidivierenden epileptischen Anfällen sollten außerdem eine Therapie mit Antikonvulsiva erhalten [2].

Chirurgische Resektion

Das Ziel der Operation ist neben der Diagnosestellung, so viel Tumorgewebe wie möglich zu entfernen ohne dabei neue neurologische Defizite zu verursachen. Intraoperativ stehen eine Reihe von Hilfsmitteln zur Verfügung, um das Resektionsausmaß zu steigern und gleichzeitig das Risiko für die Patientinnen und Patienten so gering wie möglich zu halten. Dazu zählen chirurgische Navigationssysteme basierend auf präoperativen MRT-Bildern, die intraoperative MRT, Ultraschall, das elektrophysiologische Monitoring (direkte kortikale Stimulation, evozierte Potenziale, Elektromyographie) und die fluoreszenzgestützte

Resektion unter Verwendung von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) [16]. Weiters kann zur optimalen Funktionsschonung eine „Wachoperation“ zum Einsatz kommen. Dabei wechseln Phasen von Analgosedierung und Wachzustand, was zum Beispiel eine neurolinguistisch geführte Sprachkartierung des Cortex ermöglicht [2,17].

Postoperative Bildgebung

Nach einer Gliom-Operation sollte zur Beurteilung des Resektionsausmaßes immer eine frühe postoperative MRT-Bildgebung innerhalb von 24 (bis maximal 72) Stunden durchgeführt werden [18].

Strahlentherapie

Die fraktionierte Strahlenbehandlung erfolgt in der Regel in Einzeldosen von 1,8 bis 2,0 Gray (Gy) an 5 Tagen pro Woche für einen Zeitraum von 5 bis 6 Wochen, was eine Gesamtdosis von 50 beziehungsweise 60 Gy ergibt. Die Dosis und die Häufigkeit der Bestrahlungen können auch in Abhängigkeit des Alters, der Tumorentität und des Malignitätsgrades variieren [19,20].

Für die Auswahl des Zielvolumens und für die Bestrahlung selbst stehen Methoden und Techniken zur Verfügung, um das gesunde Hirngewebe und strahlensensible Areale wie den Nervus opticus, die Hypophyse oder den Hippocampus bestmöglich zu schützen und das Risiko für Nebenwirkungen zu minimieren. Die Strahlenbehandlung wird daher vorzugsweise bildgeführt und mit modulierter Intensität verabreicht [21].

Chemotherapie

Zur adjuvanten Primärtherapie von (hochgradigen) Gliomen kommt als Standardtherapeutikum vor allem Temozolomid zum Einsatz. Dieses DNA-alkylierende Zytostatikum mit guter Penetranz der Blut-Hirn-Schranke zeigt ein geringes Nebenwirkungsprofil. Liegt eine Methylierung des MGMT-Promotors vor, sprechen die Tumorzellen besser auf den Wirkstoff an, als Gliome ohne diese genetische Veränderung [2]. Daneben wird auch das sogenannte PCV-Schema, eine Kombination aus Procarbazin, Lomustin und Vincristin, vorwiegend für die Behandlung oligodendroglialer Tumoren, verwendet [22].

Weitere Therapiemöglichkeiten

Als antiangiogene Therapie konnte Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen den vascular endothelial growth factor (VEGF), keine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens erzielen [23]. Zahlreiche gezielte und immunologische Therapieansätze wie die Vakzinierung mit Rindopepimut sind bisher nicht ausreichend belegt [2,24].

1.1.9 Prognose und beeinflussende Faktoren

Zu den prognostisch günstigen Faktoren gehören junges Alter, guter Allgemeinzustand und guter neurologischer Zustand bei Diagnose, großes Resektionsausmaß sowie molekulare Marker wie eine IDH-Mutation, MGMT-Promotor-Methylierung oder 1p/19q-Kodeletion. Postoperative Defizite oder ein großes, verbliebenes Tumolvolumen nach chirurgischer Intervention haben, vor allem bei hochgradigen Gliomen, einen negativen Einfluss auf die Prognose [2,10]. Die Prognose der verschiedenen Tumorgrade und -entitäten unter den aktuellen Therapien ist in *Tabelle 4* dargestellt.

WHO Grad	Histologie und molekulare Marker	Mittleres Gesamtüberleben
II	Oligodendrogliom, IDH-mutiert, 1p/19q-codeletiert	Über 10 Jahre
	Diffuses Astrozytom, IDH-mutiert	Über 10 Jahre
	Diffuses Astrozytom, IDH-Wildtyp	Bis 3 Jahre
III	Oligodendrogliom, IDH-mutiert, 1p/19q-codeletiert	10 Jahre
	Diffuses Astrozytom, IDH-mutiert	6-8 Jahre
	Diffuses Astrozytom, IDH-Wildtyp	1-4 Jahre
IV	Glioblastom, MGMT-methyliert	23 Monate
	Glioblastom, MGMT nicht methyliert	14 Monate

Tabelle 4: Gliome und deren Prognose [25,26]

1.1.10 Nachsorge und Kontrollen

Die MRT ist die Standard-Untersuchung zur Bewertung des Rest- bzw. Rezidivtumorwachstums und des Therapieansprechens. Dabei kann eine Differenzierung zwischen einer echten Progression und einer sogenannten Pseudoprogression, die hauptsächlich nach einer Bestrahlung beobachtet werden kann, schwierig sein. Der Einsatz einer Perfusions-MRT, einer MRT-Spektroskopie oder einer Aminosäure-PET-Untersuchung können dabei in manchen Fällen hilfreich sein [2].

1.1.11 Rezidive

Da Gliome infiltrativ wachsen, sind Rezidive die Regel. Im Folgenden werden die Möglichkeiten zur Behandlung eines Rezidivs erläutert.

Operation

Die erneute Resektion sollte in Betracht gezogen werden, wenn eine frühe Progression im MRT auftritt oder die erste Operation unzureichend war. Personen, bei denen der kontrastmittelaufnehmende Tumor nicht vollständig entfernt werden konnte, profitieren besonders von einem erneuten Eingriff [27]. Aufgrund der häufig eloquenten Lokalisation dieser Tumoren benötigen niedriggradige Gliome oft ein mehrzeitiges operatives Vorgehen.

Radiotherapie

Eine erneute, gegebenenfalls stereotaktische Radiotherapie kann in bestimmten Fällen eine weitere Therapieoption sein. Berücksichtigt werden müssen dabei der zeitliche Abstand zur und die Dosis der letzten Bestrahlung sowie die Lokalisation des aktuellen Zielvolumens [28].

Chemotherapie

Als weitere systemische Therapiemöglichkeiten stehen Nitrosoharnstoffe wie Lomustin, eine erneute Behandlung mit Temozolomid oder der VEGF-Antikörper Bevacizumab zur Verfügung [2,29]. Letzterer ist jedoch kostspielig und hat sich in der Praxis nicht ausreichend bewährt.

Die wiederholte Chemotherapie mit Temozolomid hat am ehesten Erfolg, wenn eine Methylierung des MGMT-Promotors vorliegt [2,27]. Bedingt durch multiple genetische Mutationen ist der Nutzen einer erneuten Chemotherapie beim Rezidiv generell schwächer ausgeprägt, als bei der ersten Anwendung („Tumorresistenz“).

1.2 DIE FLUORESZENZGESTÜTZTE RESEKTION

Das primäre Behandlungsziel bei hochgradigen Gliomen ist es, möglichst viel des kontrastmittelaufnehmenden Tumors operativ sicher zu entfernen. Komplette Tumorentfernungen werden lediglich bei einer Minderheit erreicht, da aufgrund des diffusen infiltrativen Wachstums die Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und gesundem Hirngewebe unter dem konventionellen Weißlicht-Mikroskop Schwierigkeiten bereitet. Seit einigen Jahren wird daher 5-Aminolävulinsäure erfolgreich zur fluoreszenzgestützten Resektion von malignen Gliomen eingesetzt.

1.2.1 5-Aminolävulinsäure

5-ALA ist ein natürlich vorkommender Metabolit in der Häm-Biosynthese und wird normalerweise über Protoporphyrin IX (PpIX) zu Häm verstoffwechselt. Unter physiologischen Umständen ist die endogene 5-ALA-Produktion mittels negativen Feedbackmechanismus durch Häm kontrolliert. In Tumorzellen scheinen gewisse Stoffwechselforgänge beeinträchtigt zu sein und es kommt bei exogener Zufuhr von 5-ALA zu einer selektiven pathologischen Akkumulation von fluoreszierendem PpIX in den Zellen [30].

5-ALA und die Hämsynthese

5-ALA wird in den Mitochondrien durch das Enzym ALA-Synthase aus Succinyl-Coenzym A und Glycin gebildet. Im nächsten Schritt kondensieren zwei Moleküle 5-ALA im Zytosol zu Porphobilinogen. Als weitere Zwischenprodukte entstehen Uroporphyrinogen III und Coproporphyrinogen III. Letzteres gelangt über den adenosine triphosphate binding cassette transporter, kurz ABC-Transporter, B6 wieder ins Mitochondrium und wird über einen weiteren Zwischenschritt in PpIX umgewandelt. Das Enzym Ferrochelatase (FECH) katalysiert im letzten Schritt durch Einbau eines zweiwertigen Eisenions in das Zentrum des PpIX-Moleküls das Endprodukt Häm.

1.2.2 Mechanismen der PpIX-Akkumulation

Einige Faktoren scheinen bei der PpIX-Akkumulation in Tumorzellen eine Rolle zu spielen. Einerseits werden die selektive Aufnahme von 5-ALA in die Tumorzellen und andererseits enzymatische Veränderungen, die die Anhäufung von PpIX fördern, diskutiert [31].

Im physiologischen Zustand ist die Blut-Hirn-Schranke für 5-ALA nahezu impermeabel [32,33]. Bei hochgradigen Hirntumoren ist die Barriere durch die Angiogenese und das Einsprossen von Kapillaren defekt und daraus resultiert vermutlich eine gesteigerte Permeabilität. 5-ALA ist mit einem molekularen Gewicht von 131 Dalton ein kleines Molekül. Deswegen sind minimale Änderungen, die zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke führen, ausreichend, damit diese für 5-ALA passierbar ist [31].

Als Nächstes muss 5-ALA in die Zelle gelangen, damit es weiter zu PpIX verstoffwechselt werden kann. Für diesen Schritt kommen einige Transporter, darunter die Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2, in Frage [31,34,35]. Peptidtransporter sind Natrium-unabhängige und pH-sensitive Transporter, die Di- und Tripeptide über biologische Membranen befördern [34]. Das Vorkommen von PEPT2 in Astrozyten und im Plexus choroideus konnte in Experimenten mit Mäusen und Ratten bestätigt werden. Die Autoren gehen aufgrund der Studienergebnisse davon aus, dass PEPT2 eine bedeutsame Rolle bei der 5-ALA-Aufnahme ins Hirngewebe hat [34,35]. Eine in Japan durchgeführte Studie bekräftigt diese Hypothese. Die Expressionslevel von PEPT2 waren in den untersuchten Fluoreszenz-positiven Gliomen WHO Grad II und III höher, als in den Fluoreszenz-negativen Proben. Darüber hinaus veranschaulichten Versuche, dass eine durch small interfering ribonucleic acid (siRNA) verminderte Expression von PEPT2 zu einer schwächeren PpIX-Fluoreszenz führte [36]. Die genauen Mechanismen der 5-ALA-Aufnahme in die Zelle sind allerdings bisher nicht ausreichend geklärt.

Die ersten Schritte der Verstoffwechslung von 5-ALA finden im Zytoplasma statt. Als Zwischenprodukt entsteht Coproporphyrinogen III, das über den Transporter ABCB6 vom Zytoplasma ins Mitochondrium gelangt. Mit verschiedenen Versuchen an intraoperativ gewonnenem Gliomgewebe und Zelllinien konnte eine Forschergruppe nachweisen, dass die ABCB6 Expressionslevel mit der Fluoreszenzintensität korrelieren. So zeigte intraoperativ stark fluoreszierendes Gewebe eine höhere ABCB6 Expression, als schwach fluoreszierende Areale. In Zellexperimenten konnte durch eine vermehrte Expression von ABCB6 die Akkumulation von PpIX signifikant gesteigert werden, während die Ausschaltung des ABCB6-Transporters zu einer verminderten PpIX-Fluoreszenz führte [37].

An der Metabolisierung von 5-ALA sind zahlreiche Enzyme beteiligt. Das am meisten untersuchte heißt Ferrochelatase (FECH), die im Mitochondrium PpIX zu Häm weiter verstoffwechselt. Teng *et al.* konnten zeigen, dass eine verminderte Expression der FECH in Gliomgewebe verglichen mit normalem Hirngewebe für die gesteigerte Akkumulation von PpIX verantwortlich sein könnte [38]. Aus der verminderten FECH-Aktivität resultiert eine geringere Verstoffwechslung des PpIX zu Häm und somit eine Anhäufung des PpIX. Zudem kann die PpIX-Fluoreszenz durch den Einsatz eines Eisen-Komplexbildners wie Deferoxamin um das 1,9-fache gesteigert werden [39].

Über den ABCG2-Transporter wird PpIX aus der Zelle ausgeschleust. Er ist außerdem bekannt als „breast cancer resistance protein“ und spielt wahrscheinlich eine erhebliche Rolle bei unzureichender Wirkung von beispielsweise Chemotherapeutika [40]. Japanische Forscher haben in Experimenten an gastrointestinalen Krebszelllinien herausgefunden, dass eine niedrige Expressionsrate von ABCG2 mit einer höheren PpIX-Fluoreszenzintensität einhergeht [41]. Eine weitere japanische Studie konnte veranschaulichen, dass ABCG2 nicht ausschließlich in der Plasmamembran vorkommt, sondern auch in Zellorganellen, vor allem in den Mitochondrien. Durch einen selektiven ABCG2-Inhibitor konnte in menschlichen embryonalen Nierenzellen die mitochondriale PpIX-Akkumulation gesteigert werden [42].

In Versuchen mit der menschlichen Hirntumor-Zelllinie U-87 MG konnte durch den ABCG2-Inhibitor Gefitinib ebenfalls eine Steigerung der PpIX-Fluoreszenz erreicht werden. Im Tiermodell wurden U-87 MG-Zellen Mäusen subkutan injiziert und nach 3 Tagen wurden sie nach Gabe von 5-ALA allein oder 5-ALA und Gefitinib mit LED-Licht behandelt. Die Gruppe, die mit 5-ALA und Gefitinib behandelt wurde, zeigte kein signifikant vermindertes Tumorwachstum, woraus die Wissenschaftler schlussfolgerten, dass Gefitinib den ABCG2-Transporter nicht ausreichend relevant zu blockieren vermag [43].

Die exakten Mechanismen der selektiven PpIX-Akkumulation in Tumorzellen sind bisher ebenfalls nicht ausreichend belegt. Am wahrscheinlichsten ist es, dass multiple Faktoren beteiligt sind. Eine schematische Darstellung der Verstoffwechslung von 5-ALA und der beteiligten Enzyme und Transporter zeigt *Abbildung 1*.

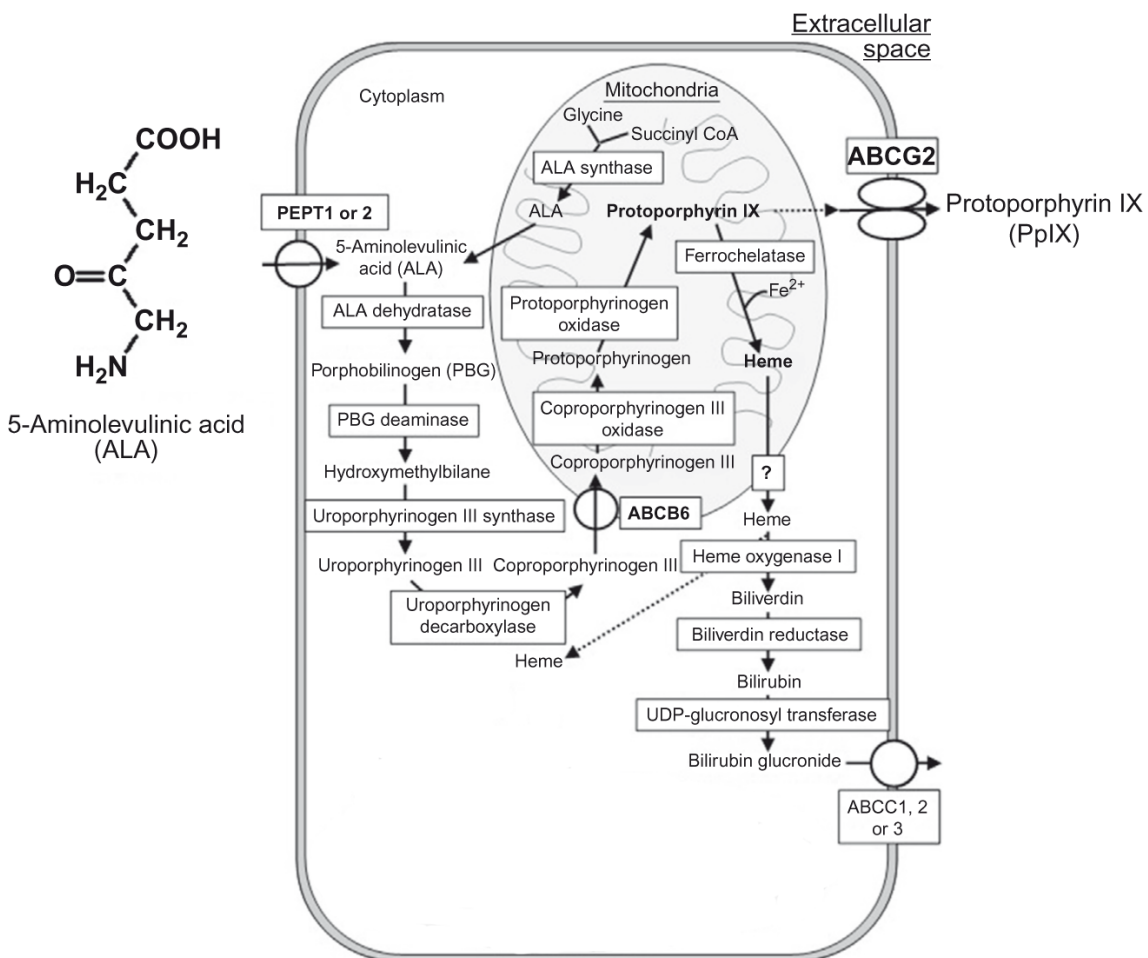


Abbildung 1: Biosynthese von Porphyrinen und Häm [43]

1.2.3 Fluoreszenz

Das Verhalten eines Moleküls, Lichtenergie einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren (= Anregungslicht) und Nanosekunden später Lichtenergie mit einer größeren Wellenlänge zu emittieren (= Emissionslicht), bezeichnet man als Fluoreszenz. Elektronen gelangen durch die Absorption der Photonen auf ein höheres Energieniveau, auf dem sie sich nicht lange halten können, und fallen wieder auf ihr Ausgangsniveau zurück. Dabei kommt es zu einer Energieabgabe, die als Fluoreszenzlicht erscheint. Da bei diesem Prozess Energie verloren geht, hat das emittierte Licht eine geringere Energie und gleichzeitig eine höhere Wellenlänge, als das absorbierte Licht. Bei der PpIX-Fluoreszenz besitzt das Anregungslicht eine kürzere Wellenlänge, die sich im blauen Lichtspektrum befindet, während das Emissionslicht im roten Bereich liegt. Die Differenz der Wellenlängen zwischen Anregungs- und Emissionslicht wird Stokes-Differenz genannt [44].

Fluorophore

Fluorophore sind ringförmige Moleküle, bei denen nach Lichtanregung Fluoreszenz auftritt. Stoffe, die für die Färbung benutzt werden, heißen Fluorochrome oder Fluoreszenzfarbstoffe. Von Autofluoreszenz spricht man, wenn Systeme oder Gewebe ohne Anfärben, also „von selbst“, leuchten [45].

Fluorophore werden früher oder später durch das Anregungslicht zerstört, was Fotobleichung (engl. *photobleaching*) genannt wird. Je nach Stabilität des fluoreszierenden Präparats tritt dieser Prozess schneller oder langsamer ein. Bei lebenden Zellen ist neben dem Bleichen auch die Reaktion des Fluorochroms mit Sauerstoff, welche zelltoxische Effekte hat, problematisch. Um die Zellen zu schützen, sollte die Belichtungszeit deshalb so kurz wie möglich und der Farbstoff photostabil sein [45]. Andererseits kann dieser Prozess auch zur Phototherapie bei einigen Tumoren genutzt werden.

Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzdetektion geht es darum, das Emissionslicht vom Anregungslicht zu unterscheiden, weshalb eine hohe Stokes-Differenz von Vorteil ist. Die Trennung der beiden Lichtquellen gelingt üblicherweise durch den Einsatz von optischen Filtern, die an das fluoreszierende Molekül (Fluorophor), das detektiert werden soll, angepasst werden [44].

In den meisten Fluoreszenzmikroskopen werden Filterwürfel verwendet, um die Filter passend auszurichten. Der Würfel besteht häufig aus einem Exzitationsfilter, einem 45° dichroitischen Spiegel und einem Emissionsfilter. Durch den Exzitations- oder Anregungsfilter wird nur der Teil des Lichts durchgelassen, der die passende Wellenlänge hat, um den Fluorophor anzuregen. Der dichroitische Spiegel fungiert als sogenannter Strahlteiler. Er spiegelt das Anregungslicht zum Objektiv, wodurch das Gewebe fluoresziert und lässt das Fluoreszenzlicht mit höherer Wellenlänge zum Detektor/Okular durch. Da ein geringer Teil des Anregungslichts im Präparat reflektiert wird und zum Detektor gelangen würde, ist noch ein Emissions- oder Sperrfilter notwendig, damit rein das Fluoreszenzlicht abgebildet wird [44].

Schwierig wird die Detektion, wenn zwei oder mehr Fluorophore verwendet werden, da sich die Exzitations- und Emissionsspektren häufig überschneiden. Hierbei sind eine sorgfältige Auswahl und Ausrichtung der verwendeten Filter und Spiegel besonders wichtig. Sollen zwei Fluorophore im Präparat abgebildet werden, sind ein zweiter dichroitischer Spiegel und passende Filter, die das Emissionslicht trennen, notwendig [44]. Der schematische Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops ist in *Abbildung 2* zu sehen.

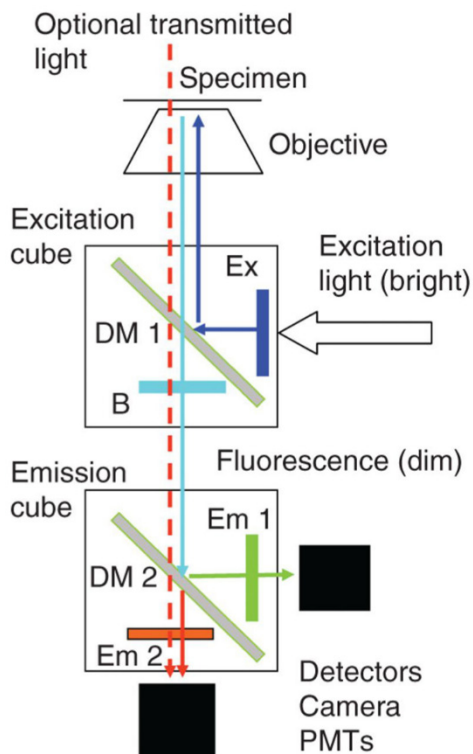


Abbildung 2: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops [44]
 Der Exzitations-Filterwürfel besteht aus einem dichroitischen Spiegel (DM 1), der das Exzitationslicht (dunkelblau) zum Präparat lenkt und die emittierte Fluoreszenz (hellblau) zum Emissions-Filterwürfel durchlässt. Der Sperrfilter (B) hindert das Anregungslicht daran, den Detektor zu erreichen. Der Emissions-Filterwürfel besteht aus einem zweiten dichroitischen Spiegel (DM 2) und zwei Emissionsfiltern (Em 1 und Em 2). Sollen zwei Fluorophore detektiert werden, werden die verschiedenen Emissionslichter (rot und hellblau) durch den Strahlteiler (DM 2) getrennt und durch die Emissionsfilter (Em 1 und Em 2) werden die ungewollten Wellenlängen blockiert.

Konfokalmikroskopie

Konfokalmikroskope sind Lichtmikroskope, die es ermöglichen auch dickere Gewebepräparate scharf abzubilden, da die Beleuchtung Stück für Stück über das Präparat gerastert wird. Das emittierte Licht wird durch eine Lochblende (engl. *pinhole*) gebündelt, die nur Licht aus dem fokussierten Bereich durchlässt. So entstehen optische Schnittbilder des Präparats, die nahezu ausschließlich Licht aus einer bestimmten Schicht in der Fokusebene enthalten [44].

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskope (Abk. CLSM, engl. für *confocal laser scanning microscope*) sind die häufigste Bauform dieser Art von Mikroskopen. Das Anregungslicht ist eine helle Punktquelle, also ein Laser. Sie werden häufig in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Die Bauelemente eines CLSM sind in *Abbildung 3* dargestellt.

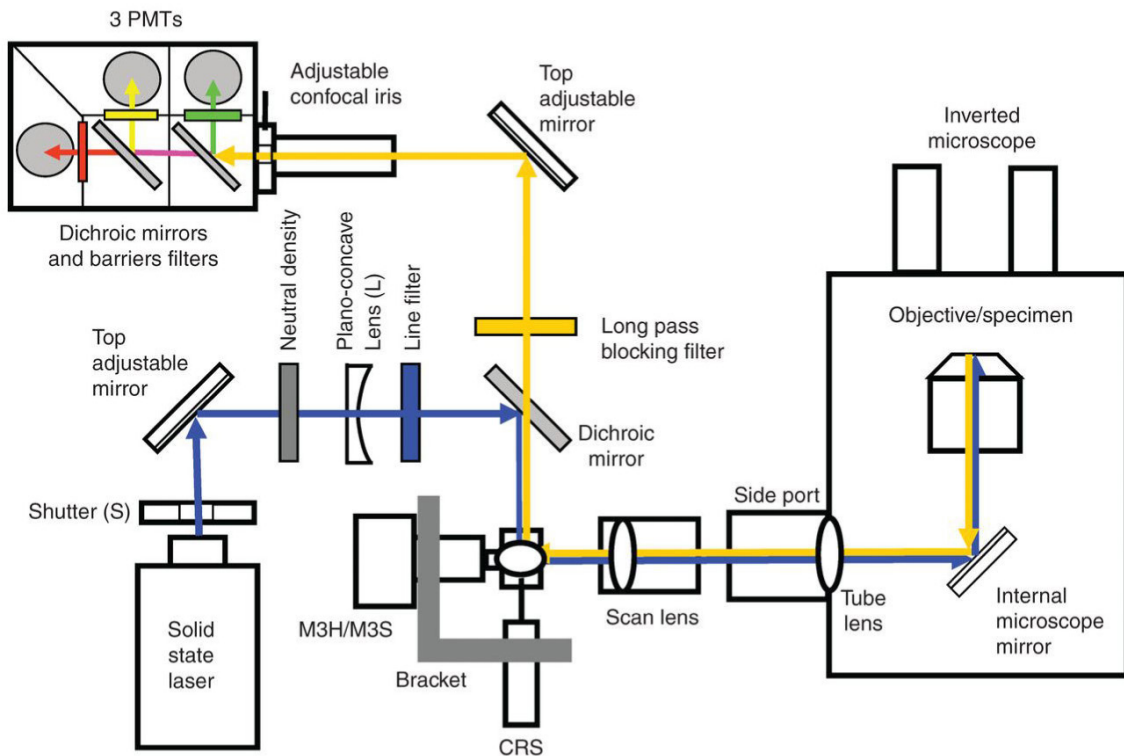


Abbildung 3: Aufbau eines CLSM [44]

Das Laserlicht (blau) wird durch verschiedene Spiegel und Filter über den Strahlteiler zum Präparat gelenkt. Das Licht wird über die Probe gerastert und die emittierte Fluoreszenz (gelb) gelangt über den dichroitischen Spiegel und weitere Spiegel und Filter zum Detektor (Abk. PMT, engl. für photomultiplier tube). Über die Lochblende/Iris wird das Licht gebündelt. Weitere Strahlteiler und Sperrfilter werden genutzt, um Fluoreszenz unterschiedlicher Wellenlängen zu trennen.

1.2.4 Protoporphyrin IX-Fluoreszenz

Fluoreszenzeigenschaften des PpIX

Die Fluoreszenzeigenschaften eines Fluorophors werden genutzt, um bestimmte Moleküle in einem biologischen Gewebe detektieren zu können. Das zu den Porphyrinen zählende PpIX ist ein Fluorophor, der sich selektiv in malignen Tumorzellen ansammeln kann und in der Fluoreszenzdiagnostik in den unterschiedlichsten Disziplinen genutzt wird.

Stummer *et al.* etablierten in den 90iger Jahren die Verwendung von 5-ALA in der Neurochirurgie anhand von Experimenten mit C6-Gliomzellen und Ratten. Die durchgeführten *in vitro* Versuche zeigten, dass die malignen Tumorzellen nach Inkubation mit 1 mM 5-ALA PpIX bildeten. 95 % der Zellen überlebten und 93 bis 95 % der Tumorzellen wiesen eine detektierbare Fluoreszenz auf. Der Anstieg der Fluoreszenz war linear und nach 85 Minuten Inkubationszeit wurde ein Plateau beobachtet. Die Autoren schlossen daraus, dass durch Feedback-Mechanismen kein weiterer Anstieg der PpIX-Fluoreszenz zu erwarten ist, wenn erst einmal eine gewisse Konzentration erreicht wurde. Eine Erhöhung der 5-ALA-Dosis erscheint daher nicht sinnvoll und führt eher zu unerwünschten Nebenwirkungen und toxischen Effekten. Im Tierversuch konnte demonstriert werden, dass 5-ALA die gestörte Blut-Hirn-Schranke in ausreichender Menge passieren kann. Die Fluoreszenz in den hochgradigen Gliomen der Ratten war nach 6 Stunden am größten und nach 9 Stunden begann sie abzusinken [30].

Eine Forschergruppe aus Tübingen in Deutschland untersuchte die Fluoreszenzeigenschaften von acht verschiedenen menschlichen Gliom-Zelllinien, von menschlichen Astrozyten und von zerebellären Ratten-Neuronen. Die Zellen wurden unterschiedlich lang mit 1 mg/ml 5-ALA inkubiert und danach im Fluoreszenzmikroskop, das mit speziellen Filtern ausgestattet war, betrachtet. Das PpIX häufte sich hauptsächlich im Zytoplasma an. Die maximale Fluoreszenz war bei den Zelllinien nach verschiedenen Inkubationszeiten erreicht, ebenso unterschiedlich war der Abfall der Fluoreszenzintensität. Die Forscher konnten auch zeigen, dass ein klarer Unterschied zwischen Neuronen und Gliomzellen besteht [46].

Mikroskopie der PpIX-Fluoreszenz

Die intrazelluläre PpIX-Akkumulation führt durch Anregung mit einer Blaulichtquelle der Wellenlänge 375 bis 440 nm zu einer spezifischen rot-violetten Fluoreszenz. Die Peaks des Emissionslichts liegen wie in *Abbildung 4* zu sehen ist bei 635 und 704 nm [30,47]. Das Fluoreszenzmikroskop wird zur Detektion der PpIX-Fluoreszenz mit einer Kombination von verschiedenen Filtern ausgestattet: ein 395-440 nm Bandpass-Exzitationsfilter (BP), ein 460 nm dichroitischer Spiegel und ein 470 nm Langpass-Emissionsfilter (LP) [30]. Die meisten modernen Operationsmikroskope verfügen über die benötigten Elemente zur fluoreszenzgestützten Resektion oder können aufgerüstet werden.

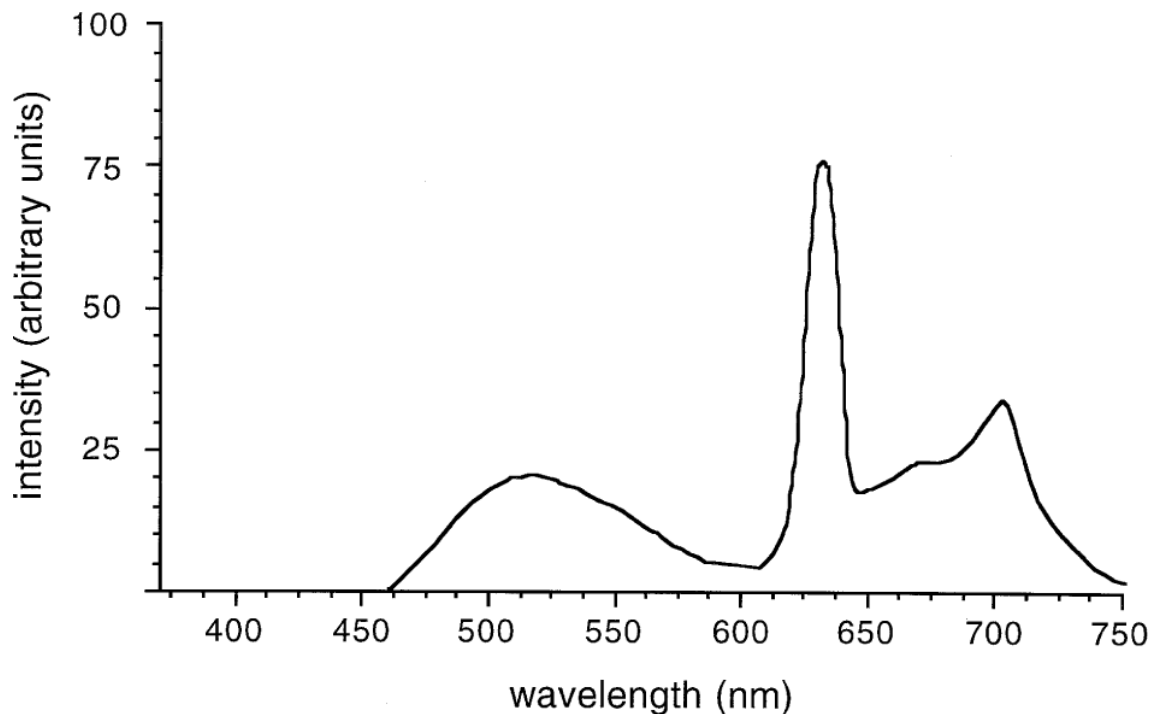


Abbildung 4: Spektrum der PpIX-Fluoreszenz [47]

Spektrum des PpIX mit charakteristischen Peaks des Emissionslichts bei 635 und 704 nm.

Falsch negative Fluoreszenz

Infiltratives Wachstum ist charakteristisch für Gliome. Die Fluoreszenz ist am größten in Bereichen mit hoher Zelldichte und sinkt mit abnehmender Anzahl der Tumorzellen („optische Dilution“). Aufgrund dessen kann in der Infiltrationszone die sichtbare Fluoreszenz im Mikroskop schwach sein oder gar fehlen [48–50]. Mechanismen zur sensibleren Fluoreszenzdetektion, zum Beispiel Konfokalmikroskopie, sind Gegenstand aktueller Forschung [51].

Weitere Gründe für negative oder schwache Fluoreszenz sind Tumornekrosen (keine Biosynthese) und Blaulicht-undurchlässige Blutansammlungen [50,52]. Zuletzt sei noch die Fotobleichung (Verlust der Fluoreszenz durch die Bestrahlung mit dem Anregungslicht) als mögliche Ursache für fehlende Fluoreszenz erwähnt, auch wenn diese in der Gliom-Chirurgie kaum eine Rolle spielt. Ein Abfall auf 36 % Restfluoreszenz konnte während Gliom-Operationen erst nach 25 Minuten Exposition mit blauem und 87 Minuten Bestrahlung mit weißem Licht beobachtet werden [50,52].

1.2.5 Klinischer Einsatz von 5-ALA

Die lokale oder systemische Gabe von 5-ALA führt zu einer starken Akkumulation von PpIX in epithelialen und glandulären Strukturen. Verschiedene Prodrugs kommen beispielsweise bei Hauterkrankungen, Neoplasien im Urogenitaltrakt oder Magen-Darmtrakt und bei Hirntumoren zur Anwendung.

In Europa, Asien und Australien steht als Prodrug 5-ALA-Hydrochlorid unter dem Markennamen gliolan® (medac GmbH, Wedel, Deutschland) für die Gliom-Chirurgie zur Verfügung [50]. Das weiße Pulver wird in Wasser gelöst und den Patientinnen und Patienten mindestens 4 Stunden vor Anästhesiebeginn in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht oral verabreicht. Die PpIX-Konzentration im Plasma ist nach 4 bis 6 Stunden am höchsten und ist bis ungefähr 12 Stunden nach der oralen Gabe detektierbar [30,50]. Aufgrund der 5-ALA-Aufnahme in epitheliale Gewebe, besteht für 24 Stunden nach Verabreichung eine erhöhte Lichtempfindlichkeit der Haut, weshalb die Personen für diesen Zeitraum vor starken Lichteinflüssen (Sonne, Halogenlampen) geschützt werden sollten. gliolan® verursacht kaum Nebenwirkungen, es kann aber zu einem vorübergehenden Anstieg der Leberwerte kommen, selten auch zu Übelkeit oder Erbrechen. Bei Vorliegen einer Porphyrie (Störung des Häm-Stoffwechsels) ist die Produktanwendung kontraindiziert [52,53].

5-ALA in der Diagnostik

In multiplen Studien wurde belegt, dass die diagnostische Genauigkeit von 5-ALA hoch ist. Werte von 90 % und höher konnten für die Sensitivität, Spezifität und den positiven Vorhersagewert (Abk. PPV, engl. für *positive predictive value*) erhoben werden [48,49,54,55]. Tumorbiopsien aus schwach und stark fluoreszierenden Gewebebereichen wurden während Gliom-Operationen entnommen und anschließend auf Tumorzellen untersucht. Starke Fluoreszenz korrelierte mit solidem Tumoranteil und hoher Zelldichte, der PPV lag bei 100 %. In der Infiltrationszone wurden schwache Fluoreszenz, eine geringere Zelldichte und ein PPV von 95 % nachgewiesen [50,55].

Anwendung von 5-ALA bei hochgradigen Gliomen

In der Neurochirurgie wird 5-ALA zur fluoreszenzgestützten Resektion von hochgradigen Gliomen eingesetzt. Neben der erleichterten Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und gesundem Hirngewebe, bringt die durch 5-ALA induzierte Fluoreszenz einen weiteren Vorteil mit sich: Sie erlaubt es den Tumor in Echtzeit zu visualisieren [56]. Ganz im Gegensatz zur Neuronavigation: Präoperativ aufgenommene MRT-Bilder unterliegen intraoperativen Schwankungen des Gehirns (engl. *brainshift*) und sind demnach weniger präzise als die Tumorfluoreszenz [50,57]. Intraoperative MRT und Ultraschall können zwar diese Schwäche der Neuronavigation teilweise ausgleichen, diese Techniken sind aber deutlich teurer und zeitintensiver, als die PpIX-Fluoreszenz [50,58]. Außerdem konnte in Studien gezeigt werden, dass 5-ALA die Tumordinfiltration in Randzonen sensibler detektieren kann, als es mit Neuronavigation oder intraoperativem MRT möglich ist [48,50,59].

In einer randomisierten Phase III Studie (2006) wurden Personen mit hochgradigen Gliomen entweder fluoreszenzgestützt oder konventionell unter Weißlicht operiert. Die Studienergebnisse ergaben eine makroskopisch komplette Resektion bei 64 % der Teilnehmenden nach 5-ALA-Gabe im Vergleich zu 38 % in der Kontrollgruppe. Das progressionsfreie Gesamtüberleben war ebenfalls in der Gruppe, die 5-ALA erhielt, höher [16].

Anwendung von 5-ALA bei niedriggradigen Gliomen

Wie bei den hochgradigen Gliomen ist es auch bei niedriggradigen Gliomen (LGGs) von enormer Bedeutung für die Progressionsfreiheit und das Überleben der Erkrankten eine möglichst vollständige Resektion des Tumors zu erzielen [60]. Infiltratives Wachstum und Schwierigkeiten bei der Unterscheidung zwischen gesundem und krankem Hirngewebe stellen auch hier die Operierenden vor eine fordernde Aufgabe. Trotz moderner Techniken wie der intraoperativen Neuronavigation und MRT wird bei LGGs lediglich in 14 bis 46 % eine komplette Tumorentfernung erreicht [51]. Die Verwendung von 5-ALA zur fluoreszenzgestützten Resektion von LGGs erfolgt bisher nicht routinemäßig, da für diese Indikation aufgrund unzureichender Evidenz keine Zulassung vorhanden ist [60,61]. Während die Mehrheit dieser Tumoren makroskopisch keine brauchbare PpIX-Fluoreszenz aufweist, wurde in 10 bis 20 % der LGGs intraoperativ eine sichtbare Fluoreszenz beschrieben [51,61,62]. In *ex vivo* Versuchen konnte jedoch Fluoreszenz in LGGs *quantitativ* gemessen werden [51,63]. Einige *in vivo* Studien konnten außerdem veranschaulichen, dass bei LGGs PpIX in einer für das menschliche Auge unter dem konventionellen Operationsmikroskop nicht sichtbaren Konzentration vorliegt, weshalb neue Techniken zur Fluoreszenzdetektion intensiv erforscht werden [51,64–66].

Fluoreszenz in LGGs

Niedriggradige Gliome zeigen im MRT typischerweise keine oder lediglich eine geringe Kontrastmittelaufnahme. In fast 50 % der radiologisch als niedriggradig vermuteten Gliome finden sich histologisch allerdings Tumoranteile mit WHO Grad III oder IV [67]. In einer Studie von Widhalm *et al.* wurde berichtet, dass anaplastische Areale mit 5-ALA-induzierter Fluoreszenz intraoperativ mit einer Sensitivität von 89 % und einer Spezifität von 88 % in nicht kontrastmittelaufnehmenden WHO Grad II und III Tumoren nachgewiesen werden konnten [62]. 5-ALA ist demzufolge sensitiver für die Detektion maligner Tumoranteile, als die Kontrastmittelaufnahme allein [61].

Eine andere Studie von Jaber *et al.* untermauert die Hypothese, dass Fluoreszenz in LGGs ein Marker für die maligne Transformation ist und möglicherweise mit der Angiogenese und der epidermal growth factor receptor (EGFR)-Expression korreliert [68]. Es ist bekannt, dass es durch Einsprossen neuer, qualitativ minderwertiger Gefäße zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke kommt und dass die Kontrastmittelaufnahme in der Bildgebung ein Zeichen dafür ist [69]. Ebenso wurde bewiesen, dass es während der schrittweisen Transformation von LGGs zu HGGs zu einer vermehrten Angiogenese kommt [70]. Die Autoren berichten über ein kürzeres Gesamtüberleben der Personen mit fluoreszierenden LGGs und eine kürzere Dauer bis zur radiologisch eindeutigen malignen Entartung [68].

In anderen Untersuchungen wurde ebenfalls gezeigt, dass fluoreszierendes Tumorgewebe mit den Malignitätsparametern der WHO korreliert, nämlich mit der Mitoserate, der Zelldichte, den nukleären Pleomorphismen und dem Proliferationsmarker MIB1 (Abk. engl. für *mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1*) [50,62,71]. Zwischen dem Auftreten von Fluoreszenz und molekularen Markern wie IDH-1, 1p/19q und MGMT-Promotor-Methylierung konnte kein Zusammenhang festgestellt werden [61].

Fluoreszenzdetektion in LGGs

Mit den aktuellen Operationsmikroskopen ist derzeit keine makroskopisch sichtbare Fluoreszenz in der Mehrheit (80 bis 90 %) der LGGs nachweisbar [62,71]. Valdés *et al.* gelang die *quantitative* Messung der Fluoreszenz intraoperativ mit einer faseroptischen Messsonde in 45 % der LGGs, die unter dem Operationsmikroskop keine sichtbare Fluoreszenz aufwiesen [72,73]. Ein Team um Nader Sanai beschäftigt sich mit der Visualisierung der PpIX-Fluoreszenz in LGGs mit dem Konfokalmikroskop. 2011 erschien eine Studie des Autors über zehn Menschen mit Gliomen WHO Grad I oder II, die eine Resektion mit 5-ALA und Konfokalmikroskopie erhielten. Während in keinem Tumor unter dem Operationsmikroskop Fluoreszenz zu sehen war, gelang der PpIX-Nachweis konfokalmikroskopisch in allen Teilnehmenden. Nach Beendigung der konventionellen Resektion, war noch in sechs von zehn Fällen Fluoreszenz an den Resektionsrändern mit dem Konfokalmikroskop detektierbar und auch

histopathologisch wurde eine Tumordinfiltration bestätigt. Die komplette Resektionsrate lag mit Hilfe des Konfokalmikroskops somit im Durchschnitt bei 95 % [51].

Mit Hilfe dieser Techniken könnte es in Zukunft möglich werden, Fluoreszenz auch in niedriggradigen Gliomen zu detektieren. Eine dadurch erzielte maximale Resektion würde vermutlich auch zu einer Verbesserung der Prognose führen.

1.3 ZIEL DIESER ARBEIT

Niedriggradige Gliome weisen eine langsamere Wachstumsrate als hochgradige Gliome auf. Da diese niedriggradigen Tumoren überwiegend bei jüngeren Menschen und in eloquenten Hirnarealen auftreten und sie als hirneigene Tumoren keine klaren Grenzen zum gesunden Hirnparenchym aufweisen, ist eine möglichst radikale Entfernung herausfordernd. Die fluoreszenzgestützte Resektion von *hochgradigen* Gliomen hat sich bereits bewährt. Da die Mehrheit (80 bis 90 %) der LGGs keine makroskopisch sichtbare PpIX-Fluoreszenz aufweist und in diesen Fällen aufgrund unzureichender Evidenz keine Zulassung für die 5-ALA-Methode vorliegt, wird die fluoreszenzgestützte Resektion von LGGs lediglich unter bestimmten klinischen Voraussetzungen (zum Beispiel radiologischer Verdacht auf ein niedriggradiges Gliom mit fokalem Kontrastmittelaufnehmendem Tumoranteil) vorgenommen.

In der Annahme, dass niedriggradige Gliomzellen denselben Ursprung wie die hochgradigen Gliomzellen haben, würde sich die fehlende Fluoreszenz bei ersteren entweder durch eine mangelnde exogene Substrat-Verfügbarkeit (5-ALA) bei unzureichend durchlässiger Bluthirnschranke oder durch die unveränderte Aktivität der an der Häm-Synthese beteiligten Enzymen und Transportern erklären. Die vorgeschlagene Arbeit soll diese beiden Aspekte durch *in vitro* Experimente (Zellkulturen) und Methoden zum Nachweis der Gen-Expression erforschen.

1.3.1 Fragestellung

- 1) Kommt es *in vitro* bei frei verfügbarem 5-ALA zu einer Akkumulation von PpIX in niedriggradigen Gliomen, die sich mit dem Konfokalmikroskop detektieren lässt?
- 2) Ist die Expression der Ferrochelatase in niedriggradigen Gliomen im Vergleich zu gesundem Hirngewebe vermindert?
- 3) Gibt es einen Unterschied der ABCG2-Expression in niedriggradigen Gliomen im Vergleich zu gesundem Hirngewebe oder hochgradigen Gliomen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 STUDIENDESIGN

Im Zeitraum vom 30.01.2018 bis 31.07.2019 wurde Gliomgewebe von 19 Patientinnen und Patienten, die an der Universitätsklinik für Neurochirurgie in Graz operiert wurden, gesammelt. Die menschliche Gliom-Zelllinie U-87 MG wurde für die Etablierung der Experimente und als Positivkontrolle verwendet. Als Negativkontrolle für die Bestimmung der FECH- und ABCG2-Expressionlevel diente menschliches Hirngewebe, das post mortem entnommen wurde. Der für die Studie gestellte Ethikantrag (EK-Nummer: 30-123 ex 17/18) wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz bewilligt (siehe Anhang).

2.1.1 Einschlusskriterien

Patientinnen und Patienten, die im angeführten Zeitraum an der Universitätsklinik für Neurochirurgie eine Operation zur Gliom-Entfernung erhielten, wurden mit einer Einverständniserklärung gebeten, entnommenes Tumorgewebe, das nicht für die Diagnostik benötigt wurde, für Studienzwecke zur Verfügung zu stellen.

Einschlusskriterien waren ein Mindestalter von 18 Jahren und der histologische Nachweis eines niedriggradigen Glioms WHO Grad I oder II. Hochgradige Gliome WHO Grad III und IV wurden als Vergleichsgruppe für die Experimente genutzt.

2.1.2 Gewebe von Operationen

Das Tumorgewebe wurde vom Neurochirurgie-Operationssaal abgeholt und ins Zellkulturlabor gebracht. Ein Teil wurde für *in vitro* Experimente kultiviert, das restliche Gewebe wurde für Western Blot und PCR (Abk. engl. für *polymerase chain reaction*) sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Kontrastmittelaufnahme

Alle Teilnehmenden (ausgenommen ein Patient mit Nierenfunktionsstörung) erhielten präoperativ ein MRT mit Gadolinium-haltigem Kontrastmittel. Die Tumoren wurden entweder als kontrastmittelaufnehmend oder nicht kontrastmittelaufnehmend klassifiziert.

Intraoperative Beurteilung der Fluoreszenz

Einige Patientinnen und Patienten mit kontrastmittelaufnehmenden Tumoranteilen bekamen 4 bis 6 Stunden vor Einleitung der Anästhesie 20 mg/kg Körpergewicht gliolan® als orale Lösung verabreicht. Die intraoperative Beurteilung der Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Leica OH4 Operationsmikroskops mit PpIX-Fluoreszenz Filterset FL400 von Storz durch zwei erfahrene Chirurgen vorgenommen und zum Zweck dieser Studie in „positiv“ oder „negativ“ eingeteilt.

Neuropathologische Untersuchungen

Das während der Operationen entnommene Gliomgewebe wurde von qualifizierten Pathologinnen und Pathologen der Medizinischen Universität Graz untersucht. Die Diagnostik und Einteilung erfolgten anhand der aktuellen WHO Kriterien (Revision von 2016).

Kodierung der Tumorproben

Nach Erhalt des neuropathologischen Befundes wurde für jede Tumorprobe ein Code, bestehend aus Buchstaben und einer fortlaufenden Zahl, vergeben: ODG = Oligodendrogliom, DA = diffuses Astrozytom, AA = anaplastisches Astrozytom und GMB = Glioblastoma multiforme.

2.2 ZELLKULTUREN

2.2.1 Tumorproben

Die Tumorproben wurden in einem Gefäß mit Natriumchlorid (NaCl) 0,9 % oder Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F-12 ohne Phenolrot vom Neurochirurgie-Operationssaal abgeholt und anschließend für 7 Minuten in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) mit 10 % Penicillin-Streptomycin (P/S) gewaschen. Dann wurde das Gewebe in kleine Stücke, ungefähr 2 x 2 mm, zerteilt. Für die Experimente wurden jeweils zwei Stücke pro Well in einer 24-Well-Platte vorbereitet. Das zugefügte Medium bestand aus DMEM/F-12 ohne Phenolrot mit 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % L-Glutamin und 1 % P/S. Die Platten wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt aufbewahrt.

2.2.2 Zelllinie U-87 MG

Die menschliche Gliom-Zelllinie U-87 MG wurde für die Etablierung der Experimente und als Positivkontrolle verwendet. Diese epithelialen Zellen zeigen ein klassisches Monolayer-Wachstum.

Die Zellen wurden in einer Zellkulturflasche mit 175 cm² (T175) und Medium bestehend aus DMEM mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin und 1 % P/S bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Das Medium wurde regelmäßig dreimal pro Woche gewechselt und die Zellen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:5 gesplittet. Für die Versuche wurden die Zellen auf eine Glasplatte mit vier Kammern (*Chamber Slide*) ausgesät.

Zellen auftauen und kultivieren

Die U-87 MG-Zellen wurden aus dem Cryotank entnommen und in einem Dewer (Cryogefäß) mit flüssigem Stickstoff ins Zellkulturlabor gebracht. Das Medium wurde wie oben beschrieben vorbereitet und im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Cryoröhrchen mit den Zellen wurde aus dem Dewer genommen und im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde in der Sicherheitswerkbank (engl. *laminar flow cabinet*) der Inhalt des Röhrchens mit einer Pipette entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen mit Medium gegeben. Die Zellen wurden 4 Minuten bei 800 rpm (Abk. engl. für *revolutions per minute*) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit einer Pipette in Medium resuspendiert, um die Zellen zu vereinzeln. Zuletzt wurden die Zellen in eine T175-Zellkulturflasche mit 25 ml Medium überführt und im Inkubator bei kultiviert.

Passagieren und Splitten von Zellen

Dieser Vorgang wurde durchgeführt, um Zellen in ein anderes Kulturgefäß zu überführen oder/und um die Zelldichte zu verringern. Die U-87 MG-Zellen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:5 gesplittet. Dazu wurde das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt. Dann wurde mit 20 ml PBS gewaschen und dieses ebenfalls abgesaugt. Als Nächstes wurden 2 ml Trypsin in die Flasche pipettiert, geschwenkt und für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Mikroskop wurde kontrolliert, ob sich die Zellen bereits von der Oberfläche abgelöst hatten. Anschließend wurde 20 ml Medium in die Kulturflasche gegeben und geklopft, um die Zellen zu lösen. Der gesamte Inhalt wurde mit einer Pipette aufgesammelt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurde 4 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 10 ml neuem Medium resuspendiert. Ein Fünftel der Zelllösung, also 2 ml, wurde gemeinsam mit 23 ml frischem Medium in die Zellkulturflasche überführt.

Zellen ernten und aussäen

Für die Versuche wurden die Zellen auf *Chamber Slides* ausgesät, pro Kammer wurden 50.000 Zellen aufgebracht. Dazu passagiert man die Zellen wie oben beschrieben. Für die Zellzählung mit dem CASY® (Gerät zur Zellzählung) wurden 50 µl der Zelllösung in ein Gefäß mit CASYton (isotonischer Messpuffer) pipettiert. Nach der Zählung wurde die Konzentration, auf die man die Zellen verdünnen muss, berechnet.

Ein Rechenbeispiel: Auf die *Chamber Slides* wurden 50.000 Zellen in 0,5 ml Medium pro Kammer aufgetragen. Pro Milliliter betrug die Zellzahl also 100.000 und für vier Kammern wurden 2 ml Zelllösung benötigt. Es wurde wie folgt gerechnet: vorhandene Zellkonzentration mal die Menge der vorhandenen Zellsuspension durch die gewollte Zellkonzentration. Das ergibt die Gesamtsuspensionsmenge mit der gewünschten Zellzahl. Angenommen die Zellzählung ergab $5,2 \times 10^5$ vitale Zellen, so rechnete man $5,2 \times 10^5 \times 2 \text{ ml} / 10^5 = 10,4 \text{ ml}$. Von den 10,4 ml wurden 2 ml abgezogen. Die 2 ml vorhandene Zellsuspension wurden mit 8,4 ml Medium verdünnt, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Von der verdünnten Zelllösung wurden jeweils 0,5 ml in eine Kammer pipettiert. Die restliche Lösung wurde zurück in die Zellkulturflasche überführt und gegebenenfalls mit frischem Medium aufgefüllt. Anschließend wurden die U-87 MG-Zellen für zwei bis drei Tage in den *Chamber Slides* inkubiert, bevor sie für Experimente genutzt wurden.

2.3 FÄRBUNGEN

2.3.1 Inkubation mit 5-ALA und Hoechst

Die Tumorstücke wurden bis zum Abschluss der Experimente maximal 2 Wochen kultiviert. Färbungen, die nach diesem Zeitraum durchgeführt wurden, wurden nicht in die Auswertungen miteinbezogen.

Für die Substratanreicherung mit 5-ALA wurden 3 mg gliolan® eingewogen und in 3 ml DMEM/F-12 ohne Phenolrot gelöst. Es wurden Lösungen mit Konzentrationen von 1 mM und 2 mM hergestellt.

Von den *Chamber Slides* mit U-87 MG-Zellen wurde das Medium abgesaugt und zweimal mit DMEM/F-12 ohne Phenolrot gewaschen. Von den 24-Well-Platten mit den Tumorstücken wurde das Medium ebenso abgesaugt. Danach wurden 0,5 ml der 5-ALA-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen oder DMEM/F-12 ohne Phenolrot als Negativkontrolle in die Wells pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden. Zur Beurteilung der Zellviabilität wurden Tumorstücke und Zelllinie für 15 Minuten mit Hoechst 33342 gelöst in DMEM/F-12 ohne Phenolrot (Konzentration 1 µg/ml) inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Lösungen abgesaugt und die Zellen für 5 Minuten mit DMEM/F-12 ohne Phenolrot gewaschen. Danach wurde wieder abgesaugt und frisches Medium (ohne Phenolrot) zugegeben. Für einige Versuche wurden die Lösungen mit 5-ALA und Hoechst 33342 nicht nach 2 Stunden abgesaugt, sondern für 24 Stunden belassen. Jedes Experiment wurde zwei- oder dreimal ausgeführt.

2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzspektrum von PpIX

Wie bereits im *Absatz 1.2.4* erwähnt, kommt es durch die Anregung mit blauem Licht der Wellenlänge 375 bis 440 nm zu einer Emission von rotem Licht, dessen Peaks bei 635 und 704 nm liegen.

Fluoreszenzspektrum von Hoechst 33342

Die Exzitation erfolgt mit einem ultravioletten Licht, das sich in einem Bereich um 350 nm befindet. Das Emissionslicht ist blau und hat sein Maximum bei 461 nm.

Fluoreszenzdetektion mit dem CLSM

Die Tumorstücke und die Zelllinie wurden jeweils nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit und nach 24 Stunden im CLSM betrachtet. Bei einigen Experimenten wurden engere Zeiträume zur Fluoreszenzdetektion gewählt (zusätzlich nach 6, 9 und 12 Stunden). Angeregt wurden die Zellen mit Laserlicht der Wellenlänge 405 nm und einer Laserpower von 0,2 %. Ein Primärstrahlteiler (UV/488/543/633) wurde verwendet, um das passende Exzitationslicht zum Präparat zu lenken. Die verschiedenen Emissionslichter von 5-ALA und Hoechst wurden durch einen Sekundärstrahlteiler (490) getrennt und durch den Einsatz von zwei Emissionsfiltern (BP 420-480 für Hoechst und LP 560 für PpIX) wurden die ungewollten Wellenlängen blockiert. Es wurden Bilder mit drei Kanälen aufgenommen: rot für PpIX, blau für Hoechst und ein Durchlichtkanal. Sowohl zusammengeführte und als auch getrennte Bilder der unterschiedlichen Kanäle wurden gespeichert.

Beurteilung der *in vitro* Fluoreszenz

Die Beurteilung erfolgte anhand der mit dem CLSM aufgenommenen Bildern. Die Einteilung der detektierten Fluoreszenz erfolgte in 4 Kategorien: negative (keine sichtbare) Fluoreszenz, schwache, mittelgradige oder starke Fluoreszenz. Die stärkste aufgenommene Fluoreszenzintensität einer Tumorprobe war entscheidend für die Zuteilung in die einzelnen Kategorien.

2.4 ABCG2- UND FERROCHELATASE-EXPRESSION

Western Blot und PCR wurden angewendet, um zu eruieren, ob die Expression bestimmter Transporter und Enzyme, die an der PpIX-Synthese beteiligt sind, im Zusammenhang mit der Tumorfluoreszenz stehen. Wir untersuchten den Transporter ABCG2 (Molekulargewicht: 72 kDa) und das Enzym Ferrochelatase (Molekulargewicht: 42 kDa).

Als Positivkontrollen wurden die Zelllinien U-87 MG und U-251 verwendet. Menschliche Frontallappen, die post mortem entnommen wurden, dienten als Negativkontrollen. Von dem gewonnenen Operationsmaterial wurden 9 LGGs und 10 HGGs untersucht.

2.4.1 Semi-Dry Western Blot

Die Proteine wurden durch die SDS-PAGE (Abk. engl. für *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) auf einem 12,5%igem Polyacrylamid-Gel anhand ihrer molekularen Masse aufgetrennt und anschließend auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen.

Proteinisolierung

Die eingefrorenen Tumorproben wurden in einem Dewar mit flüssigem Stickstoff ins Labor gebracht. Zuerst wurden die Gefäße für die Proben vorbereitet: Aus den MagNA Lyser Green Beads (Gefäße mit Keramikkügelchen) wurden jeweils die Hälfte der Keramikkügelchen entfernt und eine Beschriftung aufgebracht. Dann wurden 300 µl NP-40-Lysepuffer (siehe *Tabelle 5*, *Tabelle 6*, und *Tabelle 7*) in jedes MagNa Lyser Gefäß pipettiert und anschließend das Probengewebe hinzugefügt. In die Eppendorf-Reaktionsgefäße mit den Pellets der Zelllinien U-87 MG und U-251 wurde der NP-40-Lysepuffer direkt pipettiert. Die Gefäße wurden rasch in die vorbereitete Box mit Eis gestellt. Die Proben wurden im MagNa Lyser bei 6.500 rpm für 40 Sekunden homogenisiert. Als Nächstes wurden die Proben für 20 Sekunden auf Eis gekühlt und der vorherige Schritt noch einmal wiederholt. Dann wurde das Lysat bei 10.000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in die vorbereiteten Eppendorf-Gefäße pipettiert. Die Proteinkonzentration wurde mit der Bradford-Methode bestimmt. Dazu wurden die Lysate mit einem Farbstoff (Coomassie Brilliant Blue) versetzt. Durch die Komplexbildung des Farbstoffes mit den Proteinen änderte sich das Absorptionsspektrum, was zur photometrischen Messung der Proteinkonzentration genutzt wurde. Zur Kalibrierung wurde eine Konzentrationsreihe mit dem Standardprotein BSA (Abk. engl. für *bovine serum albumin*) durchgeführt. Die Proben wurden mit dem NP-40-Lysepuffer und Laemmli Probenpuffer auf eine Konzentration von 3 µg/µl verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

NP-40-Puffer		
Reagenz	Menge	Konzentration
1 M Tris-HCl (pH 7,5) [Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid]	25 ml	50 mM
5 M NaCl	15 ml	150 mM
NP-40 (Markenname, nichtionisches Tensid)	2,5 ml	0,5 %
AD (Aqua destillata)	457,5 ml	

Tabelle 5: Zusammensetzung des NP-40-Puffers

Inhibitor-Cocktail (für Proteasen und Phosphatasen)	
Reagenz	Menge
AD	1 ml
PhosSTOP	1 Tablette
Complete	1 Tablette

Tabelle 6: Zusammensetzung des Inhibitor-Cocktails

NP-40-Lysepuffer		
Reagenz	Menge	Konzentration
NP-40-Puffer	9 ml	
Inhibitor-Cocktail	1 ml	
0,1 M Pefabloc® SC	100 µl	1 mM
1 M DTT (Dithiothreitol)	10 µl	1 mM

Tabelle 7: Zusammensetzung des NP-40-Lysepuffers

Polyacrylamid-Gel herstellen und gießen

Das Trenngel wurde wie in *Tabelle 8* aufgelistet hergestellt und in einen Gelgießstand bis zu einer Höhe von etwa 5 cm gegossen. Um eine gerade Oberfläche des Trenngels zu bekommen, wurde dieses sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels (etwa 1 Stunde) wurde das Isopropanol verworfen und der Gelgießstand dreimal mit AD gespült.

Trenngel	Menge für ein 12,5%iges Gel
AD	3,28 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
30 % Acrylamid	4,06 ml
10 % SDS (Natriumdodecylsulfat)	100 µl
APS (Ammoniumpersulfat)	100 µl
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	7,5 µl

Tabelle 8: Bestandteile des Trenngels

Als Nächstes wurde das Sammelgel wie in *Tabelle 9* beschrieben zusammengestellt und 25 µl Bromphenolblau zur besseren Sichtbarkeit der Geltaschen zugefügt. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel pipettiert und ein 15er-Kamm wurde sofort in das noch nicht ausgehärtete Gel gedrückt, wodurch Taschen im Gel entstanden, in die später die Proteine geladen wurden. Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert war, wurde der Gelgießstand abgebaut. Die fertigen Gele wurden in nassen Papiertüchern und Plastikfolie für 1 Tag im Kühlschrank gelagert.

Sammelgel	Menge für ein Gel
AD	3,1 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
30 % Acrylamid	0,5 ml
10 % SDS	50 µl
APS	25 µl
TEMED	7,5 µl

Tabelle 9: Bestandteile des Sammelgels

Gelelektrophorese

Es wurden 2 ausgehärtete Polyacrylamidgele in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer und die Wanne wurden mit 1x SDS-Laufpuffer (50 ml Rotiphorese® 10x SDS-PAGE + 450 ml AD) befüllt. Danach wurden die Kämme aus den Gelen gezogen und die 15 entstandenen Taschen ebenfalls mit SDS-Laufpuffer gespült.

Die vorbereiteten Proteinproben wurden für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt und kurz zentrifugiert. In die Taschen der beiden Gele wurden jeweils 30 µg Protein der 22 Proben beziehungsweise zweimal Standard geladen. Als Standard wurde Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standard verwendet. Danach wurde die Elektrophoresekammer zusammengebaut und zunächst eine Spannung von 80 V eingestellt. Nach 40 Minuten war eine gerade Front im Sammelgel entstanden und die Spannung wurde auf 120 V erhöht. Nach weiteren 90 Minuten wurde das System abgeschaltet und der Puffer aus der Kammer entleert.

Blotten (Proteintransfer)

Die Aktivierung der PVDF-Membranen erfolgte durch Einlegen in Methanol für 20 Sekunden. Danach wurden sie mit destilliertem Wasser gewaschen und in Towbin-Puffer (siehe *Tabelle 10*), ebenso wie die Filterpapiere, equilibriert. Als Nächstes wurde die Semi-Dry Blottingkammer vorbereitet: Es wurden pro Gel eine Membran auf ein Filterpapier gelegt und etwas Towbin-Puffer auf die PVDF-Membranen pipettieren. Die Gele wurden aus der Elektrophoresekammer genommen und das Sammelgel entfernt. Das übrige Gel (Trenngel) wurde mit etwas Towbin-Puffer auf die jeweilige Membran gelegt, dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und Gel befinden. Auf die Gele wurde jeweils ein weiteres Filterpapier gelegt und mit einer Rolle die überschüssige Flüssigkeit ausgestrichen. Die Blottingkammer wurde geschlossen und auf eine Stromstärke von 160 mA für 90 Minuten eingestellt (80 mA/Gel).

Towbin-Puffer (Transferpuffer)	
Reagenz	Menge
10x Tris/Glycine Buffer	50 ml
Methanol (20 %)	100 ml
AD	350 ml

Tabelle 10: Zusammensetzung des Towbin-Puffers

Überprüfung des Proteintransfers

Nachdem der Proteintransfer abgeschlossen war, wurde die Blottingkammer auseinandergelassen. Die Proteingrößen vom Standard wurden mit Kugelschreiber markiert. Danach wurden die PVDF-Membranen in Schalen mit Ponceau S gefärbt und anschließend mit AD gespült sowie dreimal mit Tris Buffered Saline (TBS)-Tween (siehe *Tabelle 11* und *Tabelle 12*) gewaschen bis keine Rotfärbung mehr zu sehen war. Zuletzt wurden die Membranen zum Blocken der freien Proteinbindungsstellen für 1 Stunde in 5%ige Milchlösung (in TBS-Tween gelöstes entfettetes Trockenmilchpulver) gelegt und bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt. Danach wurden die PVDF-Membranen dreimal 5 Minuten mit TBS-Tween gewaschen.

10x TBS-Stock	
Reagenz	Menge
TRIS	48,4 g
NaCl	160 g
Mit 37%iger HCl und	
AD auf pH von 7,6 einstellen	Ca. 2 l

Tabelle 11: TBS-Stock

TBS-Tween (Waschpuffer)	
Reagenz	Menge
10x TBS	100 ml
Tween 20	1 ml
AD	900 ml

Tabelle 12: Zusammensetzung des TBS-Tween

Antikörperdetektion

Anschließend wurden die Membranen mit StartingBlock™ Blocking-Puffer für 60 Minuten inkubiert. Danach wurden die PVDF-Membranen mit den primären Antikörpern [$\text{rb}\alpha\text{ABCG2}$ 1:10.000, $\text{ms}\alpha\text{FECH}$ 1:200 und $\text{rb}\alpha\text{GAPDH}$ 1:2000] in StartingBlock™ inkubiert und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Membranen zweimal 15 Minuten mit TBS-Tween und dreimal 5 Minuten mit TBS gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der mit HRP (Abk. engl. für *horseradish peroxidase*) konjugiert war. Die Detektion des HRP-gebundenen Antikörpers wurde mit Super Signal West Pico Chemolumineszenz-Substrat durchgeführt und mittels ChemiDoc™ Touch registriert. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) diente als Ladekontrolle. Analysiert wurden die Proteinbanden mit der Image Lab 5.2 Software.

2.4.2 PCR

RNA Isolierung

Die Isolierung der RNA aus dem Tumorgewebe erfolgte mit dem Maxwell® 16 LEV simplyRNA Tissue Kit nach den Anweisungen des Herstellers. Die Kassetten für die Proben wurden in der vorgesehenen Halterung positioniert und die benötigten Lösungen wurden wie beschrieben hergestellt. Das gefrorene Gliomgewebe wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 200 µl der „Homogenization Solution“ auf dem Vortexmischer homogenisiert bis alle Stücke aufgelöst waren. Dann wurde in jedes Gefäß 200 µl „Lysis Buffer“ hinzugefügt und erneut auf dem Vortexmischer gemixt. Die jeweils 400 µl lysiertes Gewebe wurden in die vorbereiteten Kassetten überführt. Die verbliebenen Schritte der Herstelleranleitung wurden ausgeführt, die Kassetten in das Gerät Maxwell® 16 gestellt und das geeignete Programm gestartet. Nach Ablauf des Programms war die RNA in je 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Konzentration der RNA messen

Die Konzentrationen der isolierten RNA wurden in ng/µl mit dem Nano Drop 2000 Spectrophotometer durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt.

Qualität der RNA bestimmen

Die Qualität der isolierten RNA wurde durch Gelelektrophorese ermittelt. Es wurden je 300 µg RNA mit RNase-freiem Wasser und 2 µl des RNA-Ladepuffers (siehe *Tabelle 13*) gemischt und für 5 Minuten bei 65 °C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt. Danach wurde die RNA auf das equilibrierte 1,2%ige Formaldehyd-Agarose-Gel (siehe *Tabelle 14*) geladen und die Elektrophorese bei 100 V für 30 Minuten ausgeführt.

Reagenz	Menge
10x Formaldehyd-Agarose-Gel-Puffer	
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	200 mM
Natriumacetat	50 mM
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	10 mM
Mit Natriumhydroxid (NaOH) auf pH von 7,0 einstellen	
1x Formaldehyd-Agarose-Gel-Laufpuffer	
10x Formaldehyd-Agarose-Gel-Puffer	100 ml
37 % (12,3 M) Formaldehyd	20 ml
RNase-freies Wasser	880 ml
5x RNA-Ladepuffer	
Bromphenolblau Indikatorlösung	16 µl
500 mM EDTA (pH 8,0)	80 µl
37 % (12,3 M) Formaldehyd	720 µl
100 % Glycerin	2000 µl
Formamid	3084 µl
10x Formaldehyd-Agarose-Gel-Puffer	4000 µl

Tabelle 13: Zusammensetzung der Puffer für die RNA-Gelelektrophorese

1,2%iges Formaldehyd-Agarose Gel (100 ml)	
Reagenz	Menge
Agarose	1,2 g
10x Formaldehyd-Agarose-Gel-Puffer	10 ml
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes Wasser	90 ml
37 % (12,3 M) Formaldehyd	1,8 ml
10 mg/ml GelRed	1 µl

Tabelle 14: Zusammensetzung des Formaldehyd-Agarose-Gels

cDNA-Synthese

cDNA (Abk. engl. *complementary DNA*) wurde mittels LunaScript™ SuperMix Kit (NEB) synthetisiert. Dafür wurden je Gefäß 300 ng mRNA (Abk. engl. *messenger RNA*) mit 4 µl 5x LunaScript Reaktionspuffer vermischt und mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben wie folgt durchgeführt: Primerhybridisierung (primer annealing) bei 25 °C für 2 Minuten, cDNA-Synthese bei 55 °C für 10 Minuten und Hitze Inaktivierung 95°C 1 min.

Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Für die qRT-PCR (Abk. engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*) wurde die cDNA 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Pro Reaktion wurden dann 5 µl cDNA, 0,5 µl reverse Primer, 0,5 µl forward Primer (Primer Konzentration 100 nM) und 4 µl SyberGreen gemischt. Die qRT-PCR fand in einem LightCycler480 in 3 Schritten (siehe *Tabelle 15*), die sich über 45 Zyklen wiederholten, statt. Negativkontrollen (RT- und Wasser) wurden in jedem Experiment mitgeführt. Die Schmelzkurvenanalyse wurde nach dem LC480-Protokoll durchgeführt.

Ablauf der qRT-PCR		
Schritt	Temperatur	Zeit
Vorinkubation	95 °C	5 min.
1. Denaturierung	95 °C	30 sek.
2. Annealing	60 °C	30 sek.
3. Elongation	72 °C	30 sek.
Abkühlen	5 °C	

Tabelle 15: Ablauf der qRT-PCR

Quantifizierung der RNA

Die qRT-PCR wurde für jede cDNA als Triplet durchgeföhrt. Die relative RNA-Expression wurde mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode quantifiziert. Als Referenz- bzw. Haushaltsgene für den Mengenvergleich wurden S14, S15 und U6 verwendet, gegen die die Ziel-Gene normiert wurden ($\Delta C_T = C_{T,Target} - C_{T,Housekeeping}$). Die relative Änderung (*fold change*) der Expression im Vergleich zu gesundem Hirngewebe wurde durch die Berechnung des $\log_2(2^{-\Delta\Delta C_T})$ ermittelt.

Primer

Die verwendeten Primer (siehe *Tabelle 16*) wurden bei Eurogentec bestellt und synthetisiert.

Marker	Basensequenz
ABCG2	fw: TGACCTGAAGGCATTTACTG rev: GGTAGAAAGCCACTCTTCAG
Ferrochelatase	fw: TCACCACAGAAACAGCCCAG rev: TCGGCTTCCTGATGTTAGACTC
S14 (40S ribosomale Proteinuntereinheit)	fw: GGTCATCAGCCTCGGACCTCA rev: CAGCTCCTTGACCTCTGGGC
S18 (40S ribosomales Protein)	fw: GATATGCTCATGTGGTGTG rev: AATCTTCTTCAGTCGCTCCA;
U6 (small nuclear Riboprotein)	fw: CTCGCTTCGGCAGCACA rev: AACGCTTCACGAATTTGCGT

Tabelle 16: Primer für qRT-PCR

2.5 DATENAUSWERTUNG UND STATISTIK

Die gesammelten Daten wurden mit Microsoft Excel 2016 und IBM SPSS analysiert. Zur grafischen Darstellung wurden überwiegend Balken- und Säulendiagramme verwendet. Die Daten der qRT-PCR wurden additiv mit Boxplots visualisiert, da diese einen raschen Überblick über Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum und somit über die Verteilung der Daten ermöglichen. Zudem können durch diese grafische Veranschaulichung Ausreißer identifiziert werden. Der Interquartilabstand (Länge der Box) stellt die mittleren 50 % der Daten dar. Die Länge der Antennen errechnet sich aus dem Interquartilabstand multipliziert mit 1,5. Liegen die kleinste und größte Zahl unterhalb des errechneten Wertes, wird die Antenne nur bis zu diesem Punkt gezeichnet. Werte, die sich außerhalb der Antenne befinden, werden Ausreißer genannt. Milde Ausreißer werden mit einem Punkt und extreme Ausreißer mit einem Stern markiert.

Die statistische Auswertung und Interpretation der qRT-PCR Daten erfolgte gemeinsam mit dem Team des ZMF (Zentrum für Medizinische Forschung) Graz. Zur Analyse, ob zwischen den einzelnen Gruppen ein signifikanter Unterschied der mRNA-Expression besteht, wurde aufgrund der geringen Fallzahl und der Datenverteilung ein Kruskal-Wallis-Test angewendet. Dieser Test ist ein nicht parametrisches Verfahren für unabhängige Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde für diese Studie mit $p < 0,05$ festgelegt. Um der Alpha-Kumulierung bei der Subgruppentestung entgegenzuwirken wurde die Bonferroni-Korrektur gewählt. Das reduzierte Signifikanzniveau für die Einzeltests der Gruppen wurde mit $p < 0,012$ errechnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 STUDIENKOLLEKTIV

Insgesamt wurde Gliom-Gewebe von 19 Personen für die Studie untersucht. Die neuropathologische und molekulargenetische Diagnostik ergab 6 Oligodendrogliome WHO Grad II, 4 diffuse Astrozytome WHO Grad II, 4 anaplastische Astrozytome WHO Grad III und 5 Glioblastome WHO Grad IV. Bei den Teilnehmenden (n=19) handelte es sich um 36,8 % (n=7) Frauen und 63,2 % (n=12) Männer. Einen detaillierten Überblick über die Verteilung der Tumorentitäten, Alter und Geschlecht der Studienpopulation gibt *Tabelle 17*.

Tumorentität:	ODG	DA	AA	GBM
WHO Grad:	II	II	III	IV
Anzahl	6	4	4	5
Prozent	31,6 %	21,1 %	21,1 %	26,3 %
Alter (Jahre)				
Mittelwert	45,7	43,5	43,0	52,0
Median	44,0	47,0	40,0	55,0
Geschlecht				
Weiblich	2	3	2	0
Männlich	4	1	2	5

Tabelle 17: Studienkollektiv

ODG = Oligodendrogliom, DA = diffuses Astrozytom, AA = anaplastisches Astrozytom, GBM = Glioblastoma multiforme.

Die Oligodendrogliome und diffusen Astrozytome WHO Grad II wurden der Gruppe der niedriggradigen Gliome (n=10) zugeordnet. Die Gruppe der hochgradigen Gliome (n=9) bestand aus 4 anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III und 5 Glioblastomen WHO Grad IV.

Die Geschlechterverteilung war in der Gruppe der LGGs ausgeglichen, während bei den HGGs 7 Männer 2 Frauen gegenüberstanden (*Abbildung 5*).

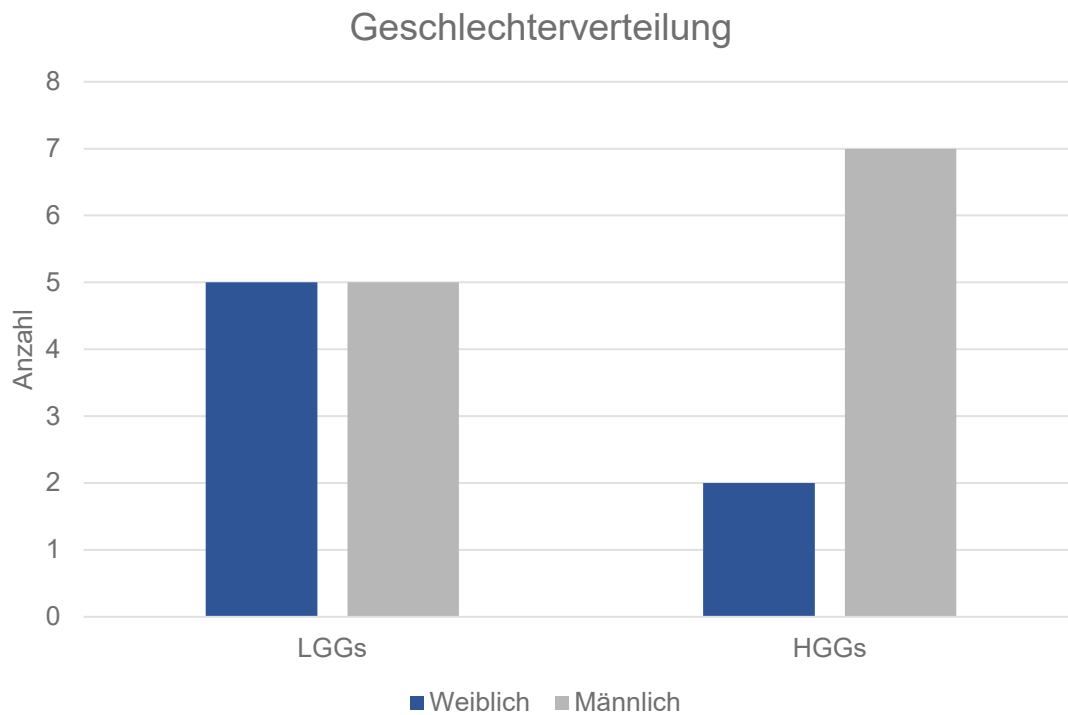


Abbildung 5: Geschlechterverteilung in den Gruppen der LGGs und HGGs
LGGs = low-grade gliomas, HGGs = high-grade gliomas

Das Alter der Personen mit LGGs lag zwischen 26 und 64 Jahren, der Durchschnitt war 44,8 Jahre. Der jüngste Patient mit einem HGG war 31 Jahre und der älteste 71 Jahre alt, das Durchschnittsalter war in dieser Gruppe 48 Jahre. Die Altersverteilung der beiden Studiengruppen ist in der nachfolgenden Grafik (Abbildung 6) abgebildet.

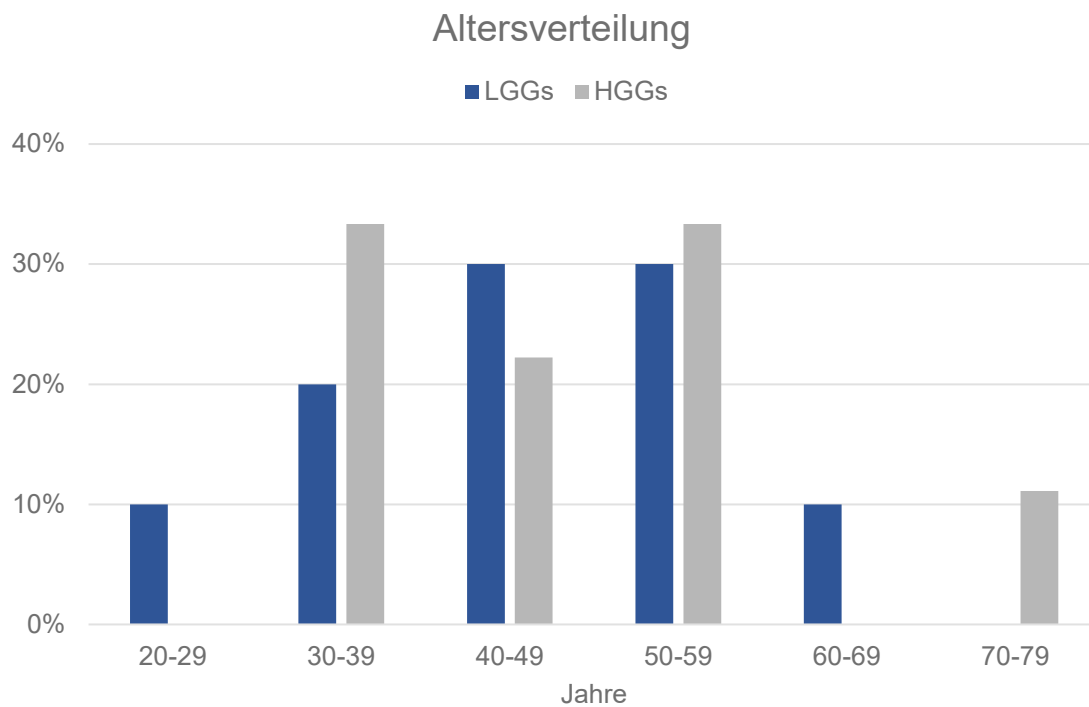


Abbildung 6: Altersverteilung in den Gruppen der LGGs und HGGs
LGGs = low-grade gliomas, HGGs = high-grade gliomas

3.2 MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Das für die Studie verwendete Tumorgewebe wurde vom Team der Neuropathologie untersucht. Es wurden folgende molekulare Marker analysiert: MGMT-Promotor-Methylierung, 1p/19q-Status und IDH1-Status. *Tabelle 18* zeigt geordnet nach WHO Grad die molekularen Veränderungen der unterschiedlichen Tumorguppen.

WHO Grad:	II	III	IV
Anzahl	10	4	5
MGMT-methyliert			
Ja	10	3	3
Nein	0	1	2
1p/19q-Status		n. d.	n. d.
Wildtyp	0		
Kodeletion	6		
IDH1-Status			
Wildtyp	0	0	4
Mutation	10	4	1

Tabelle 18: Molekulargenetische Untersuchungsergebnisse

1p/19q-Status wurde nur bei oligodendroglialer Differenzierung untersucht, n. d. = nicht durchgeführt.

3.3 INTRAOPERATIVE FLUORESCENZ

Bei 70 % (n=7) der Patientinnen und Patienten mit einem LGG zeigte der Tumor einen kontrastmittelaufnehmenden Anteil, weshalb sie präoperativ gliolan® erhielten. Von den HGGs waren 66,7 % (n=6) kontrastmittelaufnehmend, 5 dieser Personen bekamen präoperativ ebenfalls gliolan®. Ein weiterer Patient, bei dem aufgrund einer hochgradig eingeschränkten Nierenfunktion keine MRT mit Kontrastmittel möglich war, wurde vor der Operation auch mit gliolan® behandelt.

Von den LGGs waren 57,1 % (n=4) intraoperativ Fluoreszenz-positiv, darunter 3 Oligodendrogliome und 1 diffuses Astrozytom, während es bei den HGGs 100 % (n=6) waren. *Tabelle 19* stellt den Anteil der Tumoren mit Kontrastmittelaufnahme und intraoperativ positiver Fluoreszenz geordnet nach WHO Grad dar.

WHO Grad:	II	III	IV
Anzahl	10	4	5
Kontrastmittelaufnahme		*	
Ja, Anzahl (%)	7 (70)	1 (25)	5 (100)
Nein, Anzahl (%)	3 (30)	2 (50)	0 (0)
Intraoperative Fluoreszenz			
Positiv, Anzahl (%)	4 (57)	1 (100)	5 (100)
Negativ, Anzahl (%)	3 (43)	0 (0)	0 (0)

Tabelle 19: Kontrastmittelaufnahme und intraoperative Fluoreszenz bei Gliomen WHO Grade II-IV

* Die Kontrastmittelgabe war bei einem Patienten nicht möglich.

3.4 IN VITRO FLUORESZENZ DER ZELLINIE

Für die Etablierung der *in vitro* Experimente wurden U-87 MG-Zellen mit 1 bzw. 2 mM 5-ALA für 2 Stunden und zusätzlich mit Hoechst 33342 inkubiert. Die Fluoreszenz wurde 2 Stunden nach der Inkubation mit starker Intensität detektiert, nach 24 Stunden war jedoch keine Fluoreszenz mehr zu erkennen (siehe *Abbildung 7* und *Abbildung 8*).

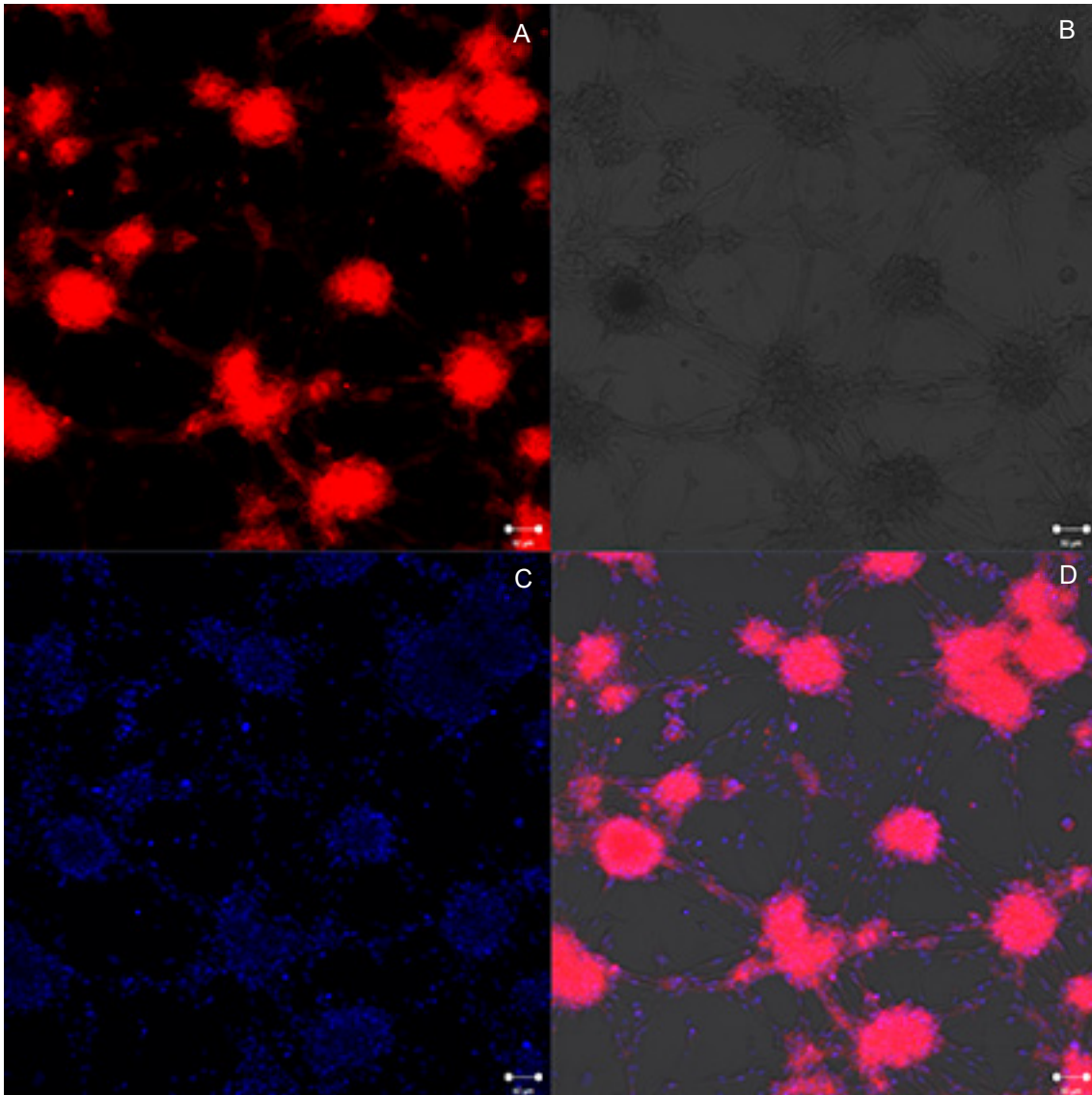


Abbildung 7: In vitro Fluoreszenz der U-87 MG-Zellen nach 2 Stunden

Nach 2 Stunden Inkubation mit 1 mM 5-ALA und Hoechst (1 µg/ml) wurde starke Fluoreszenz mit dem CLSM aufgenommen. A: Protoporphyrin IX Fluoreszenz, B: Durchlicht, C: Hoechst Fluoreszenz, D: Zusammengeführtes Bild aus A-C.

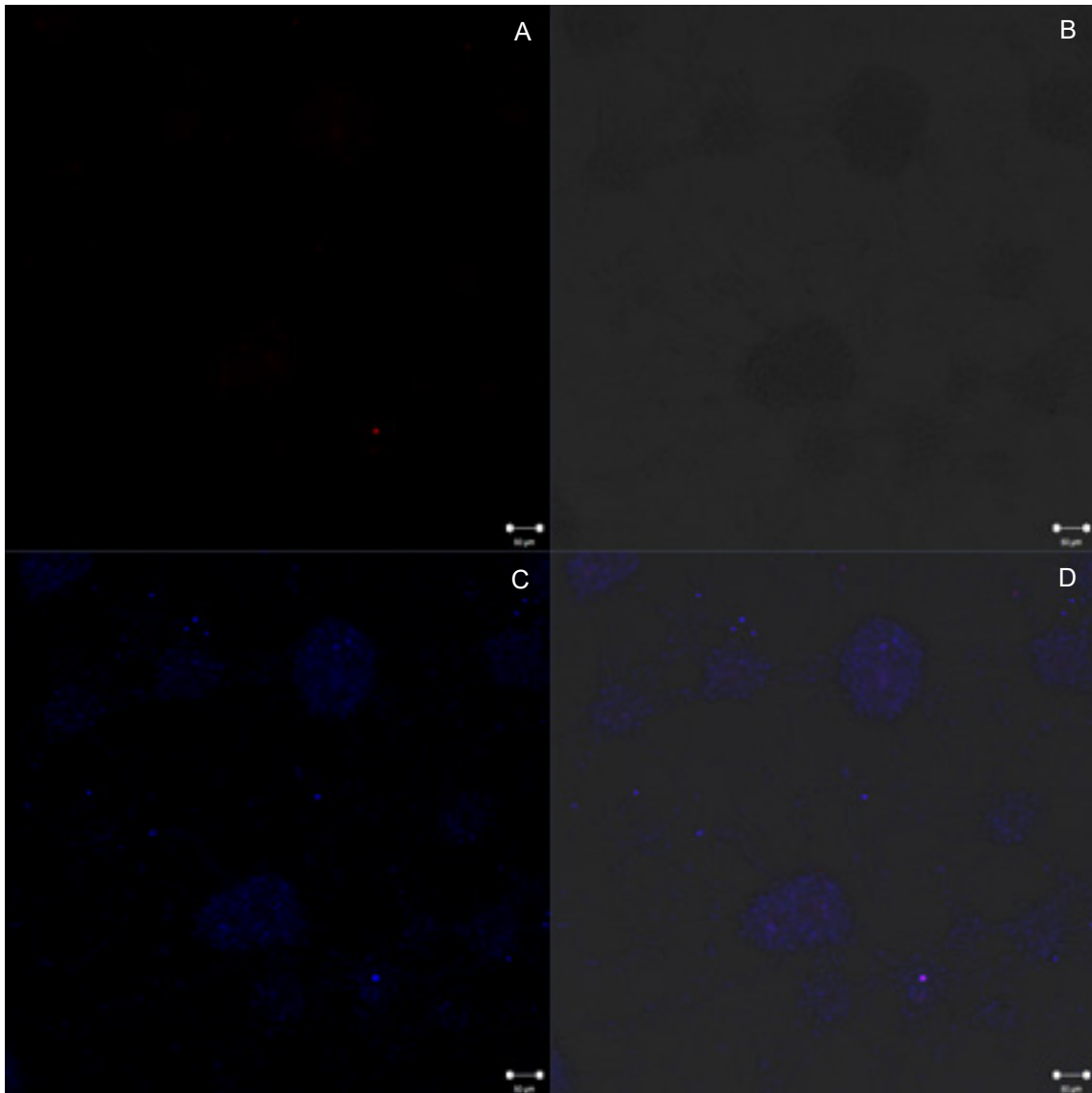


Abbildung 8: In vitro Fluoreszenz der U-87 MG-Zellen nach 24 Stunden

24 Stunden nach Exposition mit 1 mM 5-ALA und Hoechst (1 µg/ml) konnte keine Fluoreszenz mehr mit dem Konfokalmikroskop detektiert werden. A: Protoporphyrin IX Fluoreszenz, B: Durchlicht, C: Hoechst Fluoreszenz, D: Zusammengeführtes Bild aus A-C.

3.5 IN VITRO FLUORESZENZ DER TUMORPROBEN

Insgesamt wurden 17 Tumorproben *in vitro* 2 Stunden mit 5-ALA inkubiert, darunter 6 Oligodendrogliome WHO Grad II, 4 diffuse Astrozytome WHO Grad II, 4 anaplastische Astrozytome WHO Grad III und 3 Glioblastome WHO Grad IV. Die *in vitro* Fluoreszenz eines Glioblastoms ist in *Abbildung 9* zu sehen.

2 Proben, 1 diffuses und 1 anaplastisches Astrozytom, wurden nicht in die Auswertungen miteinbezogen, da das Tumorgewebe bis zur Färbung länger als 2 Wochen kultiviert worden war und die Ergebnisse dadurch verfälscht werden hätten können (mögliche zeitabhängige pheno-/genotypische Veränderungen).

3.5.1 Fluoreszenz 2 Stunden nach 5-ALA-Exposition

Von den Oligodendrogliomen zeigten 83 % (n=5) negative und 17 % (n=1) schwache Fluoreszenz 2 Stunden nach der Inkubation mit 5-ALA. Unter den diffusen Astrozytomen waren je 33 % negativ, mittel und stark fluoreszierend. Bei den hochgradigen Gliomen präsentierte sich die eine Hälfte (n=3) nach 2 Stunden mit starker Fluoreszenz, während die anderen 50 % (n=3) nicht fluoreszierten. Die Intensität der *in vitro* Fluoreszenz der einzelnen Tumorgruppen 2 Stunden nach Exposition mit 5-ALA ist in *Tabelle 20* zu sehen.

Tumorentität WHO Grad	ODG II	DA II	AA III	GBM IV
Anzahl	6	3	3	3
Fluoreszenz nach 2 h	Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)
negativ	5 (83)	1 (33)	2 (67)	1 (33)
schwach	1 (17)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
mittel	0 (0)	1 (33)	0 (0)	0 (0)
stark	0 (0)	1 (33)	1 (33)	2 (67)

Tabelle 20: In vitro Fluoreszenz 2 Stunden nach 5-ALA-Exposition

ODG = Oligodendrogliom, DA = diffuses Astrozytom, AA = anaplastisches Astrozytom, GBM = Glioblastoma multiforme.

3.5.2 Fluoreszenz 24 Stunden nach 5-ALA-Exposition

24 Stunden nach 5-ALA-Exposition war in 83 % (n=5) der Oligodendrogliome und in je 67 % der diffusen Astrozytome (n=2) und der hochgradigen Gliome (n=4) Fluoreszenz mittlerer Intensität detektierbar. Starke Fluoreszenz zeigte sich jeweils bei 1 Oligodendrogliom, 1 diffusen Astrozytom und 1 Glioblastom. Die nachstehende *Tabelle 21* listet die Fluoreszenzintensität der verschiedenen Tumorentitäten 24 Stunden nach der Inkubation mit 5-ALA auf.

Tumorentität	ODG	DA	AA	GBM
WHO Grad	II	II	III	IV
Anzahl	6	3	3	3
Fluoreszenz nach 24 h	Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)
negativ	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
schwach	0 (0)	0 (0)	1 (33)	0 (0)
mittel	5 (83)	2 (67)	2 (67)	2 (67)
stark	1 (17)	1 (33)	0 (0)	1 (33)

Tabelle 21: In vitro Fluoreszenz 24 Stunden nach 5-ALA-Exposition

ODG = Oligodendrogliom, DA = diffuses Astrozytom, AA = anaplastisches Astrozytom, GBM = Glioblastoma multiforme.

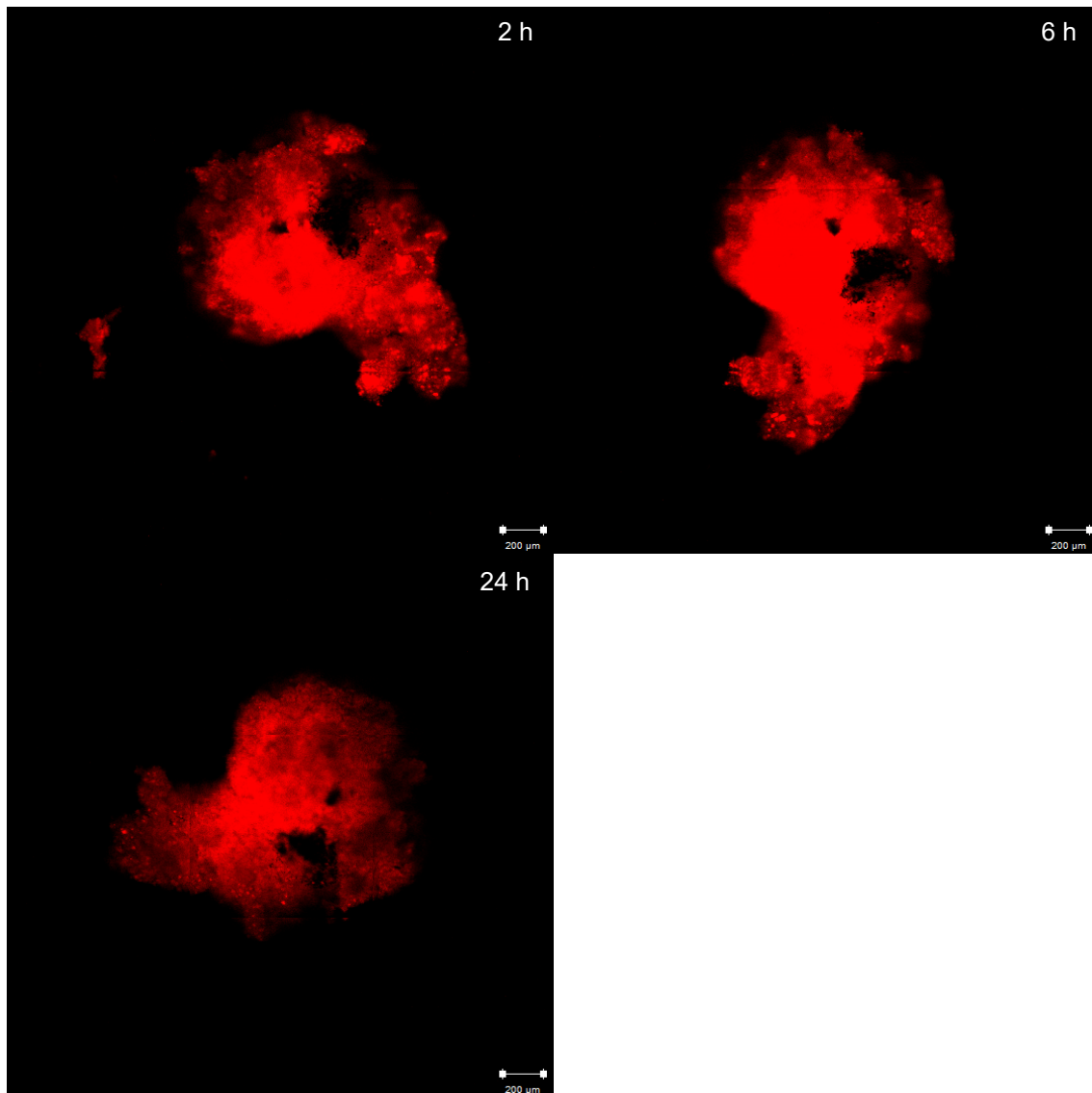


Abbildung 9: In vitro Fluoreszenz von GBM5

In vitro Fluoreszenz eines Glioblastoms (GBM5) WHO Grad VI 2, 6 und 24 Stunden nach zweistündiger Inkubation mit 2 mM 5-ALA. Deutlich zu erkennen ist ein schwarzes Areal im Tumorstück: Dabei handelte es sich um eine Ansammlung von Blut (mit Durchlichtmikroskopie verifiziert). Nach 2 und 6 Stunden erschien der Tumor stark fluoreszierend, während die Fluoreszenzintensität nach 24 Stunden abgenommen hatte. Das IDH-Wildtyp Glioblastom war im MRT kontrastmittelaufnehmend und auch intraoperativ deutlich Fluoreszenz-positiv.

3.6 KORRELATION ZWISCHEN KONTRASTMITTELAUFNAHME UND FLUORESZENZ BEI NIEDRIGGRADIGEN GLIOMEN

Die kontrastmittelaufnehmenden LGGs (n=7) wurden präoperativ mit gliolan® behandelt. Diese Tumorproben wurden *in vivo* für 2 Stunden mit 5-ALA inkubiert. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte nach Ablauf der Inkubationszeit (nach 2 Stunden) und nach 24 Stunden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

3.6.1 Intraoperativ Fluoreszenz-positive LGGs

Intraoperativ präsentierten sich 3 Oligodendrogliome und 1 diffuses Astrozytom Fluoreszenz-positiv. Von diesen LGGs (n=4) zeigten *in vitro* 50 % (n=2) negative/keine, 25 % (n=1) schwache und 25 % (n=1) mittelgradige Fluoreszenz 2 h nach 5-ALA-Exposition. 24 Stunden nach der Inkubation mit 5-ALA war bei der einen Hälfte der LGGs (n=2) *in vitro* mittelgradige und bei der anderen Hälfte (n=2) starke Fluoreszenz zu beobachten (siehe *Abbildung 10*). *Abbildung 11* und *Abbildung 12* zeigen *in vitro* Fluoreszenz bei zwei LGGs mit Kontrastmittelaufnahme und intraoperativ sichtbarer Fluoreszenz.

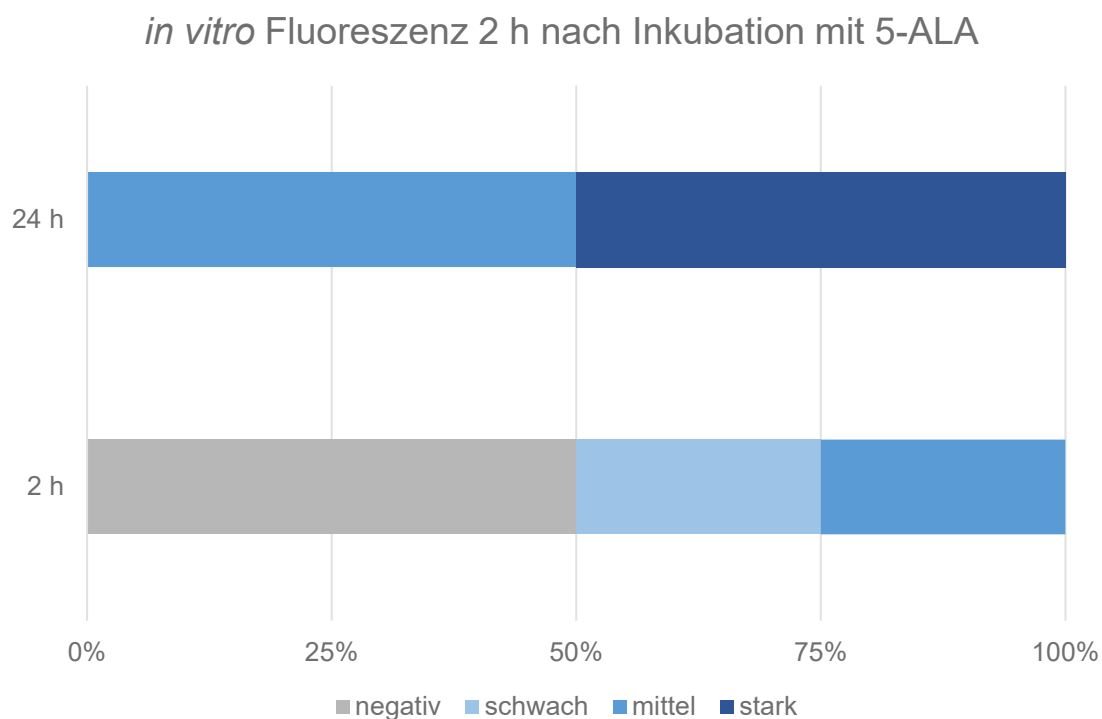


Abbildung 10: *In vitro* Fluoreszenz der intraoperativ Fluoreszenz-positiven LGGs

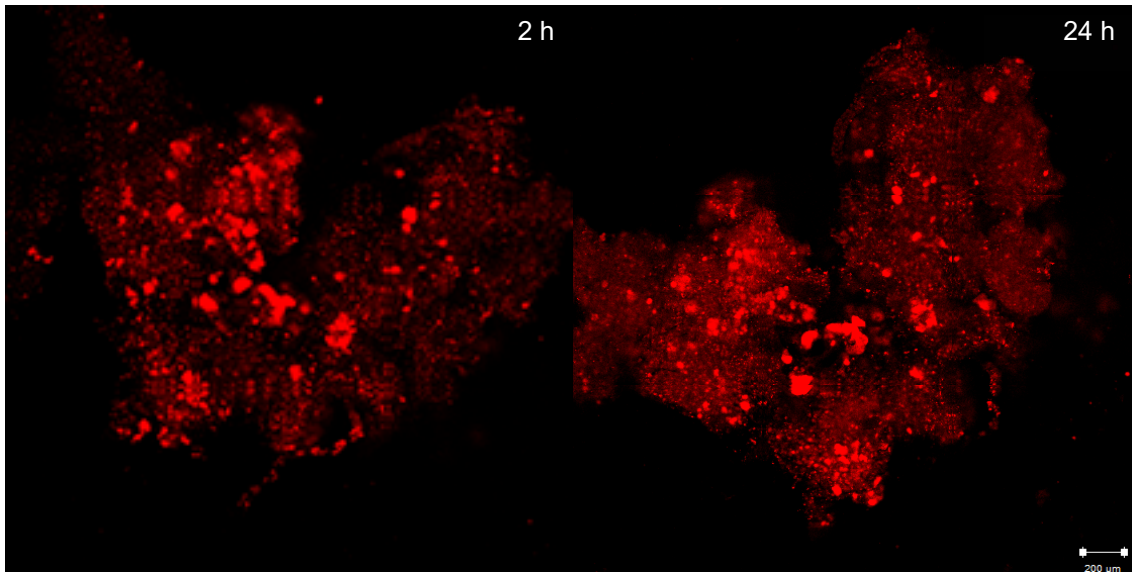


Abbildung 11: In vitro Fluoreszenz von ODG2

In vitro Fluoreszenz eines Oligodendroglioms (ODG2) WHO Grad II 2 und 24 Stunden nach zweistündiger Inkubation mit 2 mM 5-ALA. Gut erkennbar sind die stark fluoreszierenden, verkalkten Anteile des Tumors. Der Tumor zeigte eine flau Kontrastmittelaufnahme im MRT und war intraoperativ Fluoreszenz-positiv.

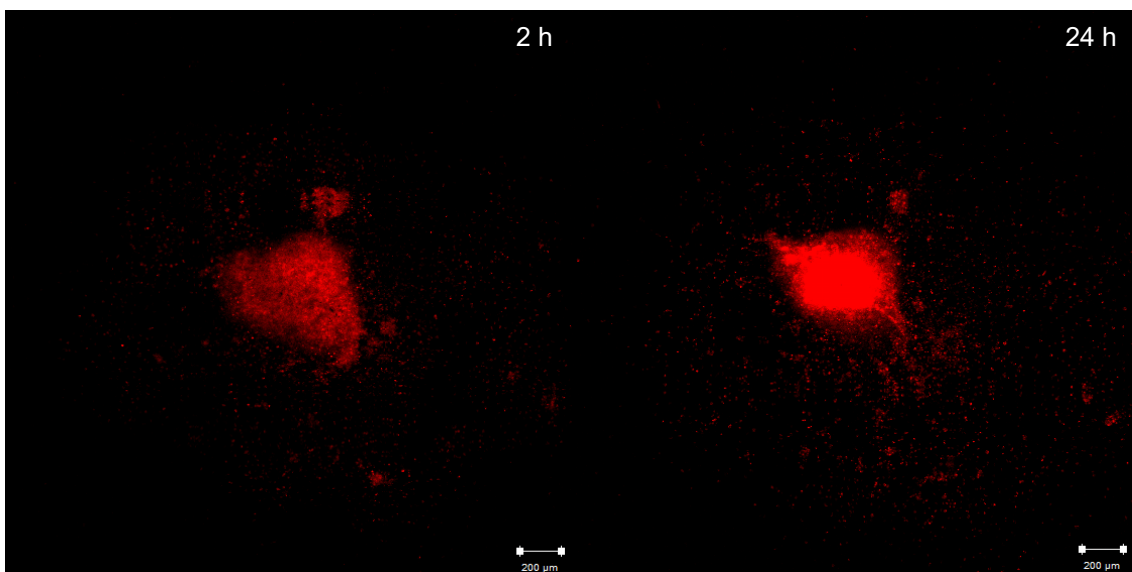


Abbildung 12: In vitro Fluoreszenz von DA4

In vitro Fluoreszenz eines diffusen Astrozytoms (DA4) WHO Grad II 2 und 24 Stunden nach zweistündiger Inkubation mit 2 mM 5-ALA. Die Fluoreszenz hatte nach 24 Stunden eine starke Intensität. Das niedriggradige Gliom war flau kontrastmittelaufnehmend im MRT und zeigte intraoperativ sichtbare Fluoreszenz.

3.6.2 Intraoperativ Fluoreszenz-negative LGGs

Intraoperativ war bei 3 niedriggradigen Gliomen mit Kontrastmittelaufnahme, darunter 2 Oligodendrogliome und 1 diffuses Astrozytom, keine Fluoreszenz sichtbar. 2 Stunden nach Exposition mit 5-ALA war bei zwei Drittel der LGGs *in vitro* keine und bei einem Drittel starke Fluoreszenz sichtbar. Nach 24 Stunden war in allen niedriggradigen Gliomen dieser Gruppe (n=3) mittelgradige Fluoreszenz detektierbar (siehe *Abbildung 13*). In *Abbildung 14* ist die *in vitro* Fluoreszenz eines Oligodendroglioms mit Kontrastmittelaufnahme, das während der Operation Fluoreszenz-negativ war, abgebildet.

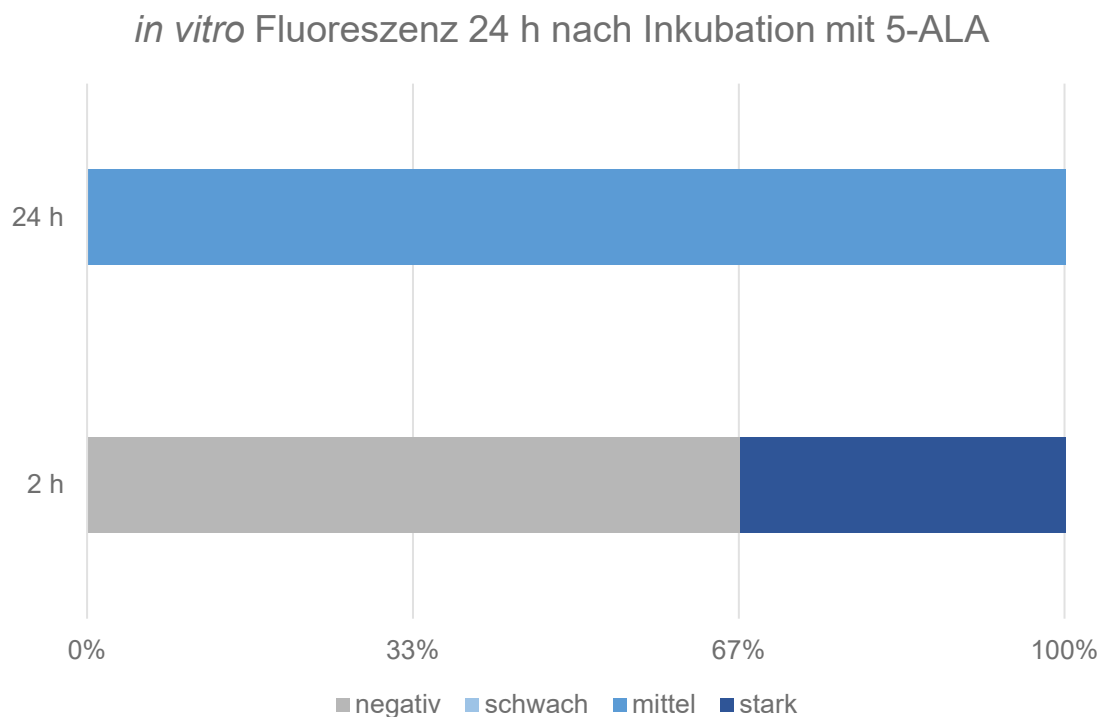


Abbildung 13: *In vitro* Fluoreszenz der intraoperativ Fluoreszenz-negativen LGGs

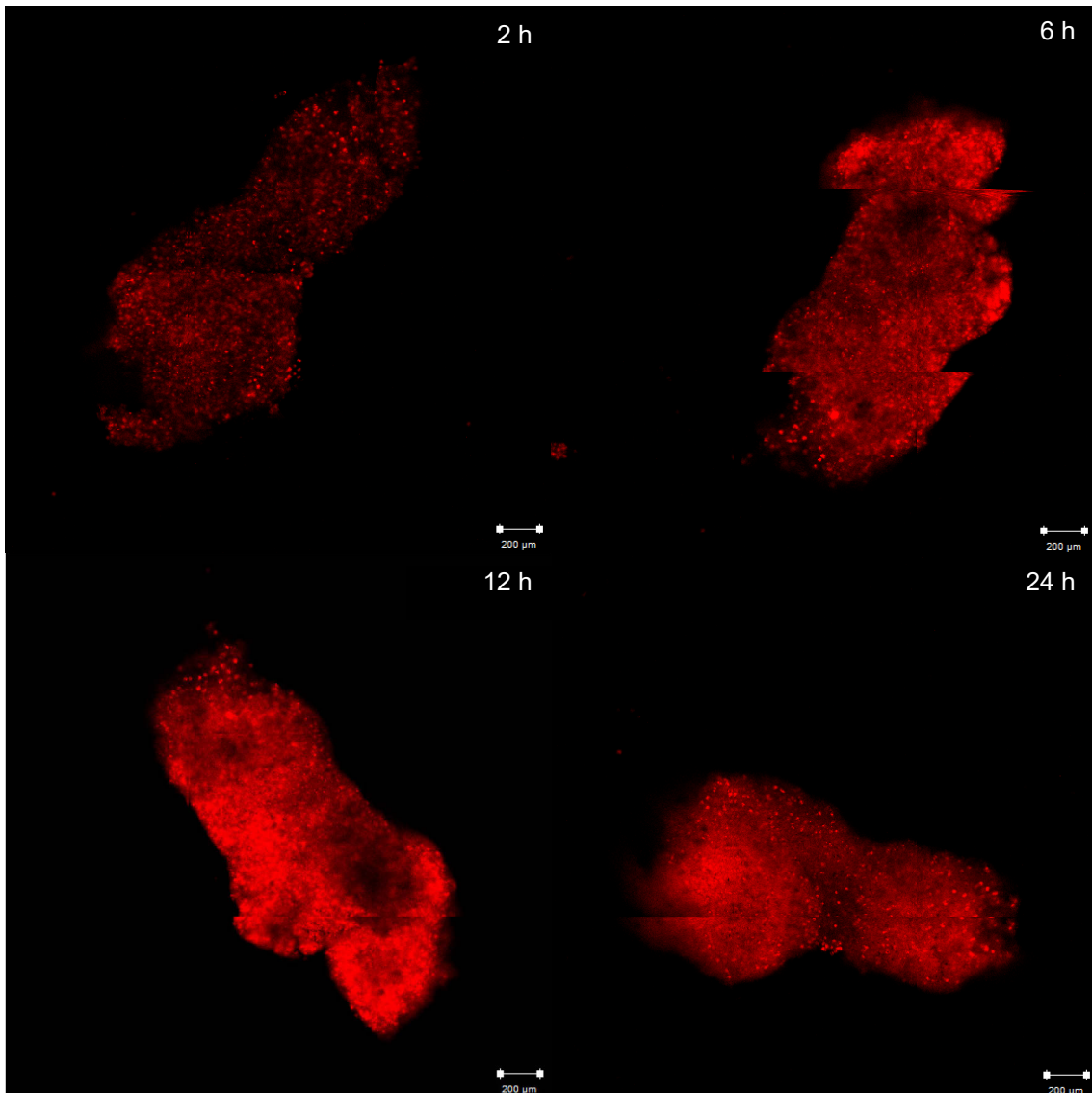


Abbildung 14: In vitro Fluoreszenz von ODG5

In vitro Fluoreszenz eines Oligodendroglioms (ODG5) WHO Grad II 2, 6, 12 und 24 Stunden nach zweistündiger Inkubation mit 2 mM 5-ALA. Die Fluoreszenz erreichte nach 12 Stunden ein Maximum und zeigte nach 24 Stunden einen Abfall. Das niedriggradige Gliom präsentierte sich im MRT mit minimaler Kontrastmittelaufnahme, intraoperativ war keine Fluoreszenz sichtbar.

3.6.3 Nicht kontrastmittelaufnehmende Tumoren und *in vitro* Fluoreszenz

Von den 5 Tumoren ohne Kontrastmittelaufnahme wurden 3, darunter 1 Oligodendrogliom, 1 diffuses Astrozytom und 1 anaplastisches Astrozytom, *in vitro* mit 5-ALA inkubiert. Die niedriggradigen Gliome zeigten 2 Stunden nach der Inkubation keine Fluoreszenz, das anaplastische Astrozytom WHO Grad III fluoreszierte jedoch stark (siehe *Abbildung 17*). Nach 24 Stunden ließ sich bei den LGGs eine mittelgradige Fluoreszenz beobachten (siehe *Abbildung 15* und *Abbildung 16*), während die Fluoreszenzintensität des hochgradigen Astrozytoms bereits abgenommen hatte.

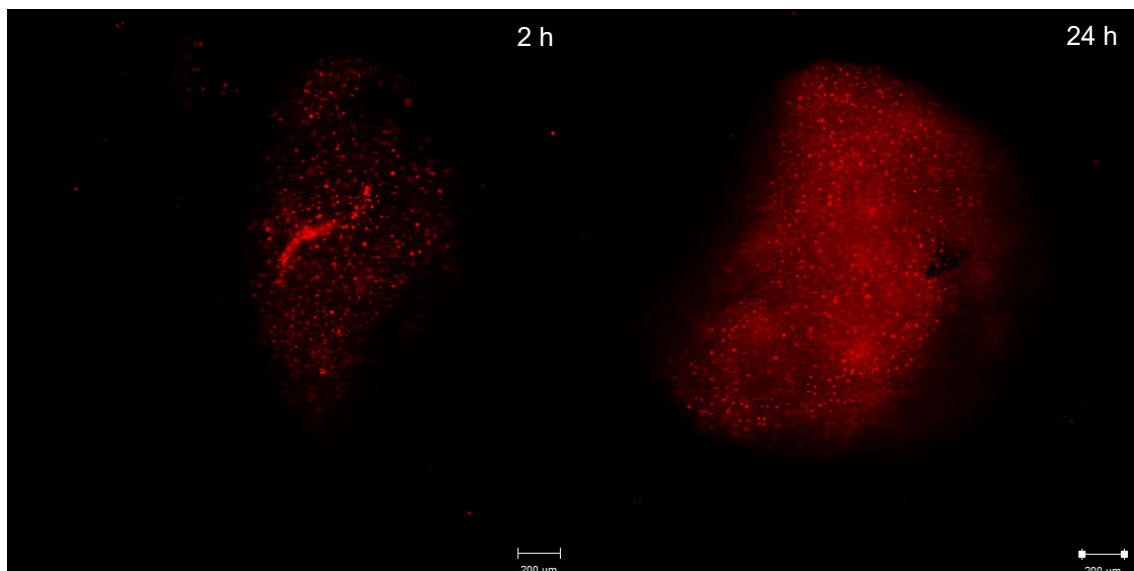


Abbildung 15: In vitro Fluoreszenz von ODG1

In vitro Fluoreszenz eines Oligodendroglioms (ODG1) WHO Grad II 2 und 24 Stunden nach zweistündiger Inkubation mit 2 mM 5-ALA. Die Fluoreszenz war nach 24 Stunden im Vergleich zu 2 Stunden deutlich angestiegen. Der Tumor wies keine Kontrastmittelaufnahme im MRT auf.

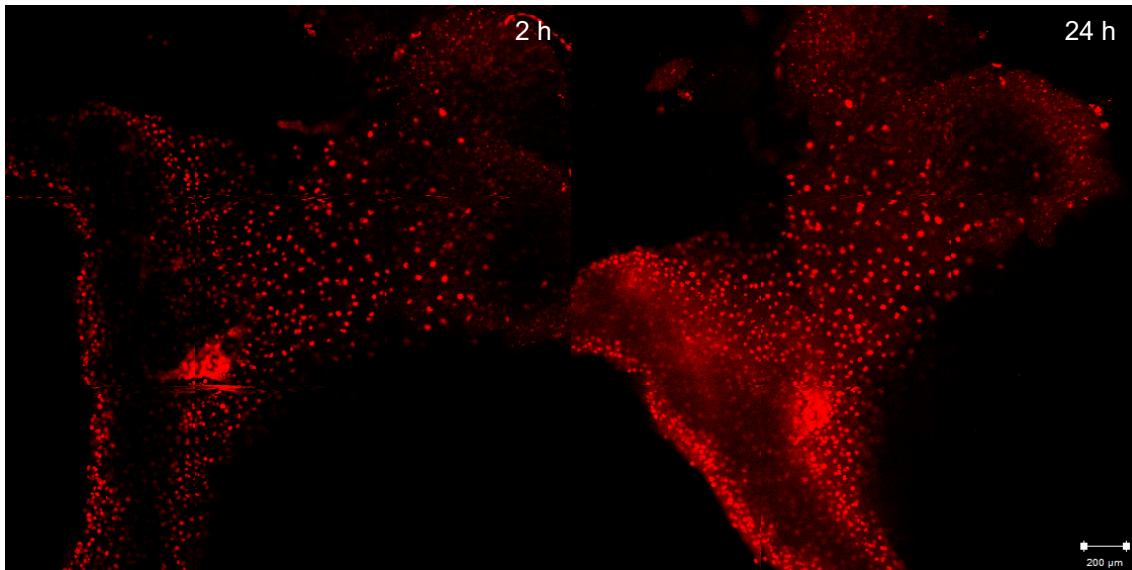


Abbildung 16: *In vitro* Fluoreszenz von DA2

In vitro Fluoreszenz eines diffusen Astrozytoms (DA2) WHO Grad II 2 und 24 Stunden nach zweistündiger Inkubation mit 2 mM 5-ALA. Das niedriggradige Gliom ohne Kontrastmittelaufnahme erschien im Mikroskop (CLSM) zuerst Fluoreszenz-negativ und nach 24 Stunden Fluoreszenz-positiv mit mittelgradiger Intensität.

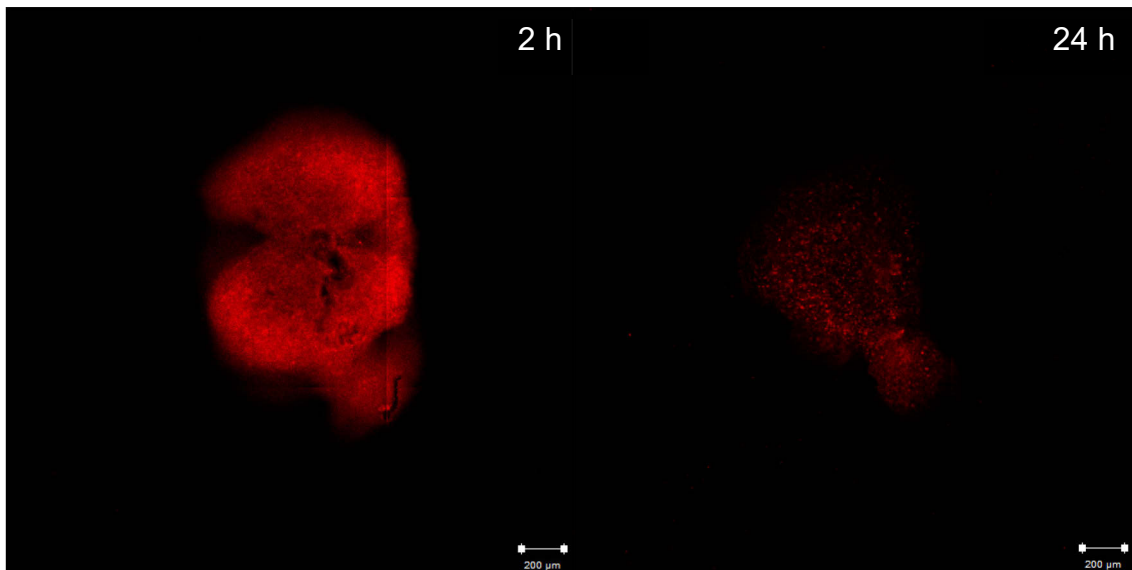


Abbildung 17: *In vitro* Fluoreszenz von AA3

In vitro Fluoreszenz eines anaplastische Astrozytoms WHO Grad III 2 und 24 Stunden nach zweistündiger Inkubation mit 2 mM 5-ALA. Der Tumor ohne Kontrastmittelaufnahme zeigte nach 2 Stunden starke und nach 24 Stunden schwache Fluoreszenz.

3.7 ABCG2- UND FECH-PROTEINEXPRESSIONSLEVEL

Western Blots wurden zum Nachweis der Proteinexpressionslevel des Transporters und des Enzyms gemacht. ABCG2 und FECH wurden bei den erwarteten Molekulargewichten von 72 bzw. 42 kDa detektiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH mit einem Molekulargewicht von 37 kDa verwendet. *Abbildung 18* zeigt die untersuchten Proteinbanden im frontalen Cortex, im Gliomgewebe und in den Zelllinien. Die Blots wurden pro Antikörper lediglich einmal durchgeführt, folglich waren die Ergebnisse nicht repräsentativ für eine Auswertung.

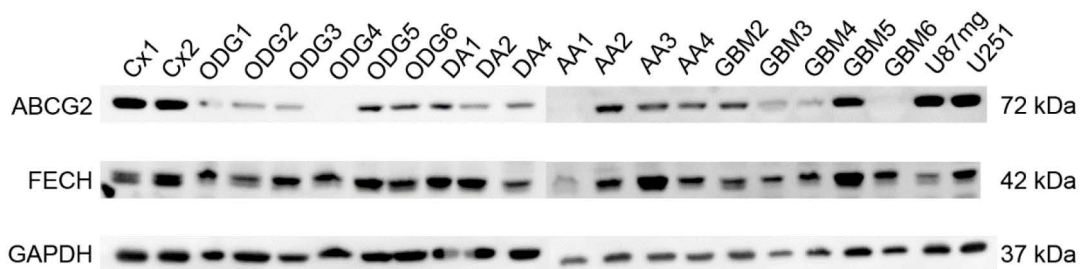


Abbildung 18: Nachweis der Proteinexpression von ABCG2 und FECH mit Western Blot
Der Western Blot zeigt die Proteinexpression von ABCG2 und FECH im frontalen Cortex, im Gliomgewebe und in den Zelllinien U-87 MG und U-251. GAPDH wurde als Ladekontrolle genutzt. Cx = Cortex (Kontrolle), ODG = Oligodendrogliom, DA = diffuses Astrozytom, AA = anaplastisches Astrozytom, GBM = Glioblastoma multiforme

3.8 MRNA-EXPRESSIONSLEVEL (qRT-PCR)

Für die Bestimmung der mRNA-Expressionslevel von ABCG2 und FECH wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Als Haushaltsgene dienten S14, S18 und U6 für die Normalisierung. Zur grafischen Darstellung der verminderten/vermehrten Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden pro Tumorgruppe die Mittelwerte der relativen Änderung der mRNA-Expression (*mean fold change*) durch die Berechnung des $\log_2(2^{-\Delta\Delta C_T})$ ermittelt. Als Vergleichsgruppe wurde frontaler Cortex von Obduktionen verwendet.

3.8.1 ABCG2 mRNA-Expression in Gliomen

Die Expression des ABCG2-Transporters war in den einzelnen Tumorgruppen unterschiedlich. Die Gruppe der Oligodendrogliome zeigte eine über 2-fach erhöhte mRNA-Expression des Transporters, während diffuse und anaplastische Astrozytome lediglich eine geringe Vermehrung aufwiesen. Die Analyse der Glioblastome ergab eine Reduktion der ABCG2-Expression um nahezu die Hälfte verglichen mit der Kontrollgruppe (siehe *Abbildung 19*).

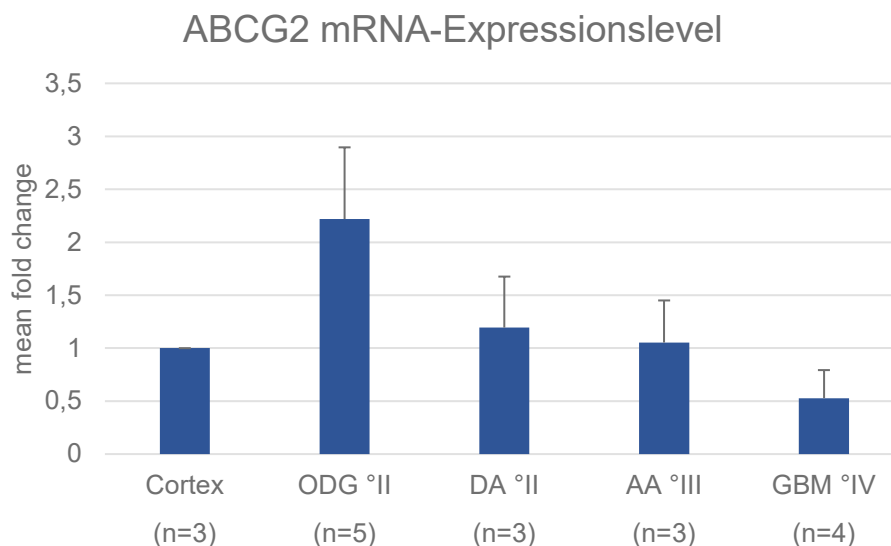


Abbildung 19: mRNA-Expressionslevel des ABCG2-Transporters

° = WHO Grad, Cortex = Kontrollgruppe, ODG = Oligodendrogliome, DA = diffuse Astrozytome, AA = anaplastische Astrozytome, GBM = Glioblastoma multiforme

Korrelation ABCG2-Expression und Fluoreszenz

Zur grafischen Veranschaulichung, ob zwischen dem Auftreten von Fluoreszenz und der ABCG2-Expression ein Zusammenhang besteht, wurde die relative mRNA-Expression der *in vitro* Fluoreszenz-positiven und Fluoreszenz-negativen Gliome verglichen. Als Messzeitpunkt für die Fluoreszenz wurde 2 Stunden nach 5-ALA-Exposition gewählt, da nach 24 Stunden alle Gliome eine gewisse positive Fluoreszenz aufwiesen. Als Vergleichsgruppe zur Berechnung der relativen Änderung der mRNA-Expression von ABCG2 diente frontaler Cortex. *Abbildung 20* zeigt, dass die ABCG2-Expression der Fluoreszenz-positiven Tumoren verglichen mit den Fluoreszenz-negativen geringer war.

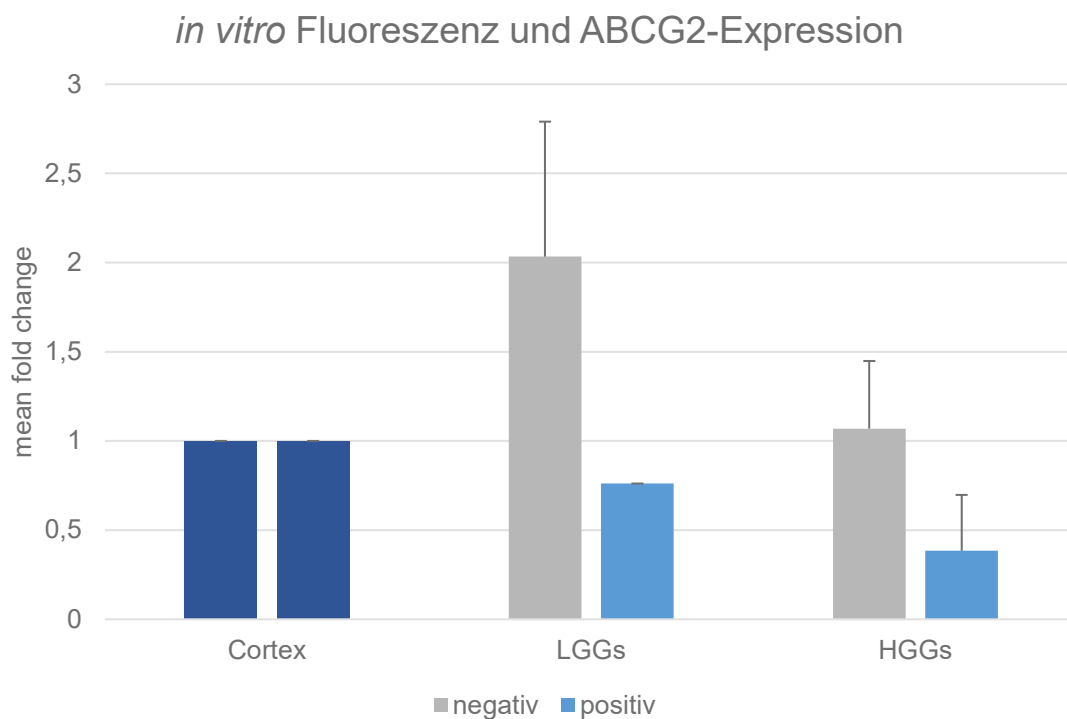


Abbildung 20: In vitro Fluoreszenz und ABCG2-Expression in Gliomen

In vitro Fluoreszenz der LGGs und HGGs 2 Stunden nach Inkubation mit 5-ALA: Die ABCG2-Expression der Fluoreszenz-positiven Tumoren war gegenüber den Fluoreszenz-negativen Gliomen erniedrigt. LGGs = low-grade gliomas: negative LGGs n=6, positive LGGs n=1; HGGs = high-grade gliomas: negative HGGs n=3, positive HGGs n=2; Cortex = Kontrollgruppe.

3.8.2 FECH mRNA-Expression in Gliomen

In allen Tumorgruppen ließ sich verglichen mit der Kontrollgruppe (Cortex) eine reduzierte mRNA-Expression der Ferrochelatase nachweisen (siehe *Abbildung 21*). Die stärkste Verminderung der FECH-Expression konnte bei den Glioblastomen festgestellt werden, sie betrug beinahe 2/3. Daneben war das FECH-Expressionslevel bei den diffusen Astrozytomen um etwas mehr als die Hälfte erniedrigt.

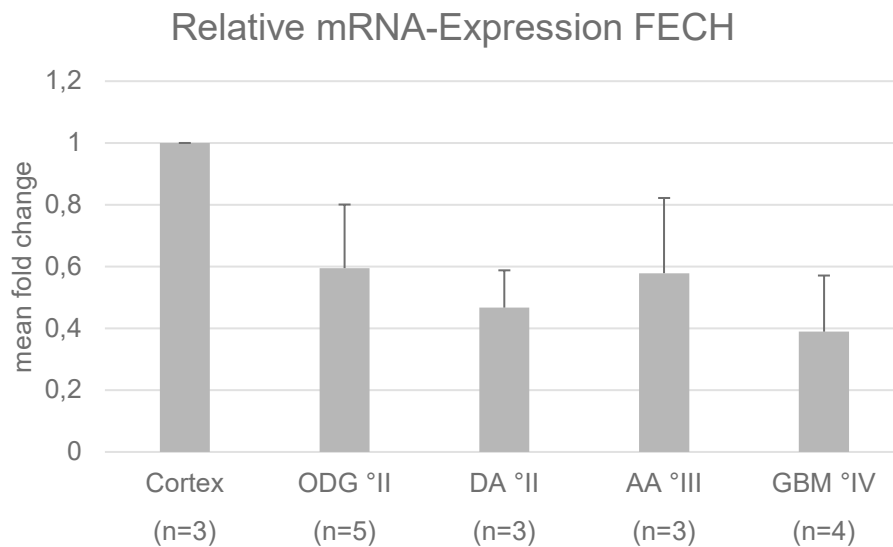


Abbildung 21: mRNA-Expressionslevel der Ferrochelatase

° = WHO Grad, Cortex = Kontrollgruppe, ODG = Oligodendrogliome, DA = diffuse Astrozytome, AA = anaplastische Astrozytome, GBM = Glioblastoma multiforme

3.8.3 Statistische Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse

Boxplots wurden eingesetzt, um die Verteilung der Messerwerte der qRT-PCR grafisch zu veranschaulichen (siehe *Abbildung 22* und *Abbildung 23*). Der Kruskal-Wallis-Test wurde gewählt, um zu berechnen, ob zwischen den einzelnen Gruppen signifikante Unterschiede der mRNA-Expression vorliegen. Der Test ergab, dass signifikante Abweichungen der ABCG2-Expression in den verschiedenen Tumorgruppen vorhanden sind ($p=0,030$). Nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur stellte sich heraus, dass die Glioblastom-Gruppe verglichen mit den Oligodendrogliomen signifikant weniger mRNA von ABCG2 exprimierte ($p<0,012$). Bei den Glioblastomen wurde darüber hinaus eine erhebliche Verminderung der FECH-Expression festgestellt, diese war statistisch jedoch nicht signifikant ($p=0,071$).

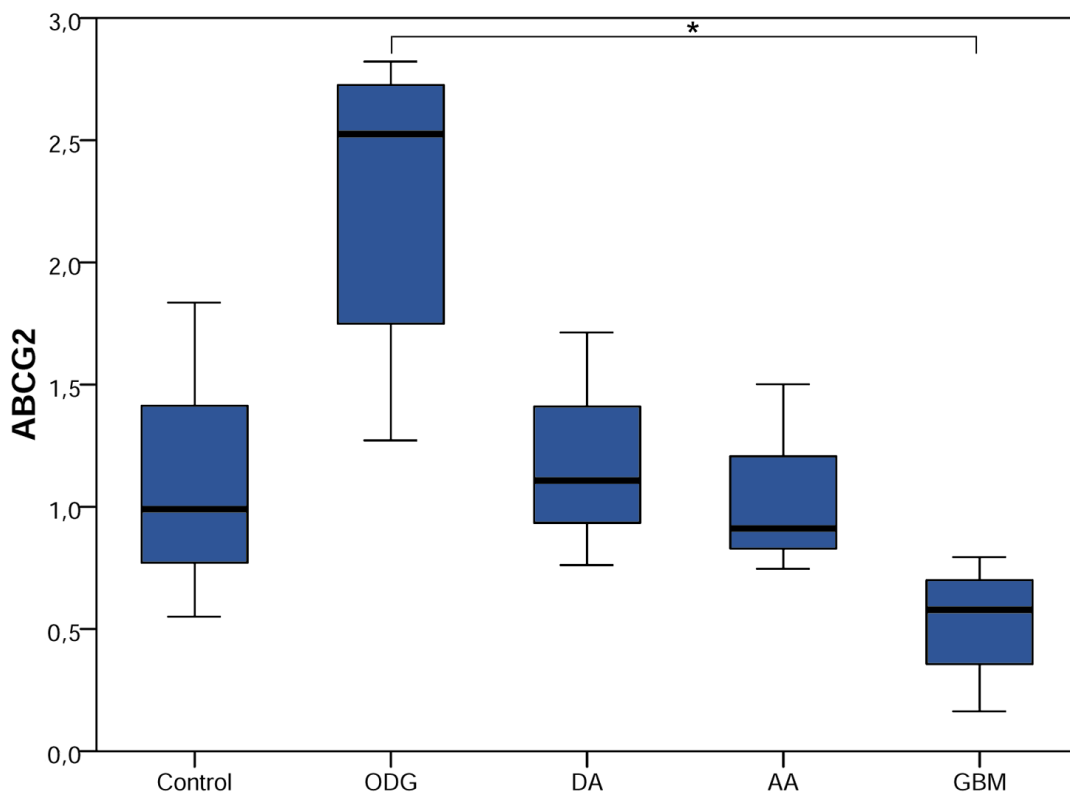


Abbildung 22: Boxplot der mRNA-Expression von ABCG2

Die mRNA-Expression von ABCG2 war in Glioblastomen signifikant geringer verglichen mit den Oligodendrogliomen ($p<0,012$).*

Control = Cortex (n=3), ODG = Oligodendrogliome (n=6), DA = diffuse Astrozytome (n=3), AA = anaplastische Astrozytome (n=3), GBM = Glioblastoma multiforme (n=4)

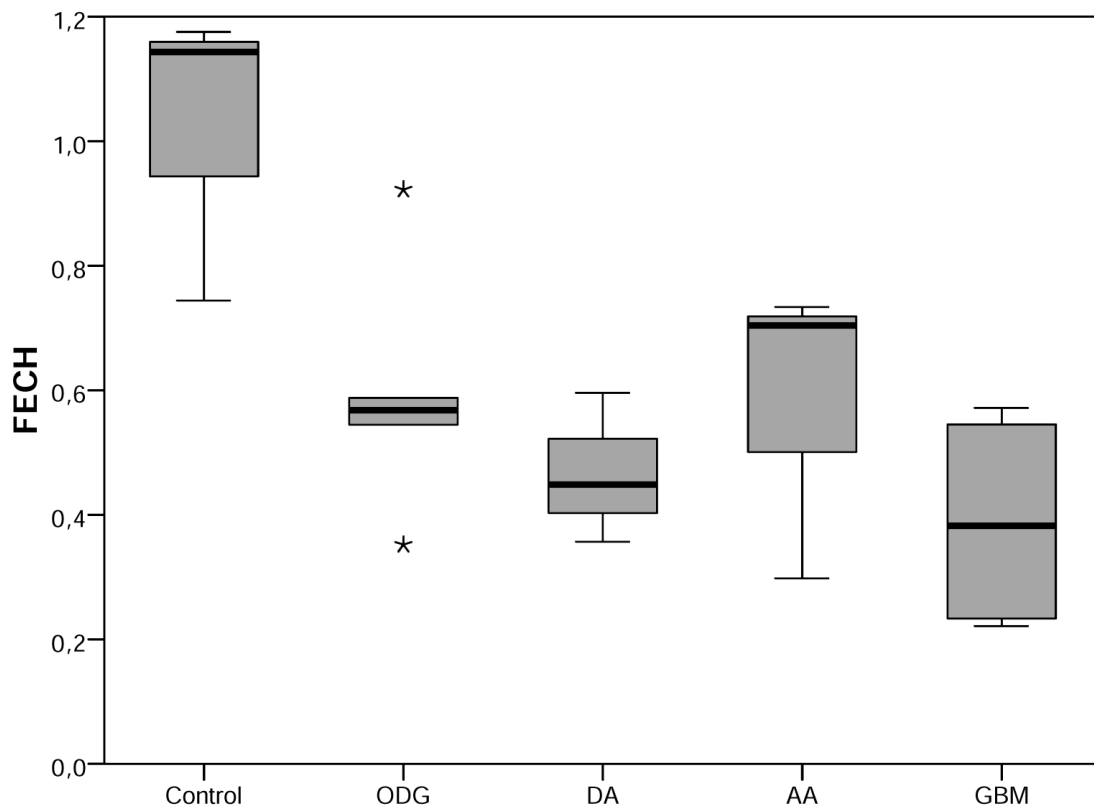


Abbildung 23: Boxplot der mRNA-Expression von FECH

Der * markiert extreme Ausreißer in der Oligodendrogliom-Gruppe.

Control = Cortex (n=3), ODG = Oligodendrogliome (n=6), DA = diffuse Astrozytome (n=3), AA = anaplastische Astrozytome (n=3), GBM = Glioblastoma multiforme (n=4)

4 DISKUSSION

In der Therapie von Gliomen steht die chirurgische Resektion an erster Stelle. Da diese hirneigenen Tumoren infiltrativ wachsen und keine Abgrenzung zu gesundem Hirngewebe aufweisen, ist eine vollständige Tumorentfernung herausfordernd. Als intraoperatives Hilfsmittel hat sich die fluoreszenzgestützte Resektion mit 5-ALA (gliolan®) bei hochgradigen Gliomen (HGGs) etabliert [16]. Bei niedriggradigen Gliomen (LGGs) erfolgt die Anwendung dieser Methode bisher nicht routinemäßig, da aufgrund unzureichender Evidenz keine Zulassung für diese Indikation vorhanden ist [60,61]. In 10 bis 20 % der LGGs konnte intraoperativ eine sichtbare Fluoreszenz beobachtet werden, während jedoch die Mehrheit dieser Tumoren makroskopisch keine brauchbare PpIX-Fluoreszenz aufweist [51,61,62]. Als mögliche Ursachen für die fehlende Fluoreszenz kommen unter anderem eine für 5-ALA unzureichend durchlässige Blut-Hirn-Schranke oder/und die ungestörte Aktivität der an der Häm-Biosynthese beteiligten Enzymen und Transportern in Frage.

Bisher gibt es unseres Wissens keine wissenschaftliche Arbeit, die die Fluoreszenz von LGGs *in vitro* nach Inkubation mit 5-ALA zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersuchte. Folgende Fragen galt es mit der durchgeführten Studie zu beantworten:

- 1) Kommt es *in vitro* bei frei verfügbarem 5-ALA zu einer Akkumulation von PpIX in niedriggradigen Gliomen, die sich mit dem Konfokalmikroskop detektieren lässt?
- 2) Ist die Expression der Ferrochelatase in niedriggradigen Gliomen im Vergleich zu gesundem Hirngewebe vermindert?
- 3) Gibt es einen Unterschied der ABCG2-Expression in niedriggradigen Gliomen im Vergleich zu gesundem Hirngewebe oder hochgradigen Gliomen?

4.1 FLUORESZENZ IN NIEDRIGGRADIGEN GLIOMEN

Die Fluoreszenz in LGGs wurde intraoperativ und *in vitro* untersucht. In dieser Studie zeigten 57 % (n=4) der LGGs mit Kontrastmittelaufnehmendem Tumoranteil intraoperativ Fluoreszenz-positive Areale, während in der Vergleichsgruppe alle HGGs mit Kontrastmittelaufnahme (n=6) intraoperativ sichtbare Fluoreszenz aufwiesen. Gliome ohne Kontrastmittelaufnahme wurden nicht fluoreszenzgestützt operiert, daher lässt sich keine Aussage über die intraoperative Fluoreszenz dieser Tumoren treffen. In einer Studie von Jaber *et al.* waren 23 % der LGGs Kontrastmittelaufnehmend und 16 % davon intraoperativ fluoreszierend. Interessant war auch, dass 13 % der WHO Grad III Tumoren keine Kontrastmittelaufnahme aufwiesen und von diesen 70 % intraoperativ Fluoreszenz-positiv waren. Die Autoren beschrieben für ihre Studie einen starken Zusammenhang zwischen Kontrastmittelaufnahme und Fluoreszenz mit 78 % Fluoreszenz-positivität der Kontrastmittelaufnehmenden Tumoren. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von unserer Studie: In 77 % der Gliome mit Kontrastmittelaufnahme war intraoperativ Fluoreszenz zu beobachten. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Kontrastmittelaufnahme positiv mit dem Auftreten von intraoperativer Fluoreszenz korreliert.

In den *in vitro* Experimenten war 2 Stunden nach der Inkubation mit 5-ALA in 56 % der LGGs und in 50 % der HGGs Fluoreszenz detektierbar. 24 Stunden nach 5-ALA Exposition war in allen in die Auswertung einbezogenen Gliomen (n=15) *in vitro* Fluoreszenz zu sehen: 78 % bzw. 22 % der LGGs zeigten mittelgradige bzw. starke Fluoreszenz, während von den HGGs 17 % schwache, 66 % mittelgradige und 17 % starke Fluoreszenz aufwiesen. Mit den Experimenten konnte veranschaulicht werden, dass es *in vitro* bei frei verfügbarem 5-ALA zu einer Akkumulation von Protoporphyrin IX in LGGs kommt und sich die auftretende Fluoreszenz nach einer gewissen Zeit mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop detektieren lässt. Folglich sind LGGs wie HGGs bei frei verfügbarem Substrat in der Lage PpIX anzuhäufen, jedoch ist die Dauer bis zum Auftreten der Fluoreszenz unterschiedlich. Für die Evaluierung, ob der Zeitfaktor auch für die intraoperative Fluoreszenz eine Rolle spielt und ob bei LGGs (ohne Kontrastmittelaufnahme) die Blut-Hirn-Schranke für 5-ALA durchlässig ist, sind weitere Studien nötig.

4.2 FERROCHELATASE-EXPRESSION IN GLIOMEN

Die Mechanismen der PpIX-Akkumulation in malignen Tumorzellen sind bisher nicht ausreichend erforscht. Es wird postuliert, dass unter anderem eine verminderte Expression des Enzyms Ferrochelatase in Gliomen zum Auftreten von Fluoreszenz führt [38]. Mittels qRT-PCR konnten wir eine verminderte FECH-Expression in allen Tumorgруппen im Vergleich zu gesundem Hirngewebe (Cortex) nachweisen. In den Glioblastomen war die mRNA-Expression der FECH am geringsten (um 2/3 weniger Expression, als in der Kontrollgruppe). Die diffusen Astrozytome wiesen ein um 50 % erniedrigte FECH-Expression auf. Die Unterschiede der FECH-Expression in den Subgruppen war vermutlich aufgrund der geringen Fallzahl (n=19) nicht statistisch signifikant. Unsere Forschungsergebnisse stimmen jedoch mit denen von Teng *et al.* überein. Demzufolge kann angenommen werden, dass die Expression der Ferrochelatase durchaus eine Rolle bei der Akkumulation von PpIX in Gliomen spielt.

4.3 ABCG2-EXPRESSION IN GLIOMEN

Als weiterer Faktor, der für das Auftreten von Fluoreszenz in malignen Tumorzellen verantwortlich sein könnte, wird der ABCG2-Transporter, der PpIX aus den Zellen ausschleust, diskutiert. Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen eine über 2fach erhöhte mRNA-Expression des Transporters in den Oligodendrogliomen verglichen mit der Kontrollgruppe, während diffuse und anaplastische Astrozytome lediglich eine geringe Vermehrung aufwiesen. Die Analyse der Glioblastome ergab eine Reduktion der ABCG2-Expression um nahezu die Hälfte. Der Unterschied der mRNA-Expression des ABCG2-Transporters zwischen Oligodendrogliomen und Glioblastomen war signifikant ($p < 0,012$). Weiters war die ABCG2-Expression der Fluoreszenz-positiven Tumoren verglichen mit den Fluoreszenz-negativen erniedrigt. Ähnliches haben japanische Forscherinnen und Forscher in Experimenten an gastrointestinalen Krebszelllinien herausgefunden: Eine niedrige Expressionsrate von ABCG2 ging mit einer höheren PpIX-Fluoreszenzintensität einher [41]. Eine Studie von Ishikawa *et al.* zeigte, dass die mRNA-Expression von ABCG2 in malignen Hirntumorzellen mit starker Fluoreszenz geringer war, als die ABCG2-Expression in Zellen mit schwacher Fluoreszenz [74]. Weiters konnte das Team um Ishikawa in Versuchen mit der menschlichen Hirntumor-Zelllinie U-87 MG demonstrieren, dass es durch den ABCG2-Inhibitor Gefitinib zu einer Steigerung der PpIX-Fluoreszenz kommt [43]. Diese und unsere Ergebnisse sprechen daher für eine Beteiligung des ABCG2-Transporters bei der Akkumulation von PpIX in Gliomen. In unseren Daten war außerdem eine vermehrte ABCG2-Expression in Fluoreszenz-negativen Tumoren (2 Stunden nach 5-ALA-Exposition), vor allem Oligodendrogliomen, zu erkennen. Als Folge der vermehrten Expression des Transporters kommt es eventuell zu einer gesteigerten Ausfuhr von PpIX aus der Zelle, was erklären würde, dass nach 2 Stunden keine Fluoreszenz sichtbar war. Jedoch war nach 24 Stunden Fluoreszenz detektierbar, was bedeuten könnte, dass der Transporter die Überproduktion an PpIX nach einer gewissen Zeit nicht mehr ausschleusen kann und es auch in Zellen mit einer vermehrten Expression von ABCG2 zu einer Akkumulation von PpIX kommt. Diese Vermutungen lassen sich jedoch mit unseren Experimenten nicht formell belegen und sind lediglich als Spekulationen aufzufassen.

4.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERKENNTNISSE DIESER ARBEIT

- 1) *In vitro* kommt es sowohl bei niedriggradigen als auch hochgradigen Gliomen bei frei verfügbarem 5-ALA zu einer intrazellulären Akkumulation von Protoporphyrin IX mit detektierbarer Fluoreszenz.
- 2) *In vitro* Fluoreszenz wurde in Gliomgewebe verschiedener WHO Grade zu unterschiedlichen Messzeitpunkten beobachtet (früher vs. später).
- 3) Die Ferrochelatase-Expression war in allen Gliomen verglichen mit gesundem Hirngewebe reduziert, wobei in Glioblastomen die niedrigsten Werte gemessen wurden.
- 4) Die ABCG2-Expression in Glioblastomen war gegenüber den Oligodendrogliomen signifikant vermindert ($p < 0,012$).
- 5) Gliome, die bereits 2 Stunden nach 5-ALA-Exposition Fluoreszenz-positiv waren, wiesen eine geringere ABCG2-Expression auf, als jene, die zu diesem Zeitpunkt keine Fluoreszenz zeigten.

4.5 LIMITIERUNGEN DER ARBEIT

Die Aussagekraft der vorliegenden Arbeit ist durch die geringe Fallzahl limitiert, was auch die statistische Auswertbarkeit einschränkte. Weiters herrschen bei *in vitro* Experimenten nicht die gleichen Bedingungen wie *in vivo*, was bei Betrachtung der Arbeit ebenfalls berücksichtigt werden muss. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich Tumorzellen *per se in vivo* ähnlich verhalten.

Ein weiterer Punkt, der beachtet werden muss, ist, dass die für die Experimente verwendeten Tumorproben von den Operationen selbst nicht neuropathologisch untersucht wurden, sondern andere Teile des Tumors für die Diagnostik verwendet wurden. Dadurch ist nicht eindeutig, ob für die Experimente der Studie solide Tumoranteile oder Gewebe der Infiltrationszone genutzt wurden (mögliche Heterogenität innerhalb des Tumors).

4.6 AUSBLICK

Unsere Forschungsergebnisse demonstrieren, dass auch niedriggradige Gliome bei frei verfügbarem Substrat *in vitro* zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inkubation mit 5-ALA eine PpIX-Fluoreszenz aufweisen, die mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop detektiert werden kann. Die exakten Mechanismen, die zu einer Akkumulation des Protoporphyrin IX in malignen Tumorzellen führen, sind jedoch weiterhin nicht vollständig geklärt.

Durch die fluoreszenzgestützte Operation konnte das Resektionsausmaß bei hochgradigen Gliomen gesteigert werden [16]. Wie bei den HGGs ist es auch bei niedriggradigen Gliomen von enormer Bedeutung für die Progressionsfreiheit und das Überleben der Erkrankten eine möglichst vollständige Resektion des Tumors zu erzielen [60]. Die Anwendung dieser Methode wäre daher sicherlich auch für LGGs von Vorteil, sofern die Fluoreszenz auch intraoperativ sichtbar ist.

Was spricht für die Anwendung von 5-ALA bei niedriggradigen Gliomen?

Die Anwendung von 5-ALA bei nicht kontrastmittelaufnehmenden Tumoren kann dabei helfen, eine präzisere Diagnose zu stellen und somit die am besten geeignete Therapie auszuwählen: Werden anaplastische Herde in LGGs übersehen und in der Folge die Malignität zu niedrig eingestuft, werden Erkrankte möglicherweise nicht ausreichend aggressiv therapiert.

Zur Detektion metabolisch aktiver Regionen kann die PET eingesetzt werden und mit Hilfe der Neuronavigation können diese Bereiche des Tumors aufgesucht und reseziert werden. Die Verlagerung von Hirnstrukturen während der Operation kann das Auffinden dieser Areale jedoch erschweren, was durch die fluoreszenzgestützte Resektion mit 5-ALA ausgeglichen werden kann [60].

Mit der Zeit kommt es bei allen LGGs zu einer malignen Entartung, weshalb es bedeutend ist, fokale anaplastische Herde zu erkennen und frühzeitig operativ zu entfernen., bevor es zu einer ausgedehnten Transformation der LGGs in HGGs kommt. Die Operation kann, auch bei funktionsbedingten Teilresektionen, als vorbeugende Maßnahme dienen, um die Prognose der Patientinnen und Patienten zu verbessern.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Trepel M. Neuroanatomie - Struktur und Funktion. 6. Auflage. München: Elsevier; 2015. 6–9 p.
2. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol.* 2017;18(6):e315–29.
3. Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet.* 2012;205(12):613–21.
4. Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of Gliomas. In *Cancer Treatment and Research*; 2015. p. 1–14.
5. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005;109(1):93–108.
6. DeAngelis LM. Brain Tumors. *N Engl J Med.* 2001;344(2):114–23.
7. Ellingson BM, Bendszus M, Boxerman J, Barboriak D, Erickson BJ, Smits M, et al. Consensus recommendations for a standardized Brain Tumor Imaging Protocol in clinical trials. *Neuro Oncol.* 2015;17(9):1188–98.
8. Dützmänn S. *BASICS Neurochirurgie*. 3. Auflage. München: Elsevier; 2018. 30–37 p.
9. Kreth FW, Muacevic A, Medele R, Bise K, Meyer T, Reulen HJ. The risk of haemorrhage after image guided stereotactic biopsy of intra-axial brain tumours--a prospective study. *Acta Neurochir (Wien).* 2001;143(6):539–45; discussion 545-6.
10. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803–20.

11. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, et al. *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997–1003.
12. Weller M, Reifenberger G, Tonn JC WW. Gliome: Aktuelle Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie. *Dtsch Arztebl*. 2016;18–20.
13. Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(4):764–72.
14. Osswald M, Jung E, Sahm F, Solecki G, Venkataramani V, Blaes J, et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*. 2015;528(7580):93–8.
15. Pignatti F, van den Bent M, Curran D, Debruyne C, Sylvester R, Therasse P, et al. Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J Clin Oncol*. 2002;20(8):2076–84.
16. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen H-J, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*. 2006;7(5):392–401.
17. De Witt Hamer PC, Robles SG, Zwinderman AH, Duffau H, Berger MS. Impact of Intraoperative Stimulation Brain Mapping on Glioma Surgery Outcome: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol*. 2012;30(20):2559–65.
18. Vogelbaum MA, Jost S, Aghi MK, Heimberger AB, Sampson JH, Wen PY, et al. Application of novel response/progression measures for surgically delivered therapies for gliomas: Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) Working Group. *Neurosurgery*. 2012;70(1):234–43; discussion 243–4.
19. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G, Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol*. 2002;64(3):259–73.

20. Ryken TC, Parney I, Buatti J, Kalkanis SN, Olson JJ. The role of radiotherapy in the management of patients with diffuse low grade glioma. *J Neurooncol.* 2015;125(3):551–83.
21. Niyazi M, Brada M, Chalmers AJ, Combs SE, Erridge SC, Fiorentino A, et al. ESTRO-ACROP guideline “target delineation of glioblastomas.” *Radiother Oncol.* 2016;118(1):35–42.
22. van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJB, Kros JM, Kouwenhoven MCM, Delattre J-Y, et al. Adjuvant Procarbazine, Lomustine, and Vincristine Chemotherapy in Newly Diagnosed Anaplastic Oligodendroglioma: Long-Term Follow-Up of EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol.* 2013;31(3):344–50.
23. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014;370(8):709–22.
24. Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(10):1373–85.
25. van den Bent MJ, Smits M, Kros JM, Chang SM. Diffuse Infiltrating Oligodendroglioma and Astrocytoma. *J Clin Oncol.* 2017;35(21):2394–401.
26. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, et al. 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):459–66.
27. Suchorska B, Weller M, Tabatabai G, Senft C, Hau P, Sabel MC, et al. Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma-results from the DIRECTOR trial. *Neuro Oncol.* 2016;18(4):549–56.

28. Nieder C, Andratschke NH G AL. Re-irradiation for Recurrent Primary Brain Tumors. *Anticancer Res.* 2016;36(10):4985–96.
29. Wick W, Gorlia T, Bendszus M, Taphoorn M, Sahm F, Harting I, et al. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2017;377(20):1954–63.
30. Stummer W, Stocker S, Novotny A, Heimann A, Sauer O, Kempfski O, et al. 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):160–9.
31. Ma R, Watts C. Selective 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in Gliomas. *Acta Neurochir (Wien).* 2016;158(10):1935–41.
32. García SC, Moretti MB, Garay M V, Battle A. Delta-aminolevulinic acid transport through blood-brain barrier. *Gen Pharmacol.* 1998;31(4):579–82.
33. Ennis SR, Novotny A, Xiang J, Shakui P, Masada T, Stummer W, et al. Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain. *Brain Res.* 2003;959(2):226–34.
34. Xiang J, Hu Y, Smith DE, Keep RF. PEPT2-mediated transport of 5-aminolevulinic acid and carnosine in astrocytes. *Brain Res.* 2006;1122(1):18–23.
35. Novotny A, Xiang J, Stummer W, Teuscher NS, Smith DE, Keep RF. Mechanisms of 5-aminolevulinic acid uptake at the choroid plexus. *J Neurochem.* 2000;75(1):321–8.
36. Hou C, Yamaguchi S, Ishi Y, Terasaka S, Kobayashi H, Motegi H, et al. Identification of PEPT2 as an important candidate molecule in 5-ALA-mediated fluorescence-guided surgery in WHO grade II/III gliomas. *J Neurooncol.* 2019;
37. Zhao S-G, Chen X-F, Wang L-G, Yang G, Han D-Y, Teng L, et al. Increased expression of ABCB6 enhances protoporphyrin IX accumulation and photodynamic effect in human glioma. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(13):4379–

- 88.
38. Teng L, Nakada M, Zhao S-G, Endo Y, Furuyama N, Nambu E, et al. Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy. *Br J Cancer*. 2011;104(5):798–807.
39. Valdés PA, Samkoe K, O'Hara JA, Roberts DW, Paulsen KD, Pogue BW. Deferoxamine iron chelation increases delta-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX in xenograft glioma model. *Photochem Photobiol*. 2010;86(2):471–5.
40. Štefková J, Poledne R, Hubáček JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res*. 2004;53(3):235–43.
41. Kawai N, Hirohashi Y, Ebihara Y, Saito T, Murai A, Saito T, et al. ABCG2 expression is related to low 5-ALA photodynamic diagnosis (PDD) efficacy and cancer stem cell phenotype, and suppression of ABCG2 improves the efficacy of PDD. Wang Q, editor. *PLoS One*. 2019;14(5):e0216503.
42. Kobuchi H, Moriya K, Ogino T, Fujita H, Inoue K, Shuin T, et al. Mitochondrial Localization of ABC Transporter ABCG2 and Its Function in 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Protoporphyrin IX Accumulation. Gallyas F, editor. *PLoS One*. 2012;7(11):e50082.
43. Ishikawa T, Kajimoto Y, Inoue Y, Ikegami Y, Kuroiwa T. Critical role of ABCG2 in ALA-photodynamic diagnosis and therapy of human brain tumor. *Adv Cancer Res*. 2015;125:197–216.
44. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014;2014(10):pdb.top071795.
45. Cox G. Optical imaging techniques in cell biology. CRC Press; 2012.
46. Duffner F, Ritz R, Freudenstein D, Weller M, Dietz K, Wessels J. Specific intensity imaging for glioblastoma and neural cell cultures with 5-aminolevulinic acid-derived protoporphyrin IX. *J Neurooncol*. 2005;71(2):107–11.

47. Stummer W, Stepp H, Möller G, Ehrhardt A, Leonhard M, Reulen HJ. Technical principles for protoporphyrin-IX-fluorescence guided microsurgical resection of malignant glioma tissue. *Acta Neurochir (Wien)*. 1998;140(10):995–1000.
48. Coburger J, Engelke J, Scheuerle A, Thal DR, Hlavac M, Wirtz CR, et al. Tumor detection with 5-aminolevulinic acid fluorescence and Gd-DTPA-enhanced intraoperative MRI at the border of contrast-enhancing lesions: a prospective study based on histopathological assessment. *Neurosurg Focus*. 2014;36(2):E3.
49. Yamada S, Muragaki Y, Maruyama T, Komori T, Okada Y. Role of neurochemical navigation with 5-aminolevulinic acid during intraoperative MRI-guided resection of intracranial malignant gliomas. *Clin Neurol Neurosurg*. 2015;130:134–9.
50. Hadjipanayis CG, Widhalm G, Stummer W. What is the Surgical Benefit of Utilizing 5-Aminolevulinic Acid for Fluorescence-Guided Surgery of Malignant Gliomas? *Neurosurgery*. 2015;77(5):663–73.
51. Sanai N, Snyder LA, Honea NJ, Coons SW, Eschbacher JM, Smith KA, et al. Intraoperative confocal microscopy in the visualization of 5-aminolevulinic acid fluorescence in low-grade gliomas. *J Neurosurg*. 2011;115(4):740–8.
52. Stummer W, Stocker S, Wagner S, Stepp H, Fritsch C, Goetz C, et al. Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Neurosurgery*. 1998;42(3):518–25; discussion 525-6.
53. Regula J, MacRobert AJ, Gorchein A, Buonaccorsi GA, Thorpe SM, Spencer GM, et al. Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal, and colorectal tumours using 5 aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX--a pilot study. *Gut*. 1995;36(1):67–75.
54. Stummer W, Novotny A, Stepp H, Goetz C, Bise K, Reulen HJ. Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme utilizing 5-ALA-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. *J Neurosurg*.

- 2000;93(6):1003–13.
55. Stummer W, Tonn J-C, Goetz C, Ullrich W, Stepp H, Bink A, et al. 5-Aminolevulinic acid-derived tumor fluorescence: the diagnostic accuracy of visible fluorescence qualities as corroborated by spectrometry and histology and postoperative imaging. *Neurosurgery*. 2014;74(3):310–20.
 56. Roberts DW, Valdés PA, Harris BT, Fontaine KM, Hartov A, Fan X, et al. Coregistered fluorescence-enhanced tumor resection of malignant glioma: relationships between δ -aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence, magnetic resonance imaging enhancement, and neuropathological parameters. Clinical article. *J Neurosurg*. 2011;114(3):595–603.
 57. Nimsy C, Ganslandt O, Cerny S, Hastreiter P, Greiner G, Fahlbusch R. Quantification of, visualization of, and compensation for brain shift using intraoperative magnetic resonance imaging. *Neurosurgery*. 2000;47(5):1070–9; discussion 1079-80.
 58. Nimsy C, von Keller B, Schlaffer S, Kuhnt D, Weigel D, Ganslandt O, et al. Updating Navigation With Intraoperative Image Data. *Top Magn Reson Imaging*. 2008;19(4):197–204.
 59. Roessler K, Becherer A, Donat M, Cejna M, Zachenhofer I. Intraoperative tissue fluorescence using 5-aminolevulinic acid (5-ALA) is more sensitive than contrast MRI or amino acid positron emission tomography (^{18}F -FET PET) in glioblastoma surgery. *Neurol Res*. 2012;34(3):314–7.
 60. Hendricks BK, Sanai N, Stummer W. Fluorescence-guided surgery with aminolevulinic acid for low-grade gliomas. *J Neurooncol*. 2019;141(1):13–8.
 61. Jaber M, Wölfer J, Ewelt C, Holling M, Hasselblatt M, Niederstadt T, et al. The Value of 5-Aminolevulinic Acid in Low-grade Gliomas and High-grade Gliomas Lacking Glioblastoma Imaging Features. *Neurosurgery*. 2016;78(3):401–11.
 62. Widhalm G, Kiesel B, Woehrer A, Traub-Weidinger T, Preusser M, Marosi C,

- et al. 5-Aminolevulinic acid induced fluorescence is a powerful intraoperative marker for precise histopathological grading of gliomas with non-significant contrast-enhancement. Coles JA, editor. PLoS One. 2013;8(10):e76988.
63. Ishihara R, Katayama Y, Watanabe T, Yoshino A, Fukushima T, Sakatani K. Quantitative spectroscopic analysis of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence intensity in diffusely infiltrating astrocytomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2007;47(2):53–7; discussion 57.
 64. Xie Y, Thom M, Ebner M, Wykes V, Desjardins A, Miserocchi A, et al. Wide-field spectrally resolved quantitative fluorescence imaging system: toward neurosurgical guidance in glioma resection. *J Biomed Opt*. 2017;22(11):1–14.
 65. Belykh E, Miller EJ, Hu D, Martirosyan NL, Woolf EC, Scheck AC, et al. Scanning Fiber Endoscope Improves Detection of 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Fluorescence at the Boundary of Infiltrative Glioma. *World Neurosurg*. 2018;113:e51–69.
 66. Wei L, Chen Y, Yin C, Borwege S, Sanai N, Liu JTC. Optical-sectioning microscopy of protoporphyrin IX fluorescence in human gliomas: standardization and quantitative comparison with histology. *J Biomed Opt*. 2017;22(4):046005.
 67. Kunz M, Thon N, Eigenbrod S, Hartmann C, Egensperger R, Herms J, et al. Hot spots in dynamic (18)FET-PET delineate malignant tumor parts within suspected WHO grade II gliomas. *Neuro Oncol*. 2011;13(3):307–16.
 68. Jaber M, Ewelt C, Wölfer J, Brokinkel B, Thomas C, Hasselblatt M, et al. Is Visible Aminolevulinic Acid-Induced Fluorescence an Independent Biomarker for Prognosis in Histologically Confirmed (World Health Organization 2016) Low-Grade Gliomas? *Neurosurgery*. 2018;
 69. Zagzag D, Goldenberg M, Brem S. Angiogenesis and blood-brain barrier breakdown modulate CT contrast enhancement: an experimental study in a rabbit brain-tumor model. *Am J Roentgenol*. 1989;153(1):141–6.
 70. Huang Y, Rajappa P, Hu W, Hoffman C, Cisse B, Kim J-H, et al. A

proangiogenic signaling axis in myeloid cells promotes malignant progression of glioma. *J Clin Invest.* 2017;127(5):1826–38.

71. Widhalm G, Wolfsberger S, Minchev G, Woehrer A, Krssak M, Czech T, et al. 5-Aminolevulinic acid is a promising marker for detection of anaplastic foci in diffusely infiltrating gliomas with nonsignificant contrast enhancement. *Cancer.* 2010;116(6):1545–52.
72. Valdés PA, Jacobs V, Harris BT, Wilson BC, Leblond F, Paulsen KD, et al. Quantitative fluorescence using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX biomarker as a surgical adjunct in low-grade glioma surgery. *J Neurosurg.* 2015;123(3):771–80.
73. Valdés PA, Kim A, Leblond F, Conde OM, Harris BT, Paulsen KD, et al. Combined fluorescence and reflectance spectroscopy for in vivo quantification of cancer biomarkers in low- and high-grade glioma surgery. *J Biomed Opt.* 2011;16(11):116007.
74. Ishikawa T, Nakagawa H, Hagiya Y, Nonoguchi N, Miyatake S-I, Kuroiwa T. Key Role of Human ABC Transporter ABCG2 in Photodynamic Therapy and Photodynamic Diagnosis. *Adv Pharmacol Sci.* 2010;2010:13.

ANHANG

Liste der verwendeten Reagenzien und Materialien

Reagenz/Material	Firma	Firmensitz
30 % Acrylamid	Bio-Rad	Wien, Österreich
37 % Formaldehyd	Merck	Darmstad, Deutschland
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad	Wien, Österreich
ABCG2 fw: TGACCTGAAGGCATTTACTG rev: GGTAGAAAGCCACTCTTCAG	Eurogentec	Lüttich, Belgien
Agarose	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
APS	Bio-Rad	Wien, Österreich
Bromphenolblau	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
CASYton	OLS OMNI Life Science	Bremen, Deutschland
ChemiDoc™Touch	Bio-Rad	Wien, Österreich
Complete Tablets Mini EDTA-free, Easypack	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
DEPC-treated water	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
DMEM	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
DMEM/F-12, no phenol red	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
DTT	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA

EDTA	Bio-Rad	Wien, Österreich
FBS	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
Ferrochelatase fw: TCACCACAGAAACAGCCCAG rev: TCGGCTTCCTGATGTTAGACTC	Eurogentec	Lüttich, Belgien
Formaldehyd	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	VWR	Wien, Österreich
gliolan®	medac GmbH	Wedel, Deutschland
HCl (Hydrochlorid)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Hoechst 33342	Abcam plc,	Cambridge, UK
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
LunaScript™ SuperMix Kit	New England Biolabs	Massachusetts, USA
Magnalyser green beads	Roche	Rotkreuz, Schweiz
MOPS	Bio-Rad	Wien, Österreich
msαFECH	Santa Cruz Biotechnology	Texas, USA
NaCl (Natriumchlorid)	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaOH	Bio-Rad	Wien, Österreich
Natriumacetat	Bio-Rad	Wien, Österreich
NP-40	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
PBS	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
Pefabloc® SC	Merck	Darmstadt, Deutschland

Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
PhosSTOP Easypack	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Ponceau S solution	Merck	Darmstad, Deutschland
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standard	Bio-Rad	Wien, Österreich
PVDF	Millipore	Massachusetts, USA
rbαABCG2	Abcam	Cambridge, UK
rbαGAPDH	Cell Signaling Technology	Massachusetts, USA
RNase-free water	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
Rotiphorese® 10x SDS-PAGE	Roth	Karlsruhe, Deutschland
S14 fw: GGTCATCAGCCTCGGACCTCA rev: CAGCTCCTTGCACCTCTGGGC	Eurogentec	Lüttich, Belgien
S18 fw: GATATGCTCATGTGGTGTG rev: AATCTTCTTCAGTCGCTCCA	Eurogentec	Lüttich, Belgien
SDS	Roth	Karlsruhe, Deutschland
SsoAdvanced™ Universal Syber® Green Supermix	Bio-Rad	Wien, Österreich
StartingBlock™ Blocking-Puffer	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
Super Signal West Pico Chemolumineszenz-Substrat	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
TEMED	Bio-Rad	Wien, Österreich
TRIS	Merck	Darmstad, Deutschland

Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Tris/Glycine	Bio-Rad	Wien, Österreich
Trockenmilchpulver	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Trypsin (2.5%), no phenol red	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
Tween 20	Merck	Darmstad, Deutschland
U6 fw: CTCGCTTCGGCAGCACA rev: AACGCTTCACGAATTTGCGT	Eurogentec	Lüttich, Belgien

Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Firma	Firmensitz
Biofuge Pico	Heraeus	Hanau, Deutschland
biologische Sicherheitswerkbank, Safe 2020	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
Biospectrometer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
CASY® Cell Counter	OLS OMNI Life Science	Bremen, Deutschland
CLSM 510 META	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Oberkochen, Deutschland
electrophoresis chamber	Biozym	Hessisch Oldendorf, Germany
Electrophoresis Power supply EPS 301	GE Healthcare	Little Chalfont, UK
FVL-2400N Combi-Spin Minizentrifuge/-Vortex	Biosan	Riga, Lettland
Image Lab 5.2 Software	Bio-Rad	Wien, Österreich
LightCycler480	Roche	Rotkreuz, Schweiz
MagNA Lyser Green Beads	Roche	Rotkreuz, Schweiz
MagNa Lyser Instrument	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Maxwell® 16 Instrument and LEV simplyRNA Tissue Kit	Promega GmbH	Mannheim, Deutschland
Mini-Shaker MS1	Ika	North Carolina, USA
Multifuge 1 L-R	Heraeus	Hanau, Deutschland
Multiple Gel Casters	Hofer	Massachusetts, USA
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
PowerPac HC	Bio-Rad	Wien, Österreich
Semi-dry Blotting Unit V20-SDB	Scieplas	Cambridge, UK

Shaker DOS, S-4	ELMI	Russland
Thermomixer comfort	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, USA
Trans-Blot® SD System	Bio-Rad	Wien, Österreich

Ethikkommission



Medizinische Universität Graz

Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz
ethikkommission@medunigraz.at
Tel.: +43 / 316 / 385-13928, Fax: -14348

VOTUM gültig bis 25.01.2019

EK-Nummer: 30-123 ex 17/18
Studientitel: 5-Aminolevulinic acid mediated Protoporphyrin IX fluorescence and ferrochelatase activity in low grade gliomas
Prüfer: Dr. med. Gord von Campe
Universitätsklinik für Neurochirurgie
Sponsor: Med.Uni Graz, Universitätsklinik für Neurochirurgie
Ansprechpartner: Dr. med. Gord von Campe, 8036 Graz, Auenbruggerplatz 29
CRO: -
Antragsteller: Universitätsklinik für Neurochirurgie
Ansprechpartner: Dr. med. Gord von Campe, 8036 Graz, Auenbruggerplatz 29

Die o.a. Studie wurde von der Ethikkommission erstmals im 'expedited Review' am 20.12.2017 behandelt. Die Ethikkommission ist zu folgendem Schluss gekommen:

Es besteht kein Einwand gegen die Durchführung der Studie in der vorliegenden Form.

Kommissionsmitglieder, die für diesen Tagesordnungspunkt als befangen anzusehen waren und daher gemäß Geschäftsordnung an der Entscheidungsfindung und Abstimmung nicht teilgenommen haben: keine

Zur Beurteilung vorliegende Dokumente:

Dokumente eingegangen am 05.12.2017, begutachtet im 'expedited Review' am 20.12.2017

✓ Cover Letter Anschreiben_EK 1.0	05.12.2017
✓ Antragsformular ECS	05.12.2017
✓ Originalprotokoll Studienprotokoll_5-ALA_und_niedriggradige_Gliome_V2 2.0	01.12.2017
Informed Consent Form Patienten_Einv_Fluoreszenz_bei_niedriggradigen_Gliomen_V1 1.0	01.12.2017
✓ Sonstiges: Ethikantrag-Punkt_9-Teil_B 1.0	05.12.2017

Dokumente eingegangen am 16.01.2018, begutachtet im 'expedited Review' am 25.01.2018

✓ Antragsformular ECS Unterschriftenseiten	21.12.2017
✓ Informed Consent Form 1.1	15.01.2018
✓ Letter of Authorization	22.12.2017

Die Ethikkommission geht - rechtlich unverbindlich - davon aus, dass es sich um keine klinische Prüfung nach AMG bzw. MPG handelt.

Es handelt sich um eine Studie im Rahmen einer Diplomarbeit.

Das Votum der Ethikkommission berührt in keiner Weise die alleinige Verantwortung der Prüferin / des Prüfers / der Prüfer für die ordnungsgemäße Durchführung der Studie unter Einhaltung aller einschlägiger gesetzlicher Bestimmungen und Richtlinien.

Weiters machen wir darauf aufmerksam, dass der Kommission unverzüglich zu melden sind:

- Abweichungen vom Protokoll aus Sicherheitsgründen oder Protokolländerungen

EK-Nummer: 30-123 ex 17/18

Votum (25.01.2018)

Seite 1 von 2

Medizinische Universität Graz, Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz. www.medunigraz.at

Rechtsform: Juristische Person öffentlichen Rechts gem. Universitätsgesetz 2002. Information: Mitteilungsblatt der Universität und www.medunigraz.at. DVR-Nr. 210 9494. UID: ATU 575 111 79. Bankverbindung: Bank Austria Creditanstalt BLZ 12000 Konto-Nr. 500 948 400 04, Raiffeisen Landesbank Steiermark BLZ 38000 Konto-Nr. 49510.

- Änderungen, die das Risiko der Teilnehmer/-innen erhöhen oder die Durchführung der Studie wesentlich beeinflussen
- Mutmaßliche unerwartete schwerwiegende Nebenwirkungen - SUSARs (AMG-Studien ab 1.5.2004) oder schwerwiegende unerwünschte Ereignisse - SAEs (andere Studien)
- Jegliche Information über sonstige Umstände, die die Sicherheit der Teilnehmer/-innen oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen können

Dieses Votum gilt für ein Jahr ab dem Datum der Ausstellung. Bei längerer Studiendauer ist rechtzeitig vor Ablauf der Gültigkeit des Votums ein Zwischenbericht vorzulegen (Berichtsformular), um eine etwaige Verlängerung zu erlangen.

Graz, 25. Jänner 2018



Univ. Prof. DI Dr. Josef Haas
Vorsitzender



Univ. Prof. Dr. Hermann Toplak
Stv. Vorsitzender

Achtung: Bitte bei allen das Projekt betreffende Schreiben oder telefonischen Anfragen die EK-Nummer angeben!



Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz
ethikkommission@medunigraz.at
Tel.: +43 / 316 / 385-13928, Fax: -14348

FOLGEVOTUM gültig bis 25.01.2020

EK-Nummer: 30-123 ex 17/18
Studientitel: 5-Aminolevulinic acid mediated Protoporphyrin IX fluorescence and ferrochelatase activity in low grade gliomas
Prüfer: Dr. med. Gord von Campe
 Universitätsklinik für Neurochirurgie
Sponsor: Med.Uni Graz, Universitätsklinik für Neurochirurgie
Ansprechpartner: Dr. med. Gord von Campe, 8036 Graz, Auenbruggerplatz 29
CRO: -
Antragsteller: Universitätsklinik für Neurochirurgie
Ansprechpartner: Dr. med. Gord von Campe, 8036 Graz, Auenbruggerplatz 29

Die o.a. Studie wurde von der Ethikkommission erstmals im 'expedited Review' am 20.12.2017 behandelt. Die Ethikkommission ist zu folgendem Schluss gekommen:

Es besteht kein Einwand gegen die Durchführung der Studie in der vorliegenden Form.

Kommissionsmitglieder, die für diesen Tagesordnungspunkt als befangen anzusehen waren und daher gemäß Geschäftsordnung an der Entscheidungsfindung und Abstimmung nicht teilgenommen haben:
keine

Zur Beurteilung vorliegende Dokumente:

Dokumente eingegangen am 05.12.2017, begutachtet im 'expedited Review' am 20.12.2017

✓ Cover Letter Anschreiben_EK 1.0	05.12.2017
✓ Antragsformular ECS	05.12.2017
✓ Originalprotokoll Studienprotokoll_5-ALA_und_niedriggradige_Gliome_V2 2.0	01.12.2017
Informed Consent Form	01.12.2017
Patienten_Einv_Fluoreszenz_bei_niedriggradigen_Gliomen_V1 1.0	05.12.2017
✓ Sonstiges: Ethikantrag-Punkt_9-Teil_B 1.0	05.12.2017

Dokumente eingegangen am 16.01.2018, begutachtet im 'expedited Review' am 25.01.2018

✓ Antragsformular ECS Unterschriftenseiten	21.12.2017
✓ Informed Consent Form 1.1	15.01.2018
✓ Letter of Authorization	22.12.2017

Dokumente eingegangen am 20.12.2018 (in der nächsten Begutachtung mitbegutachtet)

✓ Zwischenbericht	20.12.2018
-------------------	------------

Dokumente eingegangen am 02.01.2019, begutachtet im 'expedited Review' am 11.01.2019

✓ Informed Consent Form 2.0	02.01.2019
-----------------------------	------------

Datum Erstvotum: 25.01.2018

Die Ethikkommission geht - rechtlich unverbindlich - davon aus, dass es sich um keine klinische Prüfung nach AMG bzw. MPG handelt.

Es handelt sich um eine Studie im Rahmen einer Diplomarbeit.

Das Votum der Ethikkommission berührt in keiner Weise die alleinige Verantwortung der Prüferin / des Prüfers / der Prüfer für die ordnungsgemäße Durchführung der Studie unter Einhaltung aller einschlägiger gesetzlicher Bestimmungen und Richtlinien.

Weiters machen wir darauf aufmerksam, dass der Kommission unverzüglich zu melden sind:

- Abweichungen vom Protokoll aus Sicherheitsgründen oder Protokolländerungen
- Änderungen, die das Risiko der Teilnehmer/-innen erhöhen oder die Durchführung der Studie wesentlich beeinflussen
- Mutmaßliche unerwartete schwerwiegende Nebenwirkungen - SUSARs (AMG-Studien ab 1.5.2004) oder schwerwiegende unerwünschte Ereignisse - SAEs (andere Studien)
- Jegliche Information über sonstige Umstände, die die Sicherheit der Teilnehmer/-innen oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen können

Graz, 11. Jänner 2019



Univ.Prof.DI Dr.Josef Haas
Vorsitzender



Univ.Prof.Dr.Hans Dimai
Stv. Vorsitzender

Achtung: Bitte bei allen das Projekt betreffende Schreiben oder telefonischen Anfragen die EK-Nummer angeben!