Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) Universitätsklinikum Düsseldorf Direktor: Dr. med. Johannes Fischer

Vergleichende Metabolisierung und Effizienz der 5-Aminolävulinsäure basierten Photodynamischen Therapie in Tumorstammzellen des Glioblastoma multiforme

Dissertation

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

> vorgelegt von Adrian Schimanski

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Gez.: Dekan: Univ.-Prof. Dr. Klöcker Erstgutachter: PD Dr. Sorg Zweitgutachter: PD Dr. Cornelius

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogenous 5-aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment. Schimanski A, Ebbert L, Sabel MC, Finocchiaro G, Lamszus K, Ewelt C, Etminan N, Fischer JC, Sorg RV Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 163 (2016) 203-210

Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste maligne hirneigene Tumor des erwachsenen Menschen. Trotz eines multimodalen Therapieansatzes aus Tumorresektion, Radio- und Chemotherapie erleiden die meisten Patienten Rezidive und die Prognose ist infaust. Glioblastoma Stem-Like Cells (GSC), welche Resistenzen gegenüber zahlreichen etablierten Therapiekonzepten zeigen, werden als treibende Kraft für das Wiederauftreten der Erkrankung gesehen. Deshalb hängt die Wirksamkeit einer Therapie insbesondere vom Ansprechen der GSC auf diese ab. Die 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) basierte Photodynamische Therapie (PDT) ist ein neues Therapiekonzept in der Behandlung des GBM. Nach oraler Gabe von 5-ALA, einem natürlichen Zwischenprodukt der Häm-Biosynthese, kommt es im Gehirn in den Zellen des GBM zu einer selektiven Anreicherung von Protoporphyrin IX (PPIX), einem potenten Photosensibilisator. Dieser kann durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 635 nm angeregt werden, wodurch eine photochemische Reaktion auslöst wird, die zur Bildung von Singulett-Sauerstoff und weiterer reaktiver Sauerstoffspezies führt, welche für die Zellen toxisch sind. Ob GSC PPIX anreichern und sensitiv gegenüber einer 5-ALA/PDT sind, ist bisher unbekannt. Humane GSC, welche aus Primärtumoren gewonnen worden waren, wurden als Neurosphären unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Die Anreicherung von PPIX in GSC nach Inkubation mit verschieden 5-ALA Konzentrationen wurde zu verschieden Zeitpunkten durchflusszytometrisch gemessen. Die Vitalität der GSC nach 5-ALA Inkubation und anschließender PDT wurde mittels des WST-1-Tests überprüft. GSC zeigten nach Behandlung mit 5-ALA eine dosis- und zeitabhängige Anreicherung von PPIX, die zwischen den einzelnen GSC-Präparationen variierte. Eine anschließende Bestrahlung mit Laserlicht einer Wellenlänge von 635 nm resultierte in einer signifikanten Reduktion der Vitalität der Zellen, wogegen eine alleinige Behandlung mit 5-ALA oder Laserlicht keinen Effekt hatte. Die mittleren letalen Dosen unterschieden sich zwischen den einzelnen GSC-Präparationen und waren negativ mit der PPIX-Anreicherung korreliert. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass GSC in vitro nach Behandlung mit 5-ALA PPIX anreichern und sensitiv auf eine anschließende PDT reagieren.

Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most frequent lethal primary brain tumor in adults. Despite multimodal therapy, combining resection, radio- and chemotherapy, most patients develop disease recurrence, and prognosis of patients is poor. Glioblastoma stem-like cells (GSC) appear to be resistant to the established therapies and are suspected to be the driving force for disease recurrence. Thus, efficacy of a therapy depends particularly on targeting GSC. 5-aminolaevulinic acid (5-ALA) mediated photodynamic therapy (PDT) is a new therapeutic approach in GBM. After oral application of 5-ALA, a natural precursor of heme biosynthesis, the photosensitizer protoporphyrin IX (PPIX) selectively accumulates in GBM cells in the brain. PPIX can be excited when exposed to laser light of 635 nm wavelength, which initiates a photochemical reaction that results in the generation of singlet oxygen and other reactive oxygen species, which are toxic for the cells. Whether GSC accumulate PPIX and are sensitive to 5-ALA/PDT is currently unknown. Human GSC, that were derived from primary tumors, were grown as neurospheres under serum free conditions. Accumulation of PPIX in GSC after incubation with different doses 5-ALA was detected by flow cytometry. GSC viability after 5-ALA incubation followed by PDT was measured with the WST-1 test. GSC showed a dose- and time-dependent accumulation of PPIX, which varied between individual GSC preparations. Subsequent exposure to laser light of 635 nm wavelength resulted in a significant reduction of viability of the cells, whereas treatment with 5-ALA or exposure to laser light only had no effect. Mean lethal doses differed between GSC preparations and were negatively correlated with PPIX accumulation. In summary, it has been shown that GSC accumulate PPIX when subjected to 5-ALA and are sensitive to a subsequent PDT in vitro.

Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
5-ALA/PDT	5-Aminolävulinsäure basierte Photodynamische Therapie
ABCB6	Adenosine Triphosphate Binding Cassette Sub-family B Member 6
ABCG2	Adenosine Triphosphate Binding Cassette Sub-family G Member 2
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
bcl-2	B-cell lymphoma 2
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
СТ	Computertomographie
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FLAIR	Fluid Attenuation Inversion Recovery
GBM	Glioblastoma multiforme
GSC	Glioblastoma Multiforme Stem-Like Cell(s)
HIF2a	Hypoxia Inducible Factor 2α
IDH1	Isocitrat-Dehydrogenase 1
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
MRT	Magnetresonanztomographie
PDT	Photodynamische Therapie
PEPT1	Peptidtransporter 1
PEPT2	Peptidtransporter 2
ΡΡΙΧ	Protoporphyrin IX
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog

SOD	Superoxiddismutase
SOX2	Sex Determining Region Y-box 2
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
wно	Weltgesundheitsorganisation

Die Standardeinheiten des SI-Systems sind nicht aufgeführt. Fremdsprachliche Begriffe sind kursiv dargestellt

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Pathologie des Glioblastoma multiforme	1
1.2	Klinik des Glioblastoma multiforme	2
1.3	Therapie des Glioblastoma multiforme	3
1.4	Tumorstammzellen des Glioblastoma multiforme	4
1.5	5-Aminolävulinsäure basierte Photodynamische Therapie	8
1.6	Klinische Anwendung der 5-Aminolävulinsäure basierten Photodynamischen Therapie	11
2	ZIELE DER ARBEIT	13
3	ORIGINALARBEITEN	14
3.1	Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogeno 5-aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment. Schimanski A, Ebbert L, Sabel MC, Finocchiaro G, Lamszus K, Ewelt C, Etminan N, Fischer JC, Sorg RV Journal o Photochemistry & Photobiology, B: Biology 163 (2016) 203-210	us f 15
4	DISKUSSION	23
4.1	Tumorstammzellen des Glioblastoma multiforme – ein Problem in der Therapie?	23
4.2	Protoporphyrin IX Akkumulation in <i>Glioblastoma Stem-Like Cells</i> nach Inkubation mit 5- Aminolävulinsäure	24
4.3	<i>Glioblastoma Stem-Like Cells</i> sind sensitive für eine 5-Aminolävulinsäure basierte Photodynamische Therapie	26
4.4	Ausblick und mögliche limitierende Aspekte einer Photodynamischen Therapie	28
4.5	Schlussfolgerung	30
5.	LITERATURVERZEICHNIS	31
6.	DANKSAGUNG	48

1 Einleitung

1.1 Pathologie des Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme (GBM) zählt unter den hirneigenen Tumoren Erwachsener mit einem Anteil von ca. 70 % zum häufigsten malignen Tumor [1]. Trotz der Häufigkeit als Hirntumor ist die Gesamtinzidenz hirneigener Tumoren, mit 3.200 Frauen und 4.000 Männern, die im Jahr 2012 in Deutschland neu erkrankt sind, im Vergleich zu der Gesamtinzidenz maligner Tumorerkrankungen anderer Organsysteme mit einem Anteil von 1,6 % gering [2]. Das mediane Manifestationsalter des GBM beträgt 64 Jahre [1]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat Tumoren des zentralen Nervensystems nach histologischen und molekularbiologischen Kriterien in verschiedene Malignitätsgrade von I-IV eingeteilt. Nach dieser Einteilung wird das GBM als Grad IV Gliom astrozytären Ursprungs definiert [3-5]. Von einem primären GBM, das ausgehend von niedriggradigen Gliomen entsteht. Das in ca. 5-10 % der Fälle auftretende sekundäre GBM betrifft mit einem mittleren Erkrankungsalter von ca. 44 Jahren hauptsächlich jüngere Patienten [5, 6].

Der Namenszusatz "multiforme" spiegelt das histologische Bild wider, welches durch Arbeiten von HJ Scherer im frühen 20. Jahrhundert intensiv beschrieben wurde [7]. Das GBM wächst stark infiltrativ, stellenweise nekrotisch und hämorrhagisch und zeigt eine makroskopische, mikroskopische und genetische Heterogenität [7, 8]. Makroskopisch zeigt sich typischerweise ein zentrales Nekroseareal mit zelldichtem Rand und umgebender Infiltrationszone [7, 9]. Die makroskopisch relativ scharfe Abgrenzung zum umgebenden Gewebe stellt sich histologisch jedoch komplexer dar. Die Invasion des umgebenden Gewebes erfolgt entlang myelinisierter Axone und Blutgefäße bei nur minimaler Destruktion des umgebenden Gewebes [7, 9, 10]. Aufgrund der hohen Affinität zu myelinisierten Faserbahnen kommt es über die Kommissuren auch zur Ausdehnung auf beide Hemisphären [9, 11, 12], wodurch das Bild eines "Schmetterlings-Glioblastom" entstehen kann, welches mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [13]. Molekularbiologisch können das primäre und sekundäre GBM voneinander unterschieden werden. Neben genetischen Veränderungen, die in primären und sekundären GBM vorkommen, gibt es für beide Formen charakteristische Veränderungen: Typisch für das primäre GBM ist eine Überexpression des Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR), eine Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) Mutation sowie ein vollständiger Verlust des Chromosoms 10 [14-16]. In sekundären GBM lässt sich gehäuft ein Verlust der Heterozygotie des langen Arms des Chromosoms 19 nachweisen [17]. Eine Mutation des Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1) Gens findet sich in einem Großteil (88 %) der sekundären GBM, jedoch kaum in primären GBM, und ist somit charakteristisch für das sekundäre GBM [18]. In einer Mitte 2016 erschienenen WHO-Klassifikation wird das GBM entsprechend anhand des Vorhandenseins von IDH Mutationen in diese zwei Untergruppen unterteilt, die der älteren Unterteilung in primäres und sekundäres GBM entspricht [5]. Zwischen primärem und sekundärem GBM zeigt sich auch ein Unterschied in der Verteilung. Das primäre GBM zeigt kein gehäuftes Auftreten in speziellen Hirnarealen, wogegen das sekundäre, IDH1 mutierte GBM eine Häufung im Frontallappen um das Vorderhorn des Seitenventrikels zeigt [19].

1.2 Klinik des Glioblastoma multiforme

Klinisch auffällig wird das GBM durch unterschiedliche Symptome. Hauptsächlich handelt es sich hierbei um zunehmende neurologische und motorische Defizite, Kopfschmerzen, Krampfanfälle oder Persönlichkeitsstörungen [20].

Häufig wird die Diagnose eines Hirntumors erst einige Zeit nach dem Auftreten der oft unspezifischen Symptome gestellt [20]. Zur weiteren Diagnostik wird zum Ausschluss eines intrakraniellen Tumors eine Schichtbildgebung mittels Computertomographie (CT) oder der höher sensitiven Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt. Daneben besteht die Möglichkeit, dass es sich bei einem GBM um einen Zufallsbefund im CT oder MRT handelt.

Goldstandard in der Diagnostik des GBM ist das MRT mit Gadolinium als Kontrastmittel. Hierbei zeigt sich typischerweise eine zentrale Nekrose mit peripheren, ringförmig Kontrastmittel anreichernden Läsionen. In der *Fluid Attenuation Inversion* *Recovery* (FLAIR) Darstellung zeigt sich ein das GBM umgebendes meist ausgeprägtes perifokales Ödem [20].

1.3 Therapie des Glioblastoma multiforme

Ohne Therapie hat das GBM mit einer mittleren Überlebenszeit nach Diagnosestellung von 2-3 Monaten eine sehr schlechte Prognose [21]. Das aktuelle multimodale Therapiekonzept, welches für primäre und sekundäre GBM gleich ist, besteht aus drei Säulen [22]: Der maximal möglichen zytoreduktiven Operation [23], der adjuvanten Strahlentherapie und der adjuvanten Chemotherapie [22]. Die Chemotherapie erfolgt hierbei mit dem alkylierenden Zytostatikum Temozolomid [22]. Die Kombination wird nach dem Entwickler des Behandlungskonzepts als "Stupp-Schema" bezeichnet [22]. Die Problematik besteht hierbei darin, dass aufgrund des zuvor erwähnten invasiven Wachstums des GBM, nicht alle Tumorzellen operativ entfernt werden können, wichtige Hirnareale zum Erhalt der Lebensqualität geschont werden sollten und das radiologisch dargestellte GBM schwierig von umgebenden, nicht veränderten Hirnarealen zu unterscheiden ist und somit kaum vollständig operativ zu entfernen ist [24].

Trotz intensiver Therapie ist das mediane Überleben der Patienten mit 14,6 Monaten sehr gering. Die meisten Patienten erleiden ein Rezidiv und versterben im Median 6,2 Monate nach dem Auftreten des Rezidivs [22, 25]. Aufgrund von verbesserten Therapieoptionen konnte das mediane Überleben verlängert werden, jedoch hat sich das Langzeitüberleben nur wenig verbessert und bleibt mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 10 % minimal [21, 24]. Als ein Grund für die sehr schlechte Langzeitprognose des GBM werden die nach operativer Resektion im umgebenden Hirngewebe verbleibenden Tumorstammzellen des Glioblastoma multiforme angeführt, die trotz adjuvanter Therapie schlecht zu kontrollieren sind und als Ursache für das Auftreten von Rezidiven angesehen werden [26].

In der Rezidivbehandlung des GBM haben neben der chirurgischen Versorgung [27, 28] mit möglicher adjuvanter Strahlentherapie [29] sowie einer Chemotherapie mit Temozolomid [30] weitere Therapien einen Stellenwert. Bevacizumab, ein *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) Rezeptor Antikörper [31], wird alleine oder in

Kombination mit dem Topoisomerase I Hemmstoff Irinotecan bereits in der Rezidivbehandlung eingesetzt [31, 32]. In modernen Therapiekonzepten gewinnen Immuntherapien [33, 34] und Photodynamische Therapien [35, 36] zunehmend an Bedeutung.

Interessanterweise zeigen Patienten, die an einem GBM mit einer IDH1 Mutation [18] erkrankt sind und mit der zuvor beschriebenen Standardtherapie behandelt wurden, eine, mit im Median 3,8 Jahren, deutlich längere Überlebenszeit als Patienten ohne IDH1 Mutation, die im Median 1,1 Jahr überleben [37].

1.4 Tumorstammzellen des Glioblastoma multiforme

Das Konzept der Tumorstammzelle geht auf eine Beobachtung aus dem Jahre 1994 zurück, dass ein Teil der Zellen einer akuten myeloischen Leukämie fähig ist, sich selbst zu erneuern und nach Xenotransplantation in immundefiziente Mäuse eine identische Leukämie initiieren kann [38]. Später konnten Zellen mit diesen Eigenschaften in verschieden weiteren Krebserkrankungen nachgewiesen werden, unter anderem in Brustkrebs, Kolonkarzinom, Prostatakarzinom und dem GBM [39-42]. Die daraus abgeleitete Tumorstammzellhypothese beschreibt, dass die Organisation des Tumors einem hierarchischen Modell folgt, an dessen Spitze die Tumorstammzelle steht. Diese Zelle ist befähigt zu proliferieren und sich dabei entweder selbst zu erhalten oder mehr differenzierte Zellen hervorzubringen, die die Hauptmasse des Tumors ausmachen. Die Differenzierung der Tumorstammzelle reduziert dabei ihre Fähigkeit der Selbsterneuerung, welche charakteristisch für Stammzellen ist [26, 43]. Sie verliert mit der Differenzierung somit ihre Stammzell-ähnlichen Eigenschaften, darunter auch ihr Vermögen, Tumoren zu bilden. Daher nimmt die Tumorstammzelle eine für die Entstehung, den Erhalt des Wachstums und die Invasivität des Tumors außerordentliche Rolle ein [26, 44]. Hieraus konnte abgeleitet werden, dass es sich bei Tumoren nicht um eine homogene Tumormasse handelt, sondern nur ein Teil der Zellen für Wachstum, Infiltration, Migration und Differenzierung verantwortlich ist [45].

Bereits vor über 10 Jahren konnten Ignatova et al. [46] zeigen, dass sich in Glioblastomen Zellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften nachweisen und daraus

isolieren lassen, sogenannte *Glioblastoma Stem-Like Cells* (GSC). Diese Beobachtung konnte in den darauf folgenden Jahren von Singh et al. durch einen *Xenograft Assay* bestätigt und erweitert werden [42, 47]. Sie zeigten, dass die GSC nach Xenotransplantation in immundefiziente Mäuse die einzigen tumorigenen Zellen im Tumor sind.

Der Ursprung der GSC ist noch unklar. Viele Marker, die für neuronale Stammzellen typisch sind, sind jedoch auch in GSC nachweisbar. Der erste Marker, der hierbei zur Isolation und Charakterisierung herangezogen wurde, ist die selektive Expression des Moleküls CD133 auf der Zelloberfläche von GSC [47, 48]. Die Transkription von Sex Determining Region Y-box 2 (SOX2) [49], einem Transkriptionsfaktor, der mit dem Erhalt der Multipotenz von Stammzellen assoziiert ist [26, 50, 51], ist zudem mit GSC assoziiert. Neben diesen beiden Markern gibt es eine Vielzahl weiterer Marker, die jedoch einzeln nicht zu einer Identifikation von GSC herangezogen werden können [26]. Das von den GSC getragene Tumorwachstum wird unter anderem der verstärkten Expression von VEGF zugesprochen [52, 53]. VEGF ist ein membrangebundenes oder von der Zelle sezerniertes Protein, welches an einen, von Gefäßendothelzellen exprimierten, Rezeptor bindet und als Proliferationssignal die Gefäßneubildung stimuliert [54]. Das perifokale Ödem, welches besonders in der FLAIR Darstellung im MRT sichtbar wird, wird unter anderem durch eine VEGF vermittelte Gefäßneubildung verursacht. Die neu gebildeten Gefäße verursachen eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn Schranke, was zu einem zunehmenden Hirnödem führt [55-57].

GSC können *in vitro* als Neurosphären aus frisch resezierten Tumorpräparaten durch Kultivierung angereichert werden. Der Grundstein hierfür wurde 1992 von Reynolds und Weiss gelegt, die mit Hilfe von Neurosphärenkulturen aus Gehirnen adulter Mäuse neuronale Stammzellen anreichern konnten [58]. Die Kultivierung der Zellen erfolgt unter serumfreien Bedingungen unter der Zugabe der Wachstumsfaktoren *Epidermal Growth Factor* (EGF) und *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). Unter serumfreien Kulturbedingungen sterben die meisten der Zellen. Nur diejenigen Zellen, welche auf die, auf Stammzellpopulationen mitogen wirkenden, Wachstumsfaktoren ansprechen, überleben und bilden nicht-adhärente im Medium schwimmende Cluster, sogenannte Neurosphären (Abb. 1). Während der Kultivierung werden die Neurosphären mittels mechanischer Dissoziation immer wieder voneinander getrennt und erneut unter den gleichen Bedingungen weiter kultiviert, wodurch sich neue Neurosphären bilden. Dieses Verfahren führt zum Erhalt der Zellpopulation mit stammzell-ähnlichen Eigenschaften. Es wird nicht nur zur Isolation von neuronalen Stammzellen herangezogen, sondern auch zur Isolation von Tumorstammzellen des GBM [59, 60].



Abb. 1: Neurosphären der GSC-Linie GS3 nach 96-stündiger Kultivierung. Ein Größenbalken ist angezeigt.

1.5 Tumorstammzellen in der Therapie des Glioblastoma multiforme

Aufgrund des von den GSC getragenen Tumorwachstums begründet sich die Annahme, dass die Effektivität der anti-tumorösen Behandlung von der Sensitivität der GSC gegenüber der Therapie abhängen könnte [44, 45]. In mehreren Studien wurden für diese Zellen Resistenzen gegenüber der Standardtherapie mit dem alkylierenden Zytostatikum Temozolomid gefunden [61], die auf verschiedenen Mechanismen beruhen [62, 63]. Da Temozolomid das einzige Chemotherapeutikum mit nachgewiesener Wirkung in der Behandlung des GBM ist [22] und aufgrund seiner guten Verträglichkeit sowie oralen Verfügbarkeit zur Langzeitbehandlung eingesetzt werden kann [64], ist dies äußerst kritisch zu sehen. Zudem zeigen GSC auch Resistenzen gegenüber der zweiten Säule der adjuvanten Therapie [25], der postoperativen Radiotherapie [65-67].



Abb. 2: Bedeutung von *Glioblastoma Stem-Like Cells* (GSC) und nicht-GSC in der Therapie des Glioblastoma multiforme. Die Behandlung beider Zellpopulationen ist entscheidend. Werden GSC durch die Therapie nicht abgetötet, können sie Ausgangspunkt für die Rezidivierung sein. Unter bestimmten Umständen kann es zu einer Konversion von nicht-GSC zu GSC kommen, die zur Rezidivierung führen, weshalb auch die nicht-GSC abgetötet werden müssen. Angelehnt an Cheng et al. [68]

Eine effektive Therapie des GBM muss auf die Behandlung von GSC sowie nicht-GSC abzielen, um eine Remission des GBM bewirken zu können [68]. Eine alleinige Abtötung von nicht-GSC, beziehungsweise Resistenzen der GSC Population [62, 63, 65, 66], führen aufgrund verbleibender GSC mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Rezidivbildung [69]. Auch die alleinige Abtötung der GSC scheint zur Behandlung des GBM jedoch nicht ausreichend zu sein, da die Möglichkeit einer Konversion von nicht-GSC zu GSC besteht, die dann zur Rezidivierung führen können (Abb. 2) [68, 70, 71]. So konnte gezeigt werden, dass in einer hypoxischen Mikroumgebung eine vermehrte

Expression von *Hypoxia Inducible Factor 2* α (HIF2 α) stattfindet, die *in vitro* zu einer Konversion von nicht-GSC zu GSC führt [71-73].

Mit den bisherigen Therapiemethoden können nicht-GSC und GSC nicht effektiv gemeinsam behandelt werden [26, 74], wodurch sich das Auftreten von Rezidiven und die, in den letzten 30 Jahren kaum verbesserte, sehr schlechte Langzeitprognose von Glioblastompatienten erklären lässt [24]. Ein primäres Ziel der GBM Forschung ist daher die Suche nach einem Therapieansatz, mit welchem nicht-GSC und GSC gleichermaßen behandelt werden können. Neben der Inhibition der Neoangiogenese [31], der Immuntherapie [75], der Behandlung mit Nanopartikeln [76] und der Modifizierung der Chemotherapeutikaaufnahme durch das GBM mittels fokussierten Ultraschalls [77], ist die Photodynamische Therapie (PDT) ein im Fokus der Forschung stehender Therapieansatz.

1.5 5-Aminolävulinsäure basierte Photodynamische Therapie

Die Historie der Phototherapie reicht bis in die Antike zurück (zusammengefasst in [78]). Die Grundlage für die moderne PDT geht auf die Beobachtung von Oscar Raab zurück, dass die Behandlung von Infusorien mit einer Kombination von Licht und fluoreszierenden Stoffen Zelltod induziert [78, 79]. In den 1960er Jahren gelang Richard Lipson der Nachweis einer selektiven Akkumulation von Porphyrinen in Tumoren [80], was für die Etablierung der modernen PDT von entscheidender Bedeutung war. Mit einer effektiven PDT in einem Mausmodell gelang 1972 der Schritt zur experimentell therapeutischen Anwendung beim GBM [78, 81].

Mittlerweile ist die 5-Aminolävulinsäure basierte PDT (5-ALA/PDT) eine für multiple Tumorerkrankungen zugelassene Therapie, unter anderem für Hauttumoren, Kopfund Halstumoren und Tumoren des Gastrointestinaltraktes. Eine Zulassung besteht zusätzlich für die intraoperative Photodiagnostik weiterer Tumoren, unter anderem des GBM [78], für das auch die 5-ALA/PDT einen zunehmend an Bedeutung gewinnenden Therapieansatz darstellt.



Abb. 3: Häm-Biosyntheseweg und die Rolle der 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) in der Protoporphyrin IX (PPIX) Synthese. Nach oraler Gabe wird 5-ALA von Zellen über PEPT1 oder PEPT2 Transporter aufgenommen und im Zytosol der Zelle in 4 Schritten zu Coproporphyrinogen III metabolisiert. Endogen kann 5-ALA durch die ALA-Synthase im Mitochondrium gebildet werden. Coproporphyrinogen III wird über den ABCB6 Transporter in den Intermembranraum des Mitochondriums transportiert, wo in weiteren enzymatischen Schritten PPIX synthetisiert wird. Angelehnt an Teng et al. [82].

5-Aminolävulinsäure (5-ALA) ist ein physiologisches Zwischenprodukt der Häm-Biosynthese. Nach oraler Gabe von 5-ALA, welches die im GBM gestörte Blut-Hirn-Schranke überwinden kann [83], kommt es über die Peptidtransporter 1 oder 2 (PEPT1 oder PEPT2) zur Aufnahme in das Zytosol der Zellen [84]. Über 4 enzymatische Schritte wird 5-ALA zu Coproporphyrinogen III metabolisiert und über den Adenosine Triphosphate Binding Cassette Subfamily B Member 6 (ABCB6)-Transporter in den Intermembranraum der Mitochondrien transportiert [82, 85]. Dort wird es über weitere metabolische Schritte zu PPIX umgesetzt, welches in der Mitochondrienmatrix durch die Ferrochelatase Häm umgewandelt wird. zu Die genauen Transportmechanismen über die Mitochondrienmembranen sind bisher nicht vollständig geklärt [82, 86]. Ein möglicher Efflux von PPIX in den Extrazellularraum erfolgt über den Adenosine Triphosphate Binding Cassette Subfamily G Member 2 (ABCG2) Transporter (Abb. 3) [82, 87-90].

In Zellen verschiedener Tumoren reichert sich nach Inkubation mit 5-ALA PPIX selektiv an [91-93], wozu neben einer reduzierten Ferrochelataseaktivität [94, 95] eine veränderte Expression der ABCG2 und ABCB6 Transporter beitragen kann [86, 96]. Letztlich ist der Prozess im Ganzen jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. PPIX ist ein potenter Photosensibilisator, der bei Bestrahlung mit Licht in eine photochemische Reaktion eingehen kann [97]. Bei Bestrahlung mit Licht nahe 400 oder 635 nm Wellenlänge kommt es durch Absorption der Energie der Photonen zur Anregung des PPIX von seinem Grundzustand zum energetisch angeregteren Singulett-Zustand [98]. Bei einer Bestrahlung mit Licht nahe 400 nm Wellenlänge führt dies zu einer Emission von Photonen und der Rückkehr von PPIX in den Grundzustand [98], was photodiagnostisch ausnutzt werden kann. Bei einer Wellenlänge um 635 nm führt die Bestrahlung nicht nur zu einer Anregung des PPIX zum höher energetischen Singulett-Zustand, sondern auch zu einem Übergang vom Singulett- in den Triplett-Zustand. Bei intrazellulär vorliegendem, niedrig energetischem Sauerstoff entstehen durch den Transfer von Protonen oder Elektronen vom angeregten PPIX zum Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies (Typ I Reaktion) oder durch einen direkten Energietransfer Singulett-Sauerstoff (Typ II Reaktion) [98, 99]. Diese sehr kurzlebigen Verbindungen [100] oxidieren in ihrer Umgebung befindliche DNA [101], Proteine [102] und Lipide [103, 104]. Dies führt über verschiedene Wege zu hauptsächlich apoptotischem Zelltod [105]. Die direkte Schädigung des B-cell lymphoma 2 (bcl-2) Proteins und die Peroxidation von Cardiolipin in der Mitochondrienmembran [106-109] bewirken eine Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C, Apoptosis-Inducing Factor (AIF) und anderen proapoptotischen Molekülen [105, 110, 111]. Neben diesem mitochondrialen Weg der Apoptoseinitiierung kann Stress des endoplasmatischen Retikulums oder die Freisetzung lysosomaler Enzyme nach photochemischer Schädigung ebenfalls Apoptose initiieren [105, 112]. In Abhängigkeit vom Ausmaß der oxidativen Schädigung und der intrazellulären Lokalisation des PPIX kann zudem ein nekrotischer Zelltod oder Autophagie resultieren [105].

1.6 Klinische Anwendung der 5-Aminolävulinsäure basierten Photodynamischen Therapie

Die Emission von Photonen nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge um 400 nm wird bereits photodiagnostisch beim GBM im Rahmen einer fluoreszenzgeführten Resektion genutzt. Die orale Gabe von 5-ALA unmittelbar vor der Tumorresektion führt zu einer selektiven Akkumulation von PPIX im GBM Gewebe. Wird dieses intraoperativ mit Licht der Wellenlänge von 400 nm bestrahlt, fluoresziert hierdurch der Tumor, was eine verbesserte Diskrimination zwischen PPIX anreicherndem Tumorgewebe und dem umgebenden, gesunden nicht PPIX anreicherndem Gewebe erlaubt. Dadurch ist eine eindeutige intraoperative Identifizierung des Tumors möglich. Folglich nimmt die Effektivität der operativen Resektion des GBM zu, was zu einer Verbesserung der 6monatigen progressionsfreien Überlebensrate der Patienten führt [113, 114].

Im Gegensatz hierzu zielt die bei der Photodynamischen Therapie durchgeführte Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 635 nm darauf ab, die Tumorzellen selektiv abzutöten. Mehrere Studien konnten bereits eine Verbesserung des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens durch eine 5-ALA und Photofrin basierte fluoreszensgeführte Resektion und Photodynamische Therapie bei neu diagnostiziertem GBM und Rezidiv des GBM nachweisen, wenn diese zusätzlich zur Standardtherapie erfolgten [36, 115, 116]. Auch bei nicht operablen Rezidiven des GBM zeigen einzelne Fallstudien eine lang anhaltende Wirksamkeit einer interstitiellen 5-ALA/PDT [35, 117]. Für eine abschließende Beurteilung der Wirksamkeit dieser Therapie sind die Fallzahlen jedoch noch zu gering.

Neben der direkten Schädigung der Tumorzellen hat die PDT auch einen Einfluss auf das Gefäß- und Immunsystem [118, 119]. Für den Einsatz verschiedener Photosensibilisatoren wurde eine Erhöhung der VEGF Expression nach PDT bei verschiedenen Tumoren beobachtet [120-122], darunter auch in einem Rattenmodell mit intrakraniellem GBM Xenograft, in dem Photofrin als Photosensibilisator verwendet wurde [123]. Zudem wurde für die Photofrin basierter PDT die Induktion von Gefäßneubildungen im Rattengehirn beschrieben [124]. Solche Effekte sind kritisch zu bewerten, da VEGF von herausragender Bedeutung für die Gefäßneubildung

in Tumoren ist [125]. In Verbindung mit einer 5-ALA/PDT konnte eine Änderung der VEGF Expression bisher nicht nachgewiesen werden [126].

Die Photodynamische Therapie besitzt nur eine geringe Eindringtiefe von wenigen mm. Deshalb ist es für ihre Wirksamkeit vermutlich entscheidend, dass es neben der direkten Phototoxizität auch eine immunologische Komponente gibt, die zu ihrer Wirksamkeit beiträgt [35, 119, 127]. Für die 5-ALA/PDT von GBM Zellen *in vitro* wurde berichtet, dass sie zu einer Aktivierung Dendritischer Zellen führt, d.h. den initialen Schritt einer adaptiven Immunantwort einleitet [128].

Die Effekte der Photodynamischen Therapie in verschieden Tumoren sind gut untersucht. Jedoch sind die Wirkungen auf Subpopulationen der Tumoren, insbesondere auf Tumorstammzellen, zu großen Teilen unbekannt. In einer Arbeit von Barth et al. zeigten sich Leukämiestammzellen sensitiv auf eine *Indocyanine Green* basierte PDT [129]. Für Tumorstammzellen von Kopf- und Halstumoren konnte durch eine 5-ALA/PDT eine Reduktion der Invasivität nachgewiesen werden [130]. Für das GBM liegen bisher keine Ergebnisse zur Sensitivität und Effektivität einer PDT an GSC vor.

2 Ziele der Arbeit

Die vollständige Resektion des Glioblastoma multiforme ohne verbleibende Zellen im Tumorbett ist aufgrund des stark infiltrativen Wachstums und der nur eingeschränkten Möglichkeit eines radikalen operativen Vorgehens nicht möglich [24]. Bei einem Teil der im umgebenden Hirngewebe verbleibenden Tumorzellen handelt es sich um Tumorstammzellen. Diese werden als Ursache des in nahezu allen Fällen auftretenden Rezidivs und der damit verbundenen schlechten Prognose des Glioblastoma multiforme angeführt [65, 69]. Die 5-Aminolävulinsäure basierte Photodynamische Therapie stellt eine vielversprechende Therapieoption des Glioblastoma multiforme dar [26, 35, 117]. In "Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogenous 5-aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment" [131] wurde untersucht, ob isolierte und als Neurosphären propagierte Glioblastoma Stem-Like Cells nach Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure Protoporphyrin IX anreichern, ob die Anreicherung zeit- und dosisabhängig ist und in wie weit sie die Sensitivität der Glioblastoma Stem-Like Cells für eine anschließende Photodynamische Therapie vermittelt. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die Auswirkungen einer 5-Aminolävulinsäure basierten Photodynamischen Therapie auf Glioblastoma Stem-Like Cells bisher unbekannt waren, aber mit entscheidend dafür sind, ob dieser Therapieansatz eine langanhaltende Wirksamkeit besitzt.

3 Originalarbeiten

3.1 Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogenous 5-aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment. Schimanski A, Ebbert L, Sabel MC, Finocchiaro G, Lamszus K, Ewelt C, Etminan N, Fischer JC, Sorg RV Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 163 (2016) 203-210

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 163 (2016) 203-210



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

iournal homepage: www.elsevier.com/locate/iphotobiol

Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogenous 5-aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment



Adrian Schimanski^a, Lara Ebbert^a, Michael C. Sabel^b, Gaetano Finocchiaro^c, Katrin Lamszus^d, Christian Ewelt^e, Nima Etminan^{b,1}, Johannes C. Fischer^a, Rüdiger V. Sorg^{a,*}

^a Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Heinrich-Heine University Hospital Düsseldorf, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany

Department of Neurosurgery, Heinrich-Heine University Hospital Düsseldorf, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany Department of Neuro-Oncology, Fondazione IRCCS, Istituto Neurologico Carlo Besta, Via Giovanni Celoria 11, 20133 Milano, Italy

Department of Neurosurgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, German Department of Neurosurgery, University Hospital Münster, Albert-Schweitzer-Campus 1, 48149 Münster, Germany

ARTICLE INFO

Article history: Received 5 July 2016 Accepted 25 August 2016 Available online 27 August 2016

Keywords: Glioblastoma Glioblastoma stem-like cells Cancer stem cells 5-aminolaevulinic acid Protoporphyrin IX Photodynamic therapy

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and lethal primary brain tumor in adults. Despite multimodal therapy combining resection, radio- and alkylating chemotherapy, disease recurrence is universal and prognosis of patients is poor, Glioblastoma stem-like cells (GSC), which can be grown as neurospheres from primary tumors in vitro, appear to be resistant to the established therapies and are suspected to be the driving force for disease recurrence. Thus, efficacy of emerging therapies may depend on targeting GSC. 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy (5-ALA/PDT) is a promising therapeutic approach in GBM. It utilizes the selective accumulation of the photosensitizer protoporphyrin IX (PPIX) in GBM cells after application of 5-ALA. When exposed to laser light of 635 nm wavelength, PPIX initiates a photochemical reaction resulting in the generation of reactive oxygen species, which kill the tumor cells. Whether GSC accumulate PPIX and are sensitive to 5-ALA/PDT is currently unknown. Therefore, human GSC were derived from primary tumors and grown as neurospheres under serum free conditions. When subjected to exogenous 5-ALA, a dose- and time-dependent accumulation of PPIX in GSC was observed by flow cytometry, which varied between individual GSC preparations. Subsequent exposure to laser light of 635 nm wavelength substantially killed GSC, whereas treatment with 5-ALA or exposure to laser light only had no effect. LD₅₀ values differed between GSC preparations, but were negatively correlated with PPIX accumulation in GSC. In summary, we report for the first time that glioblastoma stem-like cells accumulate PPIX when subjected to 5-aminolaevulinic acid and are sensitive to 5-aminolaevulinc acid based photodynamic therapy.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) has been classified by the WHO as grade IV glioma of astrocytic linage [1]. It is the most frequent and aggressive malignant primary brain tumor [2]. The current therapeutic standard combining maximal cytoreductive surgery with fractionated radiotherapy and alkylating temozolomide chemotherapy results in a median survival of 14.6 months. Relapse is universal, and after relapse, median survival is 6.2 months [3,4]. Thus, despite this multimodal therapy the overall prognosis is poor, and there is an urgent need for novel treatment options in GBM.

Promising novel therapeutic approaches in GBM are 5aminolaevulinic acid (5-ALA)-based intraoperative photodiagnosis and photodynamic therapy (PDT) [5-8]. In GBM cells, like in several other tumors, exogenous supplementation with 5-ALA, a precursor of the heme biosynthesis pathway, results in protoporphyrin IX (PPIX) accumulation, partially due to low ferrochelatase activity [9,10]. Accumulation of PPIX allows intraoperative identification of the tumor when exposed to light near 400 nm wavelength during fluorescence-guided surgery [8]. Thereby, the extent of resection can safely be increased, providing a survival benefit for the patients [8]. When exposed to light of 635 nm wavelength, however, PPIX acts as a potent photosensitizer for PDT [6,11]. Excitation of PPIX initiates a photochemical reaction

http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.043 1011-1344/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: 5-ALA, 5-aminolaevulinic acid; 5-ALA/PDT, 5-aminolaevulinic acidmediated photodynamic therapy; CSC, cancer stem cell(s); GBM, glioblastoma; GSC, glioblastoma stem-like cell(s); PDT, photodynamic therapy; PPIX, protoporphyrin IX. * Corresponding author at: Institute for Transplantation Diagnostics and Cell

Therapeutics, Heinrich-Heine University Hospital, Moorenstrasse 5, Bldg. 14.88, 40225 Düsseldorf, Germany.

E-mail address: ruediger.sorg@med.uni-duesseldorf.de (R.V. Sorg).

¹ Present address: Department of Neurosurgery, University Hospital Mannheim, Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, 68167 Mannheim, Germany

generating highly reactive oxygen species, particularly singlet oxygen, leading to cell death mainly by apoptosis [12]. Besides this well established direct phototoxicity, there is also an immunological component to the anti-tumoral effect of PDT [13,14]. For glioblastoma cells it has been shown that 5-ALA/PDT not only directly kills the tumor cells, but also initiates the afferent phase of adaptive immune responses leading to attraction and activation of dendritic cells [15] Farly clinical reports suggest that 5-ALA/PDT is feasible, safe and potentially effective in treating GBM [5,7]. Moreover, a randomized phase III study on 27 newly diagnosed GBM patients compared treatment with 5-ALA- and Photofrin-mediated fluorescence-guided surgery and PDT, followed by radiotherapy to treatment of patients with standard resection and radiotherapy only. The authors reported a beneficial effect of the experimental treatment, with mean survival (52.8 \pm 26 weeks vs. 24.2 \pm 11.5 weeks) and time to recurrence (8.6 \pm 4.5 months vs. 4.8 \pm 1.4 months) being significantly increased. [16]. Thus, 5-ALA/PDT represents a promising option in multimodal treatment of GBM.

According to the cancer stem cell (CSC) hypothesis, a small subset of cells within the tumor with stem cell-like characteristics has the ability to self-renew and maintain tumor growth [17]. Efficacy of cancer treatment may, therefore, depend on the sensitivity of CSC to the therapy [18]. Cells with CSC-like characteristics have been isolated from GBM samples [19,20]. They are referred to as glioblastoma stem-like cells (GSC) and can be grown in serum-free medium supplemented with epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) as anchorage-independent neurospheres allowing to maintain the cells with CSC-like characteristics in vitro [21,22]. Since these cells show resistance to temozolomide [23], due to different mechanisms [24,25], they may escape standard treatment of GBM and be the driving force for disease recurrence [26,27].

In order to further evaluate the therapeutic potential of 5-ALA/PDT in GBM, particularly its so far unknown effects on GSC, we have therefore investigated whether GSC, grown as neurospheres, accumulate PPIX when subjected to exogenous 5-ALA and whether the cells are sensitive to 5-ALA/PDT-induced phototoxicity.

2. Material and Methods

2.1. GBM Cells

The human GSC-lines GS3 and GS5 have been isolated from primary glioblastoma samples and characterized by Günther et al. [28]. They show high CD133 expression, grow as neurospheres and are tumorigenic with highly invasive growth upon orthotopic implantation.

BT273, BT275 and BT379 GSC have been obtained from GBM specimens and cultured as neurospheres [20,29]. BT273 and BT275 have been classified as classical and BT379 as of mesenchymal subtype [29] according to genetic profiling established by Verhaak et al. [30].

All GSC were grown as neurospheres in a humidified atmosphere at 5% CO₂ and 37 °C in phenol red-free neurobasal-A medium (GIBCO/ Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Germany) supplemented with 2 mM I-glutamine, 50 µg/ml gentamicin (all from Lonza, Verviers, Belgium), 32 IU/ml heparin (Ratiopharm, Ulm, Germany), 20 µl/ml B27 supplement (Gibco), 20 ng/ml EGF and 20 ng/ml FGF-2 (all from PeproTech, Hamburg, Germany) in tissue culture flasks (Greiner BioOne, Frickenhausen, Germany) according to a modified protocol adapted from Günther et al. [28]. Growth factors and heparin were renewed twice weekly. Neurosphere cultures were split 1:2 by manual dissociation when about 50% of spheres reached a diameter of 250– 400 µm. The use of GSC in this study has been approved by the local ethics committee (study number 4517).

U373 GBM cells were cultured at 37 °C and 5% CO₂ as monolayers in phenol red-free DMEM (GIBCO) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), 50 µg/ml gentamicin and 2 mM L-glutamine in tissue culture flasks. Cells were harvested

with trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Cölbe, Germany) when 80% confluence was reached.

2.2. Flow Cytometric Detection of Protoporphyrin IX Accumulation in GSC and U373 Cells

GS3, GS5, BT273, BT275 and BT379 GSC (obtained from neurospheres by mechanical dissociation) and U373 GBM cells that served as positive control were resuspended at 1×10^5 cells/ml in supplemented neurobasal-A medium and DMEM, respectively. They were incubated with 2, 4, 8, 12.5 or 25 µg/ml 5-ALA (dissolved in water; Merck, Darmstadt, Germany) for 2, 4 or 6 h. After washing with phosphate buffered saline (Lonza), accumulation of PPIX was detected at LP 670/50 nm by flow cytometry on a CyAn flow cytometer (Beckmann-Coulter, Krefeld, Germany) using an excitation wavelength of 405 nm. Samples incubated in the absence of 5-ALA served as negative controls.

2.3. 5-ALA/PDT Treatment of GSC Neurospheres and U373 Cells and Assessment of Viability

GS3, GS5, BT273, BT275 and BT379 GSC (5 \times 10⁴ cells/well), harvested by mechanical dissociation of neurospheres, were plated in 100 $\mu l/$ well supplemented neurobasal-A medium in 96-well flat bottom plates (Greiner BioOne) and cultured for 3–4 days, allowing formation of new neurospheres. U373 cells served as positive controls. They (1.5 \times 10⁴ cells/well) were plated in 100 $\mu l/$ well in supplemented DMEM and cultured for 36 h.

GSC neurospheres and U373 cells were incubated with graded doses of 5-ALA (0–25 µg/ml) for 4 h before being exposed to laser light with an energy of 30 mW/cm² for 625 s using a Ceralas 635-nm PDT diode laser (Biolitec, Jena, Germany) with a defined distance of 9.3 cm between the diffusion lens and the 96-well plate as described [15,31]. After 24 h of additional culture, viability was assessed using the WST-1 kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) according to the instructions of the manufacturer. LD₅₀ was determined using linear regression analysis. Untreated cells, cells treated with 5-ALA only and cells exposed to laser light only served as negative controls.

2.4. Statistical Analysis

Unless stated otherwise, data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) for $n \ge 3$. All data analysis, except correlation analysis, was performed using GraphPad Prism software version 5.01 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Correlation analysis was performed using SPSS Statistics 23 (IBM Corporation, Somers, USA). Statistical tests were considered significant at $p \le 0.05$. For comparison of data, one-way ANOVA, Bonferroni's post-hoc multiple comparison test and the Student's *t*-test were used.

3. Results

3.1. Time- and Dose-Dependent Accumulation of Protoporphyrin IX in Glioblastoma Stem-like Cells

To determine accumulation of PPIX in the GS3, GS5, BT273, BT2775 and BT379 glioblastoma stem-like cells after exogenous supplementation with 5-ALA, neurospheres were dissociated, cells incubated with graded doses of 5-ALA for 2, 4 and 6 h, and PPIX fluorescence was analyzed by flow cytometry. U373 glioblastoma cells served as positive control. Fig. 1 shows representative results of flow cytometry. PPIX mean fluorescence intensity (MFI) of all experiments ($n \ge 3$) is summarized in Fig. 2.

All GSC time- and dose-dependently accumulated PPIX (ANOVA $p \le 0.01$). When PPIX accumulation was compared between the different cells (Fig. 3), it was significantly higher for GS5 (90.1 \pm 9.8, n = 3;





Fig. 1. Detection of protoporphyrin IX accumulation in glioblastoma stem-like cells. GSC neurospheres were dissociated, incubated with 25 µg/ml 5-ALA for 2, 4 or 6 h and PPIX fluorescence (LP 670/50 nm) was determined by flow cytometry using an excitation wavelength of 405 nm (grey histograms). Untreated cells (black histograms) served as negative controls, U373 cells as positive control. Analysis was electronically limited to vital cells as determined by forward scatter vs. side scatter characteristics.



Fig. 2. Dose- and time-dependent accumulation of protoporphyrin IX in glioblastoma stem-like cells. GSC were incubated with 0, 2, 4, 8, 12.5 or 25 μ g/ml 5-ALA for 2 (circles), 4 (squares) or 6 h (triangles), and PPIX mean fluorescence intensity (MFI) of cells was determined by flow cytometry. U373 cells served as positive control. Data represent mean \pm SEM of $n \ge 3$ independent experiments.

p = 0.012)) and significantly lower for GS3 (4.4 \pm 0.3, n = 3; p = 0.010) and BT273 (16.5 \pm 0.7, n = 4; p = 0.021) GSC compared to U373 glioblastoma cells (44.0 \pm 4.0, n = 3). There was no difference for BT275 and BT379 GSC.



Fig. 3. Accumulation of protoporphyrin IX in glioblastoma stem-like cells versus U373 glioblastoma cells. GSC und U373 cells were incubated with 25 µg/ml 5-ALA for 4 h, and PPIX mean fluorescence intensity was determined by flow cytometry. Statistical significance (Student's t-test) compared to U373 cells is indicated; * , $p \le 0.05$.

3.2. Sensitivity of Glioblastoma Stem-like Cell Lines to 5-ALA/PDT

To assess the effect of 5-ALA/PDT treatment on GSC, neurospheres were incubated with graded doses of 5-ALA for 4 h, exposed to laser light and after 24 h of additional cell culture, viability of cells was determined. Untreated cells or cells treated with 5-ALA or laser light only served as negative controls, U373 as positive control.

Treatment with 5-ALA or PDT alone had no significant effect on cell viability. However, 5-ALA/PDT was phototoxic for all cell populations. It resulted in a significant (ANOVA, $p \le 0.0001$) and substantial 5-ALA-dose-dependent reduction of cell viability (Fig. 4). Sensitivity to 5-ALA/PDT differed between the individual cell populations. Estimated LD₅₀ values were 24.1 \pm 1.9, 20.8 \pm 0.3 and 20.4 \pm 1.3 µg/ml 5-ALA for U373, CS3 and BT273 cells, respectively, whereas GS5 (4.0 \pm 0.4 µg/ml; p = 0.0095), BT275 (8.3 \pm 0.2 µg/ml; p = 0.0148) and BT379 (10.1 \pm 0.4 µg/ml; p = 0.0191) revealed significantly higher sensitivity to 5-ALA/PDT. There was a significant negative correlation between PPIX MFI and LD₅₀ values for GSC (Kendall's tau = -0.705, p < 0.01, n = 18), best described in a curve fitting model with an exponential regression ($r^2 = 0.861$, sum of squares = 117.8) (Fig. 5).





Fig. 4. Phototoxic effect of 5-ALA/PDT on glioblastoma stem-like cells. GSC were incubated with graded doses (0–25 µg/ml) of 5-ALA for 4 h and exposed to laser light of 635 nm wavelength. Cells untreated (black bars) or exposed to 5-ALA or laser light alone (grey bars) served as negative controls, U373 cells served as positive control. After 24 h of additional culture, viability of cells was determined with the WST-1 assay. Viability normalized to untreated cells (=100%) is presented as mean \pm SEM of at least 3 independent experiments. Statistically significant differences (Bonferroni's multiple comparison test) compared to untreated controls is indicated; *** $p \le 0.0001$.

4. Discussion

Several groups have demonstrated the presence of cancer stem cells in glioblastoma [19,20,22,32,33]. These glioblastoma stem-like cells are defined by their capacity to self-renew, the potential to differentiate into cells with neuronal, astrocytic or oligodendroglial phenotypes and most importantly, the ability to initiate brain tumor growth [22,26]. Moreover, they may contribute to the formation of blood vessels by promoting angiogenesis, ensuring blood supply to the tumor [34–36]. Thus, therapeutic targeting of GSC appears to be of clinical importance, particularly, because surviving GSC may also be responsible for disease recurrence [26]. However, there are several studies indicating that GSC are resistant to radio- and chemotherapy [23,24,37–40], and Auffinger and colleagues have recently shown that treatment with temozolomide even enriches GSC in GBM cell cultures [27], suggesting that GSC may escape the current standard therapy of GBM consisting of resection, radio- and alkylating temozolomide chemotherapy [3].

The accumulation of PPIX in GBM cells after application of 5-ALA is well established and allows intraoperative identification of the tumor when illuminated with light of 400 nm wavelength [8]. When exposed to light of 635 nm wavelength, however, PPIX acts as a potent photosensitizer for PDT [6,11]. A small-scale phase III study combining 5-ALA and Photofrin-mediated fluorescence-guided resection and PDT prior to radiotherapy, reported a clear benefit in survival and time to



Fig. 5. Negative correlation of 5-ALA LD50 and PPIX accumulation in glioblastoma stemlike cells. LD₅₀ values (mean \pm SEM of at least three independent experiments) of the individual GSC were plotted against corresponding PPIX MFI values determined after incubation of cells for 4 h in the presence of 25 µg/ml 5-ALA and a best fit model was applied.

recurrence compared to patients receiving standard resection and radiotherapy only [16].

Efficacy of fluorescence-guided resection as well as 5-ALA/PDT rely on the selective accumulation of PPIX in the tumor cells after application of 5-ALA [41]. Although it is well established that glioblastoma cells accumulate PPIX and are sensitive to PDT induced phototoxicity [31,42], neither accumulation of PPIX nor sensitivity to PDT has been established for glioblastoma stem-like cells so far.

GSC with a neural stem cell-like expression signature can be grown from tumor tissue and be maintained in neurosphere cultures [20,29, 43], which therefore represent an established in vitro model for human GSC. When GSC established from five distinct patients [28,29] were subjected to exogenous 5-ALA, a dose- and time-dependent accumulation of PPIX was observed. The five GSC preparations differed in PPIX accumulation. It was significantly higher in GS5 and significantly lower in GS3 and BT273 GSC, whereas BT275 and BT379 revealed no difference in PPIX accumulation compared to U373 GBM cells.

For various tumor types, including GBM, reduced ferrochelatase activity [10,44] and particularly low adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 activity [44–46] have been reporter to result in PPIX accumulation after 5-ALA application. Interestingly, ABCG2 is frequently expressed in cancer stem cells, including GSC [47], and may be part of their multidrug resistance. Moreover, it may also be involved in GSC-stemness, since in embryonic stem cells it has been reported to contribute to the maintenance of self-renewal [48]. However, whether the variability of PPIX accumulation in GSC is due to individual differences in 5-ALA metabolization to PPIX or the efflux of PPIX requires further investigation.

Excitation of PPIX initiates a photochemical reaction generating highly reactive oxygen species, particularly singlet oxygen, leading to mainly apoptotic cell death [12]. Having established PPIX accumulation in GSC for the first time, we next asked, whether this accumulation would render the GSC sensitive to PDT induced phototoxicity. When GSC were subjected to 5-ALA/PDT, a 5-ALA-dose-dependent reduction in WST-1 activity, indicating a reduction in viability was observed. Thus, GSC do not only accumulate PPIX, but are also sensitive to the 5-ALA/PDT-induced phototoxicity. Sensitivity of the cells based on 5-ALA LD₅₀ values differed. GS3 and BT273 GSC showed a sensitivity comparable to U373 GBM cells, whereas sensitivity of GSS, BT275 and BT379 GSC was significantly higher. For GSC the sensitivity to 5-ALA/PDT induced phototoxicity followed a negative exponential regression model suggesting that sensitivity mainly depends on the level of PPIX accumulation, i.e. 5-ALA metabolization to PPIX and the efflux of PPIX.

However, additional factors such as differences in the resistance to reactive oxygen species, localization of the photosensitizer within the cells as well as differences in availability of intracellular oxygen [13] between the GSC tested here may influence sensitivity to 5-ALA/PDT as well. Due to variation in PPIX accumulation and the sensitivity to ALA/PDT, there is also variation of the fraction of cells surviving treatment. Therefore, it will be important to determine, whether inhibition of ferrochelatase, e.g. by nitric oxide donors or specific inhibitor [45], or ABCG2 activity, e.g. by verapamil [45] or genistein [49], will increase efficacy of ALA/ PDT of GSC.

Although we could demonstrate the direct phototoxicity of 5-ALA/ PDT for GSC, it remains an open question whether the 5-ALA/PDT induced cell death of GSC will initiate an anti-GSC immune response as it has been suggested for GBM [15,50] and which may be required to kill residual tumor cells as well as GSC. The importance of such anti-GSC responses has been documented by Pellegatta et al., who could show that using neurosphere-derived GSC as a source of tumor antigens improves efficacy of dendritic cell-based immunotherapy in a glioma mouse model [51]. Likewise, it has been reported that PPIX acts as a radiosensitizer in gliomas [52] and that 5-ALA/PDT reduces chemoresistance in head and neck tumors [53]. Whether accumulation of PPIX in GSC and their sensitivity to 5-ALA/PDT will affect their radioand chemosensitivity remains to be determined. Moreover, it will also be important to study whether 5-ALA/PDT affects the migratory and invasive behavior of GSC, an effect, which has been reported for 5-ALA/ PDT for various glioblastoma cell lines [31].

There are also limitations to this study. Although culturing GSC as neurospheres is a widely accepted method, the typical stem cell niche, formed by various non-tumor cells in vivo is missing in this model. In such hypoxic niches, however, oxygen concentrations are low [54], which could be detrimental for the effect of 5-ALA/PDT on GSC in vivo [55]. Thus, further studies are required to confirm the effect of 5-ALA/ PDT on GSC in vivo.

In summary, this is the first report showing accumulation of PPIX in glioblastoma stem-like cells after exogenous supplementation with 5-ALA and sensitivity of GSC to 5-ALA/PDT induced phototoxicity. Thus, 5-ALA/PDT besides its effect on the bulk of tumor may also reduce the risk of GSC-driven disease recurrence and therefore represents a promising therapeutic approach in glioblastoma.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Brigitte Senger and Heike Löffler for excellent technical assistance. GF was supported by AIRC grant IG 13043.

References

- [1] D.N. Louis, A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W.K. Cavenee, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, P. Kleihues, D.W. Ellison, The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary, Acta Neuropathol. 131 (2016) 803–820, http://dx.doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1.
- [2] Q.T. Ostrom, L. Bauchet, F.G. Davis, I. Deltour, J.L. Fisher, C.E. Langer, M. Pekmezci, J.A. Schwartzbaum, M.C. Turner, K.M. Walsh, M.R. Wrensch, J.S. Barnholtz-Sloan, The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review, Neuro Oncol. 16 (2014) 896–913, http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/nou087.
- (2014) 896–913, http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/nou087.
 [3] R. Stupp, M.E. Hegi, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M.J. Taphoorn, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A.A. Brandes, J. Gittenbeek, C. Marosi, C.J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J.G. Ciarncross, R.O. Mirimanoff, Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial, Lancet Oncol. 10 (2009) 459–466, http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(09)70025-7.

- [4] R. Stupp, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, R.O. Mirimanoff, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glio-blastoma, N. Engl. J. Med. 352 (2005) 987–996, http://dx.doi.org/10.1056/ NFIMoa043330
- [5] T.J. Beck, F.W. Kreth, W. Beyer, J.H. Mehrkens, A. Obermeier, H. Stepp, W. Stummer, R. Baumgartner, Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glio-ma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX, Lasers Surg Med. 39 (2007) 386–393, http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20507.
 B. Olzowy, C.S. Hundt, S. Stocker, K. Bise, H.J. Reulen, W. Stummer, Photoirradiation
- (a) B. OLAWY, C.S. Hand, S. BOCK, R. BLS, J. M. KURL, W. BURL, M. BURL,
- V. Johnner, H. Beck, W. Beld, J. Herms, F.W. Kreth, Long-sustaining response in a pa-tient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report, J. Neurooncol. 87
- (2008) 103–109, http://dx.doi.org/10.1007/s11060-007-9497-x. [8] W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O.D. Wiestler, F. Zanella, H.J. Reulen, Fluores cence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma a randomised controlled multicentre phase III trial, Lancet Oncol. 7 (2006) 392–401, http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(06)70665-9.
 [9] L Teng, M. Nakada, S.G. Zhao, Y. Endo, N. Furuyama, E. Nambu, I.V. Pyko, Y. Hayashi,
- J.I. Hamada, Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluo-rescence and photodynamic therapy efficacy, Br. J. Cancer 104 (2011) 798–807, http://dx.doi.org/10.1038/bic.2011.12
- [10] X. Yang, W. Li, P. Palasuberniam, K.A. Myers, C. Wang, B. Chen, Effects of silencing heme biosynthesis enzymes on 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin D fluorescence and photodynamic therapy, Photochem. Photobiol. 91 (2015) 923–930, http://dx.doi.org/10.1111/php.12454.
 [11] B. Krammer, K. Plaetzer, ALA and its clinical impact, from bench to bedside, Photochem. Photobiol. Sci. 7 (2008) 283–289, http://dx.doi.org/10.1039/b712847a.
- [12] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death, Photodiagn
- Photodyn. Ther. 2 (2005) 1–23, http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00030-X.
 [13] A.P. Castano, P. Mroz, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy and anti-tumour immunity, Nat. Rev. Cancer 6 (2006) 535–545, http://dx.doi.org/10.1038/nrc1894.
- [14] G. Canti, D. Lattuada, A. Nicolin, P. Taroni, G. Valentini, R. Cubeddu, Antitumor im munity induced by photodynamic therapy with aluminum disulfonated phthalocy anines and laser light, Anti-Cancer Drugs 5 (1994) 443–447.
- [15] N. Eminan, C. Peters, D. Lakbir, E. Bunemann, V. Borger, M.C. Sabel, D. Hanggi, H.J. Steiger, W. Stummer, R.V. Sorg, Heat-shock protein 70-dependent dendritic cell activation by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment of human glioblastoma spheroids in vitro, Br. J. Cancer 105 (2011) 961-969, http://dx.doi. org/10.1038/bjc.2011.327. [16] M.S. Eljamel, C. Goodman, H. Moseley, ALA and Photofrin fluorescence-guided re-
- section and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial, Lasers Med. Sci. 23 (2008) 361–367, http://dx.doi. org/10.1007/s10103-007-0494-2.
- [17] T. Reva, S.I. Morrison, M.F. Clarke, I.L. Weissman, Stem cells, cancer, and cancer stem cells, Nature 414 (2001) 105–111, http://dx.doi.org/10.1038/35102167. [18] M.R. Alison, S.M. Lim, L.J. Nicholson, Cancer stem cells: problems for therapy? J.
- Pathol. 223 (2011) 147–161, http://dx.doi.org/10.1002/path.2793. [19] S.K. Singh, I.D. Clarke, M. Terasaki, V.E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, P.B. Dirks, Identi-
- fication of a cancer stem cell in human brain tumors, Cancer Res. 63 (2003) 5821-5828
- [20] R. Galli, E. Binda, U. Orfanelli, B. Cipelletti, A. Gritti, S. De Vitis, R. Fiocco, C. Foroni, F. Dimeco, A. Vescovi, Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma, Cancer Res. 64 (2004) 7011–7021, http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1364.
 [21] J. Lee, S. Kotliarova, Y. Kotliarov, A. Li, Q. Su, N.M. Donin, S. Pastorino, B.W. Purow, N.
- Christopher, W. Zhang, J.K. Park, H.A. Fine, Tumor stem cells derived from glioblas-tomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines, Cancer Cell 9 (2006) 391–403,
- [23]
- primary tumors man do seruin-cultured celi innes, cancer Celi 9 (2006) 391–405, http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.030.
 AL. Vescovi, R. Galli, B.A. Reynolds, Brain tumour stem cells, Nat. Rev. Cancer 6 (2006) 425–436, http://dx.doi.org/10.1038/nrc1889.
 A. Eramo, L. Ricci-Vitiani, A. Zeuner, R. Pallini, F. Lotti, G. Sette, E. Pilozzi, L.M. Larocca, C. Peschle, R. De Maria, Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells, Cell Death Differ. 13 (2006) 1238–1241, http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401872.
 D. Beizer L.B. Schler, G.D. Beizer, Chemoreitzance of disblattoma stem cells.
- [24] D. Beier, I.B. Schulz, C.P. Beier, Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells nuch more complex than expected, Mol. Cancer 10 (2011) 128, http://dx.doi.org/ 10.1186/1476-4598-10-128.
- C. Ciceroni, M. Bonelli, E. Mastrantoni, C. Niccolini, M. Laurenza, L.M. Larocca, R. Pallini, A. Traficante, P. Spinsanti, L. Ricci-Vitiani, A. Arcella, R. De Maria, F. Nicoletti, G. Battaglia, D. Melchiorri, Type-3 metabotropic glutamate receptors reg-[25] ulate chemoresistance in glioma stem cells, and their levels are inversely related to survival in patients with malignant gliomas, Cell Death Differ. 20 (2013) 396–407, http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2012.150.
- [26] J.D. Lathia, S.C. Mack, E.E. Mulkearns-Hubert, C.L. Valentim, J.N. Rich, Cancer stem cells in glioblastoma, Genes Dev. 29 (2015) 1203–1217, http://dx.doi.org/10. 1101/gad.261982.115.
- [27] B. Auffinger, AL. Tobias, Y. Han, G. Lee, D. Guo, M. Dey, M.S. Lesniak, A.U. Ahmed, Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy, Cell Death Differ. 21 (2014) 1119–1131, http:// https://www.cello.1020/1412014.021. dx.doi.org/10.1038/cdd.2014.31

- [28] H.S. Gunther, N.O. Schmidt, H.S. Phillips, D. Kemming, S. Kharbanda, R. Soriano, Z. Modrusan, H. Meissner, M. Westphal, K. Lamszus, Glioblastoma-derived stem cellenriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria, Oncogene 27 (2008) 2897–2909, http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc. 1210949.
- [29] F. De Bacco, E. Casanova, E. Medico, S. Pellegatta, F. Orzan, R. Albano, P. Luraghi, G. Reato, A. D'Ambrosio, P. Porrati, M. Patane, E. Maderna, B. Pollo, P.M. Comoglio, G. Finocchiaro, C. Boccaccio, The MET oncogene is a functional marker of a glioblasto-materini ell subtype, Cancer Res. 72 (2012) 4537–4550, http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-11-3490.
 R.G. Verhaak, K.A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M.D. Wilkerson, C.R. Miller, L.
- Ding, T., Golub, J.P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B.A. Wei, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H.S. Feiler, J.G. Hodgson, C.D. James, J.N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P.T. Spellman, R.K. Wilson, T.P. Speed, J.W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C.M. Perou, D.N. Hayes, N. Cancer Genome Atlas Research, et al., Cancer Cell 17 (2010) 98–110, http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020.
 N. Etminan, C. Peters, J. Ficnar, S. Anlasik, E. Bunemann, P.J. Slotty, D. Hanggi, H.J.
- Steiger, R.V. Sorg, W. Stummer, Modulation of migratory activity and invasiveness of human glioma spheroids following 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment. Laboratory investigation, J. Neurosurg. 115 (2011) 281-288, http://dx.
- doi.org/10.3171/2011.3.jns10434. T.N. Ignatova, V.G. Kukekov, E.D. Laywell, O.N. Suslov, F.D. Vrionis, D.A. Steindler, Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro, Glia 39 (2002) 193-206, http://dx.doi.org/10. 1002/glia.10094.
- [33] S.K. Singh, C. Hawkins, I.D. Clarke, J.A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R.M. Henkelman, M.D. Cusimano, P.B. Dirks, et al., Nature 432 (2004) 396–401, http://dx.doi.org/ 10.1038/nature03128.
 [34] M.T. Chiao, Y.C. Yang, W.Y. Cheng, C.C. Shen, J.L. Ko, CD133 + glioblastoma stem-like
- cells induce vascular mimicry in vivo, Curr. Neurovasc. Res. 8 (2011) 210–219. S. Bao, Q. Wu, S. Sathornsumetee, Y. Hao, Z. Li, A.B. Hjelmeland, Q. Shi, R.E.
- [35] McLendon, D.D. Bigner, J.N. Rich, Stem cell-like glioma cells promote tumor angio genesis through vascular endothelial growth factor, Cancer Res. 66 (2006) 7843-7848, http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1010.
- [36] C. Thirant, E.M. Galan-Mova, L.G. Dubois, S. Pinte, P. Chafev, C. Broussard, P. Varlet, B. Devaux, F. Soncin, J. Gavard, M.P. Junier, H. Chneiweiss, Differential proteomic anal-ysis of human glioblastoma and neural stem cells reveals HDGF as a novel angiogenic secreted factor, Stem Cells 30 (2012) 845-853, http://dx.doi.org/10.1002/stem. 1062
- [37] S. Bao, Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, M.W. Dewhirst, D.D. Bigner, J.N. Rich, Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activa-tion of the DNA damage response, Nature 444 (2006) 756–760, http://dx.doi.org/ 10.1038/nature05236
- [38] A.M. Bleau, D. Hambardzumvan, T. Ozawa, E.I. Fomchenko, I.T. Huse, C.W. Brennan, ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells, Cell Stem Cell 4 (2009) 226–235,
- http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.007.
 J. He, Z. Shan, L. Li, F. Liu, Z. Liu, M. Song, H. Zhu, Expression of glioma stem cell marker CD133 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with resistance to radiotherapy in gliomas, Oncol. Rep. 26 (2011) 1305-1313, http://dx.doi. g/10.3892/or.2011.1393
- [40] M. Diehn, M.F. Clarke, Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance, J. Natl. Cancer Inst. 98 (2006) 1755-1757, http://dx.doi.org/10. 1093/jnci/djj505
- T. Ishikawa, K. Takahashi, N. Ikeda, Y. Kajimoto, Y. Hagiya, S. Ogura, S. Miyatake, T. Kuroiwa, Transporter-mediated drug interaction strategy for 5-aminolevulinic acid (ALA)-based photodynamic diagnosis of malignant brain tumor: molecular design of ABCG2 inhibitors, Pharmaceutics 3 (2011) 615–635, http://dx.doi.org/10.3390/ pharmaceutics3030615
- W. Stummer, S. Stocker, A. Novotny, A. Heimann, O. Sauer, O. Kempski, N. Plesnila, J. Wietzorrek, H.J. Reulen, In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 gliom cells after exposure to 5-aminolevulinic acid, J. Photochem. Photobiol. B 45 (1998)
- [43] A. Gritti, E.A. Parati, L. Cova, P. Frolichsthal, R. Galli, E. Wanke, L. Faravelli, D.J. Morasutti, F. Roisen, D.D. Nickel, A.L. Vescovi, Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor, J. Neurosci. 16 (1996) 1091–1100.
- T. Nakanishi, T. Ogawa, C. Yanagihara, I. Tamai, Kinetic evaluation of determinant factors for cellular accumulation of protoporphyrin IX induced by external 5-aminolevulinic acid for photodynamic cancer therapy, J. Pharm. Sci. 104 (2015) [44]
- 3092–3100, http://dx.doi.org/10.1002/jps.24462.
 [45] T. Ogino, H. Kobuchi, K. Munetomo, H. Fujita, M. Yamamoto, T. Utsumi, K. Inoue, T. Shuin, J. Sasaki, M. Inoue, K. Utsumi, Serum-dependent export of protoporphyrin IX by ATP-binding cassette transporter G2 in T24 cells, Mol. Cell. Biochem. 358 (2011) 297–307, http://dx.doi.org/10.1007/s11010-011-0980-5.
 [46] H. Kobuchi, K. Moriya, T. Ogino, H. Fujita, K. Inoue, T. Shuin, T. Yasuda, K. Utsumi, T.
- Hickobichi, K. Mortya, F. Ogino, I. Tojna, K. Houe, T. Shahi, F. Fasuda, K. Ostani, T. Utsumi, Mitochondrial localization of ABC transporter ABCC2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation, PLoS One 7 (2012), e50082 http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0050082.
- Clouz Y, Liu Z, Yuan Z, Zeng P, Tunici H. Ng, IR. Abdulkadir, L. Lu, D, Irvin, K.L. Black, J.S. Yu, Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133 + cancer stem cells in glioblastoma, Mol. Cancer 5 (2006) 67, http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-5-[47]
- [48] J. Susanto, Y.H. Lin, Y.N. Chen, C.R. Shen, Y.T. Yan, S.T. Tsai, C.H. Chen, C.N. Shen, Porphyrin homeostasis maintained by ABCG2 regulates self-renewal of embryonic stem cells, PLoS One 3 (2008), e4023 http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004023

- [49] H. Fujita, K. Nagakawa, H. Kobuchi, T. Ogino, Y. Kondo, K. Inoue, T. Shuin, T. Utsumi, K. Utsumi, J. Sasaki, H. Ohuchi, Phytoestrogen suppresses efflux of the diagnostic marker protoporphyrin IX in lung carcinoma, Cancer Res. 76 (2016) 1837–1846, http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1484.
 [50] F. Li, Y. Cheng, J. Lu, R. Hu, Q. Wan, H. Feng, Photodynamic therapy boosts anti-glio-
- [50] F. Li, Y. Cheng, J. Lu, R. Hu, Q. Wan, H. Feng, Photodynamic therapy boosts anti-glioma immunity in mice: a dependence on the activities of T cells and complement C3, J. Cell. Biochem. 112 (2011) 3035–3043, http://dx.doi.org/10.1002/jcb.23228.
 [51] S. Pellegatta, P.L. Poliani, D. Corno, F. Menghi, F. Ghielmetti, B. Suarez-Merino, V. Caldera, S. Nava, M. Ravanini, F. Facchetti, M.G. Bruzzone, G. Fionochiaro, Neurospheres enriched in cancer stem-like cells are highly effective in eliciting a dendritic cell-mediated immune response against malignant gliomas, Cancer Res. 66 (2006) 10247–10252, http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-2048.
 [52] J. Yamamoto, S. Ogura, T. Tanaka, T. Kitagawa, Y. Nakano, T. Saito, M. Takahashi, D. Akiba, S. Nishizawa, Radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid-induced

- protoporphyrin IX in glioma cells in vitro, Oncol. Rep. 27 (2012) 1748–1752, http://dx.doi.org/10.3892/or.2012.1699.
 [53] C.H. Yu, C.C. Yu, Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (ALA) impairs tumor initiating and chemo-resistance property in head and neck cancer-derived cancer stem cells, PLoS One 9 (2014), e87129 http://dx.doi.org/10.1371/journal. pone 0087129
- pone.U08/129.
 [54] S.J. Sundar, J.K. Hsieh, S. Manjila, J.D. Lathia, A. Sloan, The role of cancer stem cells in glioblastoma, Neurosurg. Focus. 37 (2014), E6 http://dx.doi.org/10.3171/2014.9. FOCUS14494.
- [55] I. Albert, M. Hefti, V. Luginbuehl, Physiological oxygen concentration alters glioma cell malignancy and responsiveness to photodynamic therapy in vitro, Neurol. Res. 36 (2014) 1001–1010, http://dx.doi.org/10.1179/1743132814y.0000000401.

4 Diskussion

4.1 Tumorstammzellen des Glioblastoma multiforme – ein Problem in der Therapie?

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten Tumorstammzellen in Präparaten des GBM identifizieren [42, 46, 47, 60, 132, 133]. Neuronale Tumorstammzellen sind definiert durch ihr Potential, sich selbst zu erneuern, und sie besitzen die Fähigkeit, sich zu Zellen neuronalen, astrozytischen und oligodendroglialen Phänotyps zu differenzieren. Das Schlüsselmerkmal ist jedoch ihre Fähigkeit nach orthotoper Implantation neue Tumoren zu bilden [44].

Trotz ihrer Bedeutung für die Entstehung und den Erhalt von Tumoren, machen Tumorstammzellen nur einen kleinen Teil der Zellen im Tumor aus. Eine etablierte Methode der Gewinnung von GCS ist ihre Anreicherung aus Primärtumoren durch serumfreie Kultivierung in der Gegenwart der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF als Neurosphären [42, 47, 60]. In solchen Kulturen können die Tumorstammzellen als Linien längerfristig erhalten werden [59], ohne dass sie ihre Stammzelleigenschaften verlieren [59]. Dies zeigten zahlreiche Arbeiten basierend auf Protokollen von Gritti et al. für Tumorpräparate von GBM Patienten [132-135]. Die *in "Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogenous 5aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment"* untersuchten GSC-Linien wurden auf diese Weise generiert [131].

Das in fast allen Fällen vorkommende Rezidiv, das mit einer sehr schlechten Prognose für die Patienten verbunden ist, wird den im Tumorbett verbleibenden Tumorstammzellen zugeschrieben [69], da sie das Wachstum des Tumors sowohl initiieren als auch erhalten können. Darüber hinaus können sie durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren die Angiogenese stimulieren, was durch die Bildung neuer Blutgefäße die Versorgung des Tumors verbessert [52, 136, 137]. Durch diese Eigenschaften der Tumorstammzellen wird die Notwendigkeit einer auf GSC ausgerichteten Therapie deutlich [26, 60]. Das Ansprechen der GSC auf die gegenwärtigen Therapien wie Radio- und Chemotherapie ist aufgrund von Resistenzen jedoch begrenzt [61, 62, 65-67, 138]. Darüber hinaus konnte nach Behandlung eine Zunahme an GSC nachgewiesen werden, die zumindest teilweise auf der Konversion von nicht-GSC zu GSC beruht [70], weshalb es für die Wirksamkeit der Therapie auch wichtig ist, nicht-GSC abzutöten.

Interessanterweise konnte für Kopf- und Halstumoren gezeigt werden, dass durch die 5-ALA/PDT die Resistenz von Tumorstammzellen gegenüber Chemotherapeutika reduziert werden kann und die Expression von Genen, die charakteristisch für Stammzellen dieser Tumoren sind, deutlich vermindert wird [130]. Es ist noch unklar worauf dieser Mechanismus genau zurückzuführen ist. Möglicherweise handelt es sich um einen für diese Subpopulation spezifischen Effekt. Auch die Verstärkung der zytotoxischen Wirkung der Strahlentherapie nach 5-ALA/PDT [139], macht deutlich, dass für eine effektive Therapie die Kombination aus Standardradio-/Chemotherapie und 5-ALA/PDT sinnvoll zu sein scheint.

4.2 Protoporphyrin IX Akkumulation in *Glioblastoma Stem-Like Cells* nach Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure

Die Wirksamkeit der 5-ALA/PDT beruht auf der selektiven Anreicherung von PPIX nach Applikation von 5-ALA in den Tumorzellen. Trotz der ausführlich beschriebenen Aufnahme von 5-ALA und der Akkumulation von PPIX in Zellen des GBM [140, 141], kann hieraus nicht abgeleitet werden, dass dies für die gesamte Zellpopulation des GBM, speziell auch für GSC, gilt. Ein Beispiel hierfür ist die von Kushibiki et al. Zelllinie Zelllinie beschriebene Heterogenität der KYSE70. Diese des Ösophaguskarzinoms zeigt *in vitro* verschiedene morphologische Subtypen, obwohl die Zelllinie klonalen Ursprungs ist. Diese Subtypen zeigen sich verschieden sensitiv auf Talaporfin PDT präsentieren unterschiedliche eine basierte und VEGF Expressionsmuster nach erfolgter PDT [142]. Zur effektiven klinischen Verwendung der 5-ALA/PDT zur Behandlung des GBM ist ein Ansprechen der gesamten Tumorpopulation, GSC und nicht-GSC essentiell, da das Auftreten von Rezidiven den im Tumorbett verbleibenden Tumorstammzellen zugeschrieben wird [26]. Deshalb wurden verschiedene GSC-Linien untersucht und eine etablierte Glioblastomzelllinie als Modell für nicht-GSC eingesetzt.

Alle GSC-Linien zeigten nach Inkubation mit 5-ALA eine dosis- und zeitabhängige Akkumulation von PPIX. Nach 4-6 Stunden zeigte sich eine maximale Anreicherung. Diese unterschied sich signifikant zwischen den fünf untersuchten GSC-Linien. Die Akkumulation in GS5 war signifikant höher, in BT275 und BT379 ohne signifikanten Unterschied und in GS3 und BT273 signifikant niedrigerer im Vergleich zu der etablierten GBM-Zelllinie U373. Hiermit konnte gezeigt werden, dass GSC wie nicht-GSC PPIX anreichern. Weshalb sich die Anreicherung zwischen den einzelnen GSC-Linien unterscheidet, ist hingegen unklar.

Die selektive Anreicherung von PPIX in Tumorzellen wird vornehmlich einer verminderten Ferrochelataseaktivität zugeschrieben, die die Chelatierung von PPIX zu Häm katalysiert [95, 143]. Des Weiteren führt eine reduzierte Aktivität oder verminderte Expression des ABCG2 Transporters zu einer vermehrten PPIX Anreicherung nach 5-ALA Applikation [131, 144-146]. ABCG2 wird häufig von Tumorstammzellen exprimiert, unter anderem auch in GSC [147]. Es ist Teil des Mechanismus, der für die multidrug resistance verantwortlich ist. In embryonalen Stammzellen ist ABCG2 bedeutsam für den Erhalt der Stammzelleigenschaften [148] und könnte diese Eigenschaft auch in GSC haben. In wie weit unterschiedliche Enzymaktivitäten oder der Efflux von PPIX für die unterschiedliche Akkumulation von PPIX verantwortlich sind, ist Gegenstand laufender Untersuchungen. Interessant ist, dass sich die Fluoreszenz der PPIX Anreicherungen zwar deutlich von den unbehandelten Kontrollen unterscheidet, sich jedoch in allen GSC-Linien und zu allen Zeitpunkten eine Überlappung der Fluoreszenz mit der Kontrolle zeigt [131]. Ob es sich hierbei um eine verschobene Normalverteilung oder um das Vorliegen einer ABCG2 positiven Side Population [90] handelt, bleibt unklar. Gegen diese Annahme hingegen spricht, dass diese mit zunehmender Inkubationsdauer in allen GSC-Linien abnimmt. Beim Vorliegen einer Side Population [90] wäre zu erwarten, dass sich ein Teil der Zellen mit konstant niedriger PPIX Fluoreszenz darstellt und keine normalverteilte Population. Eine zusätzliche Färbung der GSC mit Hoechst 33342, einem DNA bindendem Fluoreszenzfarbstoff, welcher ABCG2 positive Zellen nicht anfärbt [90, 149], könnte diese Side Population ggf. darstellen und die Frage klären. Zhao et al. beschrieben, dass eine verstärkte Expression von ABCB6 [85], das als maßgeblich für den Transport von Coproporphyrinogen III in den Intermembranraum des Mitochondriums angesehen wird [82], zu einer vermehrten Anreicherung von PPIX nach 5-ALA Inkubation führt und die Effektivität einer PDT verbessert [86]. Welchen Stellenwert die ABCG2 und ABCB6 Expression bei der PPIX Anreicherung in GSC haben bleibt abzuklären.

4.3 *Glioblastoma Stem-Like Cells* sind sensitive für eine 5-Aminolävulinsäure basierte Photodynamische Therapie

Nachdem in *"Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogenous 5-aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment"* zum ersten Mal gezeigt wurde, dass GSC PPIX anreichern, bezieht sich die zweite Frage darauf, ob eine PPIX Anreicherung in GSC diese für eine anschließende PDT sensitiv macht.

Die Anregung von PPIX mit Licht nahe 635 nm Wellenlänge löst eine photochemische Reaktion aus, die zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt [98]. Diese Sauerstoffspezies, hauptsächlich Singulett-Sauerstoff, bewirken mitochondriale Schäden, die zu hauptsächlich apoptotischem Zelltod führen [97]. Nachdem die fünf GSC-Linien nach 4-stündiger Inkubation mit 5-ALA einer PDT unterzogen wurden, zeigte sich in allen GSC-Linien eine 5-ALA dosisabhänige Verminderung der Umsetzung des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes WST-1 zu Formazan, ein Indikator für die Verminderung der Vitalität der Zellen [150]. Hiermit konnte gezeigt werden, dass GSC nicht nur PPIX nach Inkubation mit 5-ALA anreichern, sondern hierdurch auch sensitiv für eine PDT werden und durch diese abgetötet werden.

Die Sensitivität für die 5-ALA/PDT unterschied sich zwischen den GSC, gemessen an der mittleren letalen Dosis (LD₅₀). Hierbei zeigten GS3 und BT273 eine mit der GBM Zelllinie U373 vergleichbare Sensitivität, bei signifikant höherer Sensitivität der GSC-Linien GS5, BT275 und BT379, wobei die Sensitivität (LD₅₀-Wert) eine negative Korrelation mit der PPIX Akkumulation (mittlere Fluoreszenzintensität) zeigte. Die Sensitivität der GSC für eine PDT hängt daher hauptsächlich von der PPIX Anreicherung, sprich der 5-ALA-Aufnahme, seiner Metabolisierung zu PPIX und dem PPIX-Efflux ab. Unterschiede in der Resistenz gegenüber oxidativem Stress, der intrazellulären PPIX Lokalisation und der Verfügbarkeit von intrazellulärem Sauerstoff können die Sensitivität von Zellen gegenüber einer PDT zwar beeinflussen [97, 119], scheinen hier jedoch untergeordneter Bedeutung zu sein bzw. sich zwischen den untersuchten Linien nicht zu unterscheiden. Ob die beobachteten Unterschiede in der WST-1 Aktivität der GSC-Linien, sprich in der Frequenz überlebender Zellen, durch eine Erhöhung der 5-ALA Dosis ausgeglichen werden können, d.h. ob auch die restlichen überlebenden Zellen abgetötet werden können, bleibt offen. Bei den überlebenden Zellen könnte es sich um eine zuvor im Rahmen der PPIX Akkumulation diskutierte ABCG2 positive *Side Population* handeln [90], die als Ursache einer PDT Resistenz diskutiert wird [87]. Diese wäre durch eine auf die PDT folgende durchflusszytometrische Analyse oder immunhistochemische Färbung nachweisbar [90].

Ob die Frequenz der PPIX Anreicherung in GSC durch eine Inhibierung der Ferrochelatase durch Stickstoffmonoxid oder spezifische Inhibitoren [146] oder Modulierung der ABCG2 Aktivität durch Verapamil [146], Genistein [151] oder den Tyrosinkinase Inhibitor Imatinib [88] reduziert werden kann, bleibt abzuwarten. In wie weit eine verstärkte Expression des ABCB6 Transporters [86] durch spezifische Modulatoren erreicht werden kann und ob dies zu einer Verbesserung der PPIX Anreicherung und PDT im GBM und speziell in GSC führt, ist Gegenstand der Forschung [86, 87]. Ein weiterer Ansatzpunkt sind Enzyme, die eine Entgiftung der reaktiven Sauerstoffspezies vermitteln. Eines dieser Enzyme ist die Superoxiddismutase (SOD), Disproportionierung von Superoxid-Anionen mit Protonen zu welche die Wasserstoffperoxid und Sauerstoff katalysiert [152]. Zum Schutz der Zelle vor oxidativem Stress kann die SOD vermehrt exprimiert werden - unter anderem auch durch eine PDT [153, 154]. Für eine Photofrin basierte PDT konnte eine Behandlung mit dem SOD-Inhibitor 2-Methoxyestradiol die Wirksamkeit der PDT erhöhen. Ob die Effektivität einer 5-ALA/PDT von GSC durch eine zusätzliche Behandlung mit einem SOD-Inhibitor [154] verbessert werden kann, ist Gegenstand der Forschung.

Obwohl die untersuchten Zelllinien ein exzellentes *in vitro* Modell für GSC darstellen [60, 133, 155], bestehen wesentliche Unterschiede zwischen dem *in vitro* Modell und der Situation *in vivo*. Solche Unterschiede sind unter anderem zu finden in der Zusammensetzung des Mikromileus, dem Vorhandensein von Nährstoffen, der extrazellulären Matrix, der Zytoarchitektur, dem Vorhandensein von Zytokinen und der Verfügbarkeit von Sauerstoff, der von essentieller Bedeutung für die PDT ist [26, 156]. Zudem liefert die Messung der Vitalität mittels WST-1 Assay keine qualitative Aussage bezüglich der überlebenden Zellpopulation und zeigt Grenzen in der Detektion kleiner Zellpopulationen [157]. In wie weit überlebende GSC ihren Stammzell-ähnlichen Charakter beibehalten, differenzieren oder einen invasiveren Charakter zeigen [158], bleibt unklar. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig [158].

4.4 Ausblick und mögliche limitierende Aspekte einer Photodynamischen Therapie

Für das GBM wurde eine hypoxisch-nekrotische Nische beschrieben [159], deren Mikromileu für den Erhalt der GSC mitverantwortlich sein soll [71, 160]. Ob GSC in diesem Mikromileu sensitiv auf eine PDT reagieren, bleibt unklar. Von Matsumoto et al. wurde vor kurzem an Magenkarzinomzelllinien unter hypoxischen Bedingungen eine vermehrte Expression von ABCB6 in der Plasmamembran beschrieben, die zum Efflux von Coproporphyrin III führt [96]. In wie weit dies eine Konsequenz für den Level der PPIX Anreicherung und die Effektivität einer anschließenden PDT hat, wurde hingegen nicht überprüft [96]. Dies zeigt, dass unter hypoxischen Bedingungen regulatorische Prozesse auf die Häm-Biosynthese einwirken, die bisher nur wenig Verstanden sind. Eine möglicherweise verminderte PPIX Anreicherung in GSC unter hypoxischen Bedingungen und eine geringere Menge an verfügbarem Sauerstoff könnten jedoch einen negativen Einfluss auf die Effektivität der 5-ALA/PDT von GSC in einem solchen Milieu haben. Dies bleibt weiterhin Gegenstand der Forschung.

Pellegatta und Kollegen konnten eine überlegene Wirksamkeit einer gegen GSC gerichteten Immuntherapie mit Dendritischen Zellen in einem Glioblastoma Mausmodell zeigen [161]. Trotz der Limitierung eines Tiermodelles, könnte dies ein Hinweis auf das mögliche therapeutische Potential einer gegen GSC gerichteten Therapie auch am Menschen sein, insbesondere da ein Zusammenhang zwischen PDT und der Initiation einer anti-tumoralen Immunantwort existiert. Eine auf der intrazellulären Anreicherung von Porphyrin basierende PDT induziert neben der direkten Phototoxizität eine adaptive Immunantwort [140, 162-164]. Darüber hinaus

konnte an einem Glioblastoma Mausmodell nachgewiesen werden, dass eine lokale sowie systemische Immunantwort durch eine auf Hämatoporphyrin-Derivaten basierenden PDT initiiert wird [162].

Auch für den Menschen liegen erste Ergebnisse vor, die dokumentieren, dass eine Porphyrin basierte PDT wirkungsvoll eine Immunantwort durch Aktivierung Dendritischer Zellen induziert [165]. Unter anderem konnten Etminan et al. zeigen, dass die 5-ALA/PDT von GBM Zellen in einer Attraktion Dendritischer Zellen, einer gesteigerten Antigenaufnahme sowie einer Aktivierung der Dendritischen Zellen resultiert [128], d.h. die ersten Schritte für die Entwicklung einer anti-tumoralen Immunantwort initiiert. Die historische Annahme, dass es sich beim Gehirn um ein immunpriviligiertes Organ handelt, ist mittlerweile überholt [166-168]. Inwiefern eine Kombination aus gegen GSC gerichteten Immuntherapie und einer 5-ALA/PDT, die im GBM ihrerseits eine adaptive Immunantwort initiiert [140, 162], gezielt Tumorstammzellen des GBM abtöten kann und dadurch die Prognose der Erkrankung verbessert, bleibt abzuwarten. Ob eine lokale Applikation von unreifen Dendritischen Zellen nach erfolgter 5-ALA/PDT [169] beim Menschen das immunogene Potential verstärken könnte, bleibt bisher hypothetisch.

Ein weiterer interessanter Ansatz zur Therapieerweiterung der 5-ALA/PDT ist die Kombination mit dem bereits in der Behandlung des GBM Rezidivs [170]eingesetzten Angiogenesehemmstoffs Bevacizumab [170], der unter dem Handelsnamen Avastin vertrieben wird [31]. Bevacizumab ist ein potenter VEGF-Rezeptor Antikörper, der in die Therapieschemata vieler Tumoren mit aufgenommen wurde [171-173]. In der Therapie des GBM zeigt Bevacizumab in der initialen Therapie in Kombination mit der Standardtherapie keine Verbesserung des Überlebens, bei Verbesserung des progressionsfreien Überlebens [174], in der Therapie des Rezidivs jedoch einen Überlebensvorteil [32, 170]. Zudem vermindert Bevacizumab das Auftreten eines zerebralen Ödems [57].

Die zu Beginn beschriebene vermehrte VEGF Expression von GSC [52, 53] und verstärke Expression von VEGF nach PDT mit verschiedenen Photosensibilisatoren [123, 124, 175] wirft die Frage auf, ob eine 5-ALA/PDT in GSC zu einer vermehrten VEGF Expression führen kann und ob durch eine Kombination mit Bevacizumab eine

Verminderung der Angioneogenese erreicht werden kann. In einem C6 Ratten Gliommodell konnte eine auf Chlorin-Konjugat basierte PDT in Kombination mit Bevacizumab eine Verbesserung des Überlebens gezeigt werden [176]. Ob eine mit Bevacizumab kombinierte PDT [177] auf den Menschen übertragbar ist oder für Bevacizumab beschriebene Mechanismen aktiviert werden, die zu einer verstärkten Invasivität und einem vermehrten Tumorwachstum führen, ist unbekannt [178, 179]. Diese Mechanismen beruhen unter anderem auf der Umgehung des VEGF-Signalwegs durch die Aktivierung alternativer Signalwege [178, 180, 181].

Eine aus der verminderten Vaskularisierung resultierende Hypoxie führt zu einer vermehrten Expression von HIF2α, das eine Konversion von nicht-GSC zu GSC vermitteln kann [72]. Ob hierdurch ein vermehrtes Auftreten von GSC in den nach 5-ALA/PDT verbleibenden Zellen nachzuweisen ist und inwiefern ein solcher Effekt sich auf das Überleben der Patienten auswirkt, muss deshalb überprüft werden.

4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend ist *"Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogenous 5-aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment*" die erste Arbeit, die eine Anreicherung von PPIX in GSC nach 5-ALA Inkubation zeigen konnte. Auch konnte mit dieser Arbeit erstmals die Wirksamkeit einer 5-ALA/PDT an GSC nachgewiesen werden. Die hier gezeigte Sensitivität der GSC für eine 5-ALA/PDT, ist ein wichtiger Schritt zur Einführung der 5-ALA/PDT als Therapiekonzept beim GBM.

Mit dieser Arbeit bleiben viele offene Fragen. Es bleibt unklar, ob eine 5-ALA/PDT der GSC sich hemmend auf die Migration und Invasivität der Zellen auswirkt, wie es für nicht-GSC berichtet wurde [140], sich auf die Bildung von Blutgefäßen auswirkt [136, 137] und ob die PDT GSC einer anti-tumoralen Immunantwort zugänglich macht [128, 162]. Ferner sind die Mechanismen weiterhin unklar, die zur Anreicherung von PPIX in den Zellen führen, und ob die Anreicherung und damit die Sensitivität der Zellen durch spezifische Inhibitoren weiter gesteigert werden kann. Als abschließenden Schritt wären *in vivo* Untersuchung erforderlich, um die Effekte der PDT auf GSC im Tiermodell zu bestätigen.

5. Literaturverzeichnis

- 1. Fisher, J.L., Schwartzbaum, J.A., Wrensch, M., and Wiemels, J.L., Epidemiology of brain tumors. **Neurol Clin**, 2007. 25(4): 867-90, vii.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Berlin, 2015
- 3. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P., The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol**, 2007. 114(2): 97-109.
- Louis, D.N. and International Agency for Research on Cancer., WHO classification of tumours of the central nervous system. 4th ed. World Health Organization classification of tumours. 2007, Lyon: International Agency for Research on Cancer. 309 p.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W., The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol, 2016. 131(6): 803-20.
- 6. Wen, P.Y. and Kesari, S., Malignant gliomas in adults. **N Engl J Med**, 2008. 359(5): 492-507.
- 7. Scherer, H., The forms of growth in gliomas and their practical significance. **Brain**, 1940. 63(1): 1-35.
- Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., Hayes, D.N., and Cancer Genome Atlas Research, N., Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell, 2010. 17(1): 98-110.
- 9. Giese, A. and Westphal, M., Glioma invasion in the central nervous system. **Neurosurgery**, 1996. 39(2): 235-50; discussion 250-2.
- Enam, S.A., Rosenblum, M.L., and Edvardsen, K., Role of extracellular matrix in tumor invasion: migration of glioma cells along fibronectin-positive mesenchymal cell processes. **Neurosurgery**, 1998. 42(3): 599-607; discussion 607-8.

- 11. Maxwell, H.P., The incidence of interhemispheric extension of glioblastoma multiforme through the corpus callosum. **J Neurosurg**, 1946. 3: 54-7.
- Matsukado, Y., Maccarty, C.S., and Kernohan, J.W., The growth of glioblastoma multiforme (astrocytomas, grades 3 and 4) in neurosurgical practice. J Neurosurg, 1961. 18: 636-44.
- 13. Dziurzynski, K., Blas-Boria, D., Suki, D., Cahill, D.P., Prabhu, S.S., Puduvalli, V., and Levine, N., Butterfly glioblastomas: a retrospective review and qualitative assessment of outcomes. **J Neurooncol**, 2012. 109(3): 555-63.
- 14. Ohgaki, H. and Kleihues, P., Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol**, 2007. 170(5): 1445-53.
- 15. Fujisawa, H., Reis, R.M., Nakamura, M., Colella, S., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H., Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. **Lab Invest**, 2000. 80(1): 65-72.
- 16. Ohgaki, H. and Kleihues, P., The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clin Cancer Res**, 2013. 19(4): 764-72.
- Nakamura, M., Yang, F., Fujisawa, H., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H., Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. 59(6): 539-43.
- Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C., and von Deimling, A., Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. Acta Neuropathol, 2008. 116(6): 597-602.
- Lai, A., Kharbanda, S., Pope, W.B., Tran, A., Solis, O.E., Peale, F., Forrest, W.F., Pujara, K., Carrillo, J.A., Pandita, A., Ellingson, B.M., Bowers, C.W., Soriano, R.H., Schmidt, N.O., Mohan, S., Yong, W.H., Seshagiri, S., Modrusan, Z., Jiang, Z., Aldape, K.D., Mischel, P.S., Liau, L.M., Escovedo, C.J., Chen, W., Nghiemphu, P.L., James, C.D., Prados, M.D., Westphal, M., Lamszus, K., Cloughesy, T., and Phillips, H.S., Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. J Clin Oncol, 2011. 29(34): 4482-90.
- 20. Brandes, A.A., Tosoni, A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G., and Vecht, C., Glioblastoma in adults. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, 2008. 67(2): 139-152.
- 21. Jelsma, R. and Bucy, P.C., The treatment of glioblastoma multiforme of the brain. **J Neurosurg**, 1967. 27(5): 388-400.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G.,

Eisenhauer, E., and Mirimanoff, R.O., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med**, 2005. 352(10): 987-96.

- Stummer, W., Reulen, H.J., Meinel, T., Pichlmeier, U., Schumacher, W., Tonn, J.C., Rohde, V., Oppel, F., Turowski, B., Woiciechowsky, C., Franz, K., Pietsch, T., and Group, A.L.-G.S., Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. Neurosurgery, 2008. 62(3): 564-76; discussion 564-76.
- 24. Holland, E.C., Glioblastoma multiforme: the terminator. **Proc Natl Acad Sci U S** A, 2000. 97(12): 6242-4.
- 25. Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., and Mirimanoff, R.O., 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.
- 26. Sundar, S.J., Hsieh, J.K., Manjila, S., Lathia, J.D., and Sloan, A., The role of cancer stem cells in glioblastoma. **Neurosurg Focus**, 2014. 37(6): E6.
- 27. Barbagallo, G.M., Jenkinson, M.D., and Brodbelt, A.R., 'Recurrent' glioblastoma multiforme, when should we reoperate? **Br J Neurosurg**, 2008. 22(3): 452-5.
- Park, J.K., Hodges, T., Arko, L., Shen, M., Dello Iacono, D., McNabb, A., Olsen Bailey, N., Kreisl, T.N., Iwamoto, F.M., Sul, J., Auh, S., Park, G.E., Fine, H.A., and Black, P.M., Scale to predict survival after surgery for recurrent glioblastoma multiforme. J Clin Oncol, 2010. 28(24): 3838-43.
- 29. Combs, S.E., Debus, J., and Schulz-Ertner, D., Radiotherapeutic alternatives for previously irradiated recurrent gliomas. **BMC Cancer**, 2007. 7: 167.
- Weller, M., Cloughesy, T., Perry, J.R., and Wick, W., Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? Neuro Oncol, 2013. 15(1): 4-27.
- 31. Cohen, M.H., Shen, Y.L., Keegan, P., and Pazdur, R., FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. **Oncologist**, 2009. 14(11): 1131-8.
- Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., Yung, W.K., Paleologos, N., Nicholas, M.K., Jensen, R., Vredenburgh, J., Huang, J., Zheng, M., and Cloughesy, T., Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. J Clin Oncol, 2009. 27(28): 4733-40.

- 33. Artene, S.A., Turcu-Stiolica, A., Hartley, R., Ciurea, M.E., Daianu, O., Brindusa, C., Alexandru, O., Tataranu, L.G., Purcaru, S.O., and Dricu, A., Dendritic cell immunotherapy versus bevacizumab plus irinotecan in recurrent malignant glioma patients: a survival gain analysis. **Onco Targets Ther**, 2016. 9: 6669-6677.
- 34. De Vleeschouwer, S., Fieuws, S., Rutkowski, S., Van Calenbergh, F., Van Loon, J., Goffin, J., Sciot, R., Wilms, G., Demaerel, P., Warmuth-Metz, M., Soerensen, N., Wolff, J.E., Wagner, S., Kaempgen, E., and Van Gool, S.W., Postoperative adjuvant dendritic cell-based immunotherapy in patients with relapsed glioblastoma multiforme. Clin Cancer Res, 2008. 14(10): 3098-104.
- 35. Stummer, W., Beck, T., Beyer, W., Mehrkens, J.H., Obermeier, A., Etminan, N., Stepp, H., Tonn, J.C., Baumgartner, R., Herms, J., and Kreth, F.W., Longsustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report. J Neurooncol, 2008. 87(1): 103-9.
- 36. Eljamel, M.S., Goodman, C., and Moseley, H., ALA and Photofrin fluorescenceguided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial. **Lasers Med Sci**, 2008. 23(4): 361-7.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Diaz, L.A., Jr., Hartigan, J., Smith, D.R., Strausberg, R.L., Marie, S.K., Shinjo, S.M., Yan, H., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., and Kinzler, K.W., An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science, 2008. 321(5897): 1807-12.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E., A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature, 1994. 367(6464): 645-8.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F., Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(7): 3983-8.
- 40. O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E., A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature, 2007. 445(7123): 106-10.
- 41. Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J., Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. **Cancer Res**, 2005. 65(23): 10946-51.

- 42. Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B., Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, 2004. 432(7015): 396-401.
- 43. Jackson, E.L. and Alvarez-Buylla, A., Characterization of adult neural stem cells and their relation to brain tumors. **Cells Tissues Organs**, 2008. 188(1-2): 212-24.
- 44. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, 2001. 414(6859): 105-11.
- 45. Alison, M.R., Lim, S.M., and Nicholson, L.J., Cancer stem cells: problems for therapy? **J Pathol**, 2011. 223(2): 147-61.
- 46. Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., and Steindler, D.A., Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. **Glia**, 2002. 39(3): 193-206.
- 47. Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B., Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. **Cancer Res**, 2003. 63(18): 5821-8.
- Hemmati, H.D., Nakano, I., Lazareff, J.A., Masterman-Smith, M., Geschwind,
 D.H., Bronner-Fraser, M., and Kornblum, H.I., Cancerous stem cells can arise
 from pediatric brain tumors. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(25): 15178-83.
- 49. Ellis, P., Fagan, B.M., Magness, S.T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M., and Pevny, L., SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. **Dev Neurosci**, 2004. 26(2-4): 148-65.
- 50. Gangemi, R.M., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M.C., Malatesta, P., Ravetti, G.L., Zona, G.L., Daga, A., and Corte, G., SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. **Stem Cells**, 2009. 27(1): 40-8.
- Boumahdi, S., Driessens, G., Lapouge, G., Rorive, S., Nassar, D., Le Mercier, M., Delatte, B., Caauwe, A., Lenglez, S., Nkusi, E., Brohee, S., Salmon, I., Dubois, C., del Marmol, V., Fuks, F., Beck, B., and Blanpain, C., SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. Nature, 2014. 511(7508): 246-50.
- 52. Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A.B., Shi, Q., McLendon, R.E., Bigner, D.D., and Rich, J.N., Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. **Cancer Res**, 2006. 66(16): 7843-8.
- 53. D'Alessio, A., Proietti, G., Lama, G., Biamonte, F., Lauriola, L., Moscato, U., Vescovi, A., Mangiola, A., Angelucci, C., and Sica, G., Analysis of angiogenesis

related factors in glioblastoma, peritumoral tissue and their derived cancer stem cells. **Oncotarget**, 2016.

- 54. Hatva, E., Kaipainen, A., Mentula, P., Jääskeläinen, J., Paetau, A., Haltia, M., and Alitalo, K., Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors. **The American Journal of Pathology**, 1995. 146(2): 368-378.
- 55. Narita, Y., Bevacizumab for glioblastoma. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, 2015. 11: 1759-1765.
- 56. Bates, D.O., Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. **Cardiovasc Res**, 2010. 87(2): 262-71.
- 57. Gerstner, E.R., Duda, D.G., di Tomaso, E., Ryg, P.A., Loeffler, J.S., Sorensen, A.G., Ivy, P., Jain, R.K., and Batchelor, T.T., VEGF inhibitors in the treatment of cerebral edema in patients with brain cancer. **Nat Rev Clin Oncol**, 2009. 6(4): 229-36.
- Reynolds, B.A. and Weiss, S., Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science, 1992. 255(5052): 1707-10.
- 59. Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J.K., and Fine, H.A., Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. **Cancer Cell**, 2006. 9(5): 391-403.
- 60. Vescovi, A.L., Galli, R., and Reynolds, B.A., Brain tumour stem cells. **Nat Rev Cancer**, 2006. 6(6): 425-36.
- 61. Eramo, A., Ricci-Vitiani, L., Zeuner, A., Pallini, R., Lotti, F., Sette, G., Pilozzi, E., Larocca, L.M., Peschle, C., and De Maria, R., Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. **Cell Death Differ**, 2006. 13(7): 1238-41.
- 62. Beier, D., Schulz, J.B., and Beier, C.P., Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected. **Mol Cancer**, 2011. 10: 128.
- Ciceroni, C., Bonelli, M., Mastrantoni, E., Niccolini, C., Laurenza, M., Larocca, L.M., Pallini, R., Traficante, A., Spinsanti, P., Ricci-Vitiani, L., Arcella, A., De Maria, R., Nicoletti, F., Battaglia, G., and Melchiorri, D., Type-3 metabotropic glutamate receptors regulate chemoresistance in glioma stem cells, and their levels are inversely related to survival in patients with malignant gliomas. Cell Death Differ, 2013. 20(3): 396-407.
- 64. Hau, P., Koch, D., Hundsberger, T., Marg, E., Bauer, B., Rudolph, R., Rauch, M., Brenner, A., Rieckmann, P., Schuth, J., Jauch, T., Koch, H., and Bogdahn, U.,

Safety and feasibility of long-term temozolomide treatment in patients with high-grade glioma. **Neurology**, 2007. 68(9): 688-90.

- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N., Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature, 2006. 444(7120): 756-60.
- He, J., Shan, Z., Li, L., Liu, F., Liu, Z., Song, M., and Zhu, H., Expression of glioma stem cell marker CD133 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with resistance to radiotherapy in gliomas. **Oncol Rep**, 2011. 26(5): 1305-13.
- 67. Diehn, M. and Clarke, M.F., Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance. **J Natl Cancer Inst**, 2006. 98(24): 1755-7.
- 68. Cheng, L., Bao, S., and Rich, J.N., Potential Therapeutic Implications of Cancer Stem Cells in Glioblastoma. **Biochemical pharmacology**, 2010. 80(5): 654-665.
- 69. Chen, J., Li, Y., Yu, T.S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., and Parada, L.F., A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. **Nature**, 2012. 488(7412): 522-6.
- Auffinger, B., Tobias, A.L., Han, Y., Lee, G., Guo, D., Dey, M., Lesniak, M.S., and Ahmed, A.U., Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. Cell Death Differ, 2014. 21(7): 1119-31.
- 71. Heddleston, J.M., Li, Z., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., and Rich, J.N., The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. **Cell Cycle**, 2009. 8(20): 3274-84.
- 72. Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., and Rich, J.N., Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. **Cancer Cell**, 2009. 15(6): 501-13.
- 73. Carnero, A. and Lleonart, M., The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. **BioEssays**, 2016. 38: S65-S74.
- 74. Maugeri-Sacca, M., Vici, P., Di Lauro, L., Barba, M., Amoreo, C.A., Gallo, E., Mottolese, M., and De Maria, R., Cancer stem cells: are they responsible for treatment failure? **Future Oncol**, 2014. 10(13): 2033-44.
- 75. Dunn-Pirio, A.M. and Vlahovic, G., Immunotherapy approaches in the treatment of malignant brain tumors. **Cancer**, 2016.

- Liang, P., Shi, H., Zhu, W., Gui, Q., Xu, Y., Meng, J., Guo, X., Gong, Z., and Chen,
 H., Silver nanoparticles enhance the sensitivity of temozolomide on human glioma cells. Oncotarget, 2016.
- 77. Park, J., Aryal, M., Vykhodtseva, N., Zhang, Y.Z., and McDannold, N., Evaluation of permeability, doxorubicin delivery, and drug retention in a rat brain tumor model after ultrasound-induced blood-tumor barrier disruption. **J Control Release**, 2016.
- 78. Dolmans, D.E., Fukumura, D., and Jain, R.K., Photodynamic therapy for cancer. **Nat Rev Cancer**, 2003. 3(5): 380-7.
- 79. Raab, O., Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. **Zeitung Biol**, 1900. 39.
- 80. Lipson, R.L. and Baldes, E.J., The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. **Arch Dermatol**, 1960. 82: 508-16.
- Diamond, I., Granelli, S.G., McDonagh, A.F., Nielsen, S., Wilson, C.B., and Jaenicke, R., Photodynamic therapy of malignant tumours. Lancet, 1972. 2(7788): 1175-7.
- Teng, L.N., M; Hayashi, Y; Yoneyama, T; Zhao, S; Hamada; J, Current Applications of 5-ALA in Glioma Diagnostics and Therapy, in Clinical Management and Evolving Novel Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumors, T. Lichtor, Editor. 2013, InTech.
- Stummer, W., Reulen, H.J., Novotny, A., Stepp, H., and Tonn, J.C., Fluorescenceguided resections of malignant gliomas--an overview. Acta Neurochir Suppl, 2003. 88: 9-12.
- 84. Rodriguez, L., Batlle, A., Di Venosa, G., MacRobert, A.J., Battah, S., Daniel, H., and Casas, A., Study of the mechanisms of uptake of 5-aminolevulinic acid derivatives by PEPT1 and PEPT2 transporters as a tool to improve photodynamic therapy of tumours. **Int J Biochem Cell Biol**, 2006. 38(9): 1530-9.
- Krishnamurthy, P.C., Du, G., Fukuda, Y., Sun, D., Sampath, J., Mercer, K.E., Wang, J., Sosa-Pineda, B., Murti, K.G., and Schuetz, J.D., Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. Nature, 2006. 443(7111): 586-9.
- Zhao, S.-G., Chen, X.-F., Wang, L.-G., Yang, G., Han, D.-Y., Teng, L., Yang, M.-C., Wang, D.-Y., Shi, C., Liu, Y.-H., Zheng, B.-J., Shi, C.-B., Gao, X., and Rainov, N.G., Increased Expression of ABCB6 Enhances Protoporphyrin IX Accumulation and Photodynamic Effect in Human Glioma. **Annals of Surgical Oncology**, 2013. 20(13): 4379-4388.

- 87. Robey, R.W., Steadman, K., Polgar, O., and Bates, S.E., ABCG2-mediated transport of photosensitizers: potential impact on photodynamic therapy. **Cancer Biol Ther**, 2005. 4(2): 187-94.
- Liu, W., Baer, M.R., Bowman, M.J., Pera, P., Zheng, X., Morgan, J., Pandey, R.A., and Oseroff, A.R., The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate enhances the efficacy of photodynamic therapy by inhibiting ABCG2. Clin Cancer Res, 2007. 13(8): 2463-70.
- 89. Bleau, A.M., Huse, J.T., and Holland, E.C., The ABCG2 resistance network of glioblastoma. **Cell Cycle**, 2009. 8(18): 2936-44.
- 90. Morgan, J., Jackson, J.D., Zheng, X., Pandey, S.K., and Pandey, R.K., Substrate affinity of photosensitizers derived from chlorophyll-a: the ABCG2 transporter affects the phototoxic response of side population stem cell-like cancer cells to photodynamic therapy. **Mol Pharm**, 2010. 7(5): 1789-804.
- 91. Krammer, B. and Plaetzer, K., ALA and its clinical impact, from bench to bedside. **Photochem Photobiol Sci**, 2008. 7(3): 283-9.
- 92. Fukuhara, H., Inoue, K., Satake, H., Tamura, K., Karashima, T., Yamasaki, I., Tatsuo, I., Kurabayashi, A., Furihata, M., and Shuin, T., Photodynamic diagnosis of positive margin during radical prostatectomy: preliminary experience with 5aminolevulinic acid. **Int J Urol**, 2011. 18(8): 585-91.
- 93. Inoue, K., Fukuhara, H., Shimamoto, T., Kamada, M., Iiyama, T., Miyamura, M., Kurabayashi, A., Furihata, M., Tanimura, M., Watanabe, H., and Shuin, T., Comparison between intravesical and oral administration of 5-aminolevulinic acid in the clinical benefit of photodynamic diagnosis for nonmuscle invasive bladder cancer. **Cancer**, 2012. 118(4): 1062-74.
- 94. Teng, L., Nakada, M., Zhao, S.G., Endo, Y., Furuyama, N., Nambu, E., Pyko, I.V., Hayashi, Y., and Hamada, J.I., Silencing of ferrochelatase enhances 5aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy. Br J Cancer, 2011. 104(5): 798-807.
- 95. Yang, X., Li, W., Palasuberniam, P., Myers, K.A., Wang, C., and Chen, B., Effects of Silencing Heme Biosynthesis Enzymes on 5-Aminolevulinic Acid-mediated Protoporphyrin IX Fluorescence and Photodynamic Therapy. **Photochem Photobiol**, 2015. 91(4): 923-30.
- 96. Matsumoto, K., Hagiya, Y., Endo, Y., Nakajima, M., Ishizuka, M., Tanaka, T., and Ogura, S., Effects of plasma membrane ABCB6 on 5-aminolevulinic acid (ALA)induced porphyrin accumulation in vitro: tumor cell response to hypoxia. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2015. 12(1): 45-51.
- 97. Castano, A.P., Demidova, T.N., and Hamblin, M.R., Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, 2005. 2(1): 1-23.

- 98. Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J.H., and Stewart, F.A., Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, 2006. 11(9): 1034-44.
- 99. Foote, C.S., Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochem Photobiol**, 1991. 54(5): 659.
- 100. Moan, J. and Berg, K., The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochem Photobiol**, 1991. 53(4): 549-53.
- 101. Ravanat, J.L. and Cadet, J., Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. **Chem Res Toxicol**, 1995. 8(3): 379-88.
- 102. Grune, T., Klotz, L.O., Gieche, J., Rudeck, M., and Sies, H., Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite. **Free Radic Biol Med**, 2001. 30(11): 1243-53.
- 103. Girotti, A.W., Mechanisms of lipid peroxidation. J Free Radic Biol Med, 1985. 1(2): 87-95.
- Castano, A.P., Demidova, T.N., and Hamblin, M.R., Mechanisms in photodynamic therapy: part one—-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 2004. 1(4): 279-293.
- 105. Buytaert, E., Dewaele, M., and Agostinis, P., Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica** Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2007. 1776(1): 86-107.
- 106. Kessel, D. and Castelli, M., Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. Photochem Photobiol, 2001. 74(2): 318-22.
- 107. Usuda, J., Chiu, S.M., Murphy, E.S., Lam, M., Nieminen, A.L., and Oleinick, N.L., Domain-dependent photodamage to Bcl-2. A membrane anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine photosensitization. J Biol Chem, 2003. 278(3): 2021-9.
- Xue, L.Y., Chiu, S.M., and Oleinick, N.L., Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. **Oncogene**, 2001. 20(26): 3420-7.
- Kriska, T., Korytowski, W., and Girotti, A.W., Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinate-treated tumor cells. Arch Biochem Biophys, 2005. 433(2): 435-46.
- 110. Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K.A., Foster, T.H., Girotti, A.W., Gollnick, S.O., Hahn, S.M., Hamblin, M.R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J.,

Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B.C., and Golab, J., PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER: AN UPDATE. **CA: a cancer journal for clinicians**, 2011. 61(4): 250-281.

- Karmakar, S., Banik, N.L., Patel, S.J., and Ray, S.K., 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells. Neurosci Lett, 2007. 415(3): 242-7.
- Reiners, J.J., Jr., Caruso, J.A., Mathieu, P., Chelladurai, B., Yin, X.M., and Kessel, D., Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. Cell Death Differ, 2002. 9(9): 934-44.
- 113. Stummer, W., Perspectives in central nervous system malignancies. **IDrugs**, 2006. 9(6): 412-4.
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., and Reulen, H.J., 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.
- Stylli, S.S., Kaye, A.H., MacGregor, L., Howes, M., and Rajendra, P., Photodynamic therapy of high grade glioma - long term survival. J Clin Neurosci, 2005. 12(4): 389-98.
- 116. Popovic, E.A., Kaye, A.H., and Hill, J.S., Photodynamic therapy of brain tumors. **Semin Surg Oncol**, 1995. 11(5): 335-45.
- 117. Beck, T.J., Kreth, F.W., Beyer, W., Mehrkens, J.H., Obermeier, A., Stepp, H., Stummer, W., and Baumgartner, R., Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. Lasers Surg Med, 2007. 39(5): 386-93.
- 118. Wang, W., Moriyama, L.T., and Bagnato, V.S., Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT. Laser Physics Letters, 2013. 10(2): 023001.
- 119. Castano, A.P., Mroz, P., and Hamblin, M.R., Photodynamic therapy and antitumour immunity. **Nat Rev Cancer**, 2006. 6(7): 535-45.
- 120. Ferrario, A. and Gomer, C.J., Avastin enhances photodynamic therapy treatment of Kaposi's sarcoma in a mouse tumor model. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2006. 25(1-2): 251-9.
- 121. Uehara, M., Inokuchi, T., Sano, K., and ZuoLin, W., Expression of vascular endothelial growth factor in mouse tumours subjected to photodynamic therapy. **Eur J Cancer**, 2001. 37(16): 2111-5.

- 122. Yee, K.K., Soo, K.C., and Olivo, M., Anti-angiogenic effects of Hypericinphotodynamic therapy in combination with Celebrex in the treatment of human nasopharyngeal carcinoma. **Int J Mol Med**, 2005. 16(6): 993-1002.
- 123. Jiang, F., Zhang, X., Kalkanis, S.N., Zhang, Z., Yang, H., Katakowski, M., Hong, X., Zheng, X., Zhu, Z., and Chopp, M., Combination therapy with antiangiogenic treatment and photodynamic therapy for the nude mouse bearing U87 glioblastoma. **Photochem Photobiol**, 2008. 84(1): 128-37.
- 124. Jiang, F., Zhang, Z.G., Katakowski, M., Robin, A.M., Faber, M., Zhang, F., and Chopp, M., Angiogenesis induced by photodynamic therapy in normal rat brains. **Photochem Photobiol**, 2004. 79(6): 494-8.
- 125. Kowanetz, M. and Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. **Clin Cancer Res**, 2006. 12(17): 5018-22.
- 126. Kawczyk-Krupka, A., Sieron-Stoltny, K., Latos, W., Czuba, Z.P., Kwiatek, B., Potempa, M., Wasilewska, K., Krol, W., and Stanek, A., ALA-induced photodynamic effect on vitality, apoptosis, and secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) by colon cancer cells in normoxic environment in vitro. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, 2016. 13: 308-15.
- 127. Canti, G., Lattuada, D., Nicolin, A., Taroni, P., Valentini, G., and Cubeddu, R., Antitumor immunity induced by photodynamic therapy with aluminum disulfonated phthalocyanines and laser light. **Anticancer Drugs**, 1994. 5(4): 443-7.
- 128. Etminan, N., Peters, C., Lakbir, D., Bunemann, E., Borger, V., Sabel, M.C., Hanggi, D., Steiger, H.J., Stummer, W., and Sorg, R.V., Heat-shock protein 70dependent dendritic cell activation by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment of human glioblastoma spheroids in vitro. **Br J Cancer**, 2011. 105(7): 961-9.
- 129. Barth, B.M., E, I.A., Shanmugavelandy, S.S., Kaiser, J.M., Crespo-Gonzalez, D., DiVittore, N.A., McGovern, C., Goff, T.M., Keasey, N.R., Adair, J.H., Loughran, T.P., Jr., Claxton, D.F., and Kester, M., Targeted indocyanine-green-loaded calcium phosphosilicate nanoparticles for in vivo photodynamic therapy of leukemia. ACS Nano, 2011. 5(7): 5325-37.
- 130. Yu, C.H. and Yu, C.C., Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (ALA) impairs tumor initiating and chemo-resistance property in head and neck cancer-derived cancer stem cells. **PLoS One**, 2014. 9(1): e87129.
- 131. Schimanski, A., Ebbert, L., Sabel, M.C., Finocchiaro, G., Lamszus, K., Ewelt, C., Etminan, N., Fischer, J.C., and Sorg, R.V., Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogenous 5-aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment. **J Photochem Photobiol B**, 2016. 163: 203-210.

- 132. Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A., Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res, 2004. 64(19): 7011-21.
- Gunther, H.S., Schmidt, N.O., Phillips, H.S., Kemming, D., Kharbanda, S., Soriano, R., Modrusan, Z., Meissner, H., Westphal, M., and Lamszus, K., Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. **Oncogene**, 2008. 27(20): 2897-909.
- 134. Gritti, A., Parati, E.A., Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D.J., Roisen, F., Nickel, D.D., and Vescovi, A.L., Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. **J Neurosci**, 1996. 16(3): 1091-100.
- 135. De Bacco, F., Casanova, E., Medico, E., Pellegatta, S., Orzan, F., Albano, R., Luraghi, P., Reato, G., D'Ambrosio, A., Porrati, P., Patane, M., Maderna, E., Pollo, B., Comoglio, P.M., Finocchiaro, G., and Boccaccio, C., The MET oncogene is a functional marker of a glioblastoma stem cell subtype. Cancer Res, 2012. 72(17): 4537-50.
- Chiao, M.T., Yang, Y.C., Cheng, W.Y., Shen, C.C., and Ko, J.L., CD133+ glioblastoma stem-like cells induce vascular mimicry in vivo. Curr Neurovasc Res, 2011. 8(3): 210-9.
- 137. Thirant, C., Galan-Moya, E.M., Dubois, L.G., Pinte, S., Chafey, P., Broussard, C., Varlet, P., Devaux, B., Soncin, F., Gavard, J., Junier, M.P., and Chneiweiss, H., Differential proteomic analysis of human glioblastoma and neural stem cells reveals HDGF as a novel angiogenic secreted factor. Stem Cells, 2012. 30(5): 845-53.
- 138. Bleau, A.M., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E.I., Huse, J.T., Brennan, C.W., and Holland, E.C., PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. **Cell Stem Cell**, 2009. 4(3): 226-35.
- Yamamoto, J., Ogura, S., Tanaka, T., Kitagawa, T., Nakano, Y., Saito, T., Takahashi, M., Akiba, D., and Nishizawa, S., Radiosensitizing effect of 5aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in glioma cells in vitro. Oncol Rep, 2012. 27(6): 1748-52.
- 140. Etminan, N., Peters, C., Ficnar, J., Anlasik, S., Bunemann, E., Slotty, P.J., Hanggi, D., Steiger, H.J., Sorg, R.V., and Stummer, W., Modulation of migratory activity and invasiveness of human glioma spheroids following 5-aminolevulinic acidbased photodynamic treatment. Laboratory investigation. J Neurosurg, 2011. 115(2): 281-8.

- 141. Stummer, W., Stocker, S., Novotny, A., Heimann, A., Sauer, O., Kempski, O., Plesnila, N., Wietzorrek, J., and Reulen, H.J., 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.
- 142. Kushibiki, T., Sakai, M., and Awazu, K., Differential effects of photodynamic therapy on morphologically distinct tumor cells derived from a single precursor cell. **Cancer Lett**, 2008. 268(2): 244-51.
- 143. Hirschberg, H., Sun, C.H., Krasieva, T., and Madsen, S.J., Effects of ALAmediated photodynamic therapy on the invasiveness of human glioma cells. Lasers Surg Med, 2006. 38(10): 939-45.
- 144. Nakanishi, T., Ogawa, T., Yanagihara, C., and Tamai, I., Kinetic Evaluation of Determinant Factors for Cellular Accumulation of Protoporphyrin IX Induced by External 5-Aminolevulinic Acid for Photodynamic Cancer Therapy. J Pharm Sci, 2015. 104(9): 3092-100.
- 145. Kobuchi, H., Moriya, K., Ogino, T., Fujita, H., Inoue, K., Shuin, T., Yasuda, T., Utsumi, K., and Utsumi, T., Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation. **PLoS One**, 2012. 7(11): e50082.
- 146. Ogino, T., Kobuchi, H., Munetomo, K., Fujita, H., Yamamoto, M., Utsumi, T., Inoue, K., Shuin, T., Sasaki, J., Inoue, M., and Utsumi, K., Serum-dependent export of protoporphyrin IX by ATP-binding cassette transporter G2 in T24 cells. Mol Cell Biochem, 2011. 358(1-2): 297-307.
- 147. Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., and Yu, J.S., Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. **Mol Cancer**, 2006. 5: 67.
- 148. Susanto, J., Lin, Y.H., Chen, Y.N., Shen, C.R., Yan, Y.T., Tsai, S.T., Chen, C.H., and Shen, C.N., Porphyrin homeostasis maintained by ABCG2 regulates self-renewal of embryonic stem cells. **PLoS One**, 2008. 3(12): e4023.
- 149. Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C., Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. J Exp Med, 1996. 183(4): 1797-806.
- Ishiyama, M., Shiga, M., Sasamoto, K., Mizoguchi, M., and He, P.-g., A New Sulfonated Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 1993. 41(6): 1118-1122.
- 151. Fujita, H., Nagakawa, K., Kobuchi, H., Ogino, T., Kondo, Y., Inoue, K., Shuin, T., Utsumi, T., Utsumi, K., Sasaki, J., and Ohuchi, H., Phytoestrogen Suppresses Efflux of the Diagnostic Marker Protoporphyrin IX in Lung Carcinoma. Cancer Res, 2016. 76(7): 1837-46.

- 152. McCord, J.M. and Fridovich, I., Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem, 1969. 244(22): 6049-55.
- 153. Das, H., Koizumi, T., Sugimoto, T., Yamaguchi, S., Hasegawa, K., Tenjin, Y., and Nishimura, R., Induction of apoptosis and manganese superoxide dismutase gene by photodynamic therapy in cervical carcinoma cell lines. **International Journal of Clinical Oncology**, 2000. 5(2): 97-103.
- 154. Golab, J., Nowis, D., Skrzycki, M., Czeczot, H., Baranczyk-Kuzma, A., Wilczynski, G.M., Makowski, M., Mroz, P., Kozar, K., Kaminski, R., Jalili, A., Kopec, M., Grzela, T., and Jakobisiak, M., Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor. J Biol Chem, 2003. 278(1): 407-14.
- 155. Reynolds, B.A. and Vescovi, A.L., Brain cancer stem cells: Think twice before going flat. **Cell Stem Cell**, 2009. 5(5): 466-7; author reply 468-9.
- 156. Albert, I., Hefti, M., and Luginbuehl, V., Physiological oxygen concentration alters glioma cell malignancy and responsiveness to photodynamic therapy in vitro. **Neurol Res**, 2014. 36(11): 1001-10.
- 157. Berridge, M.V., Herst, P.M., and Tan, A.S., Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnol Annu Rev**, 2005. 11: 127-52.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M., Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells.
 Cancer Res, 2006. 66(19): 9339-44.
- 159. Rong, Y., Durden, D.L., Van Meir, E.G., and Brat, D.J., 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. 65(6): 529-39.
- 160. McCord, A.M., Jamal, M., Shankavaram, U.T., Lang, F.F., Camphausen, K., and Tofilon, P.J., Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. Mol Cancer Res, 2009. 7(4): 489-97.
- Pellegatta, S., Poliani, P.L., Corno, D., Menghi, F., Ghielmetti, F., Suarez-Merino, B., Caldera, V., Nava, S., Ravanini, M., Facchetti, F., Bruzzone, M.G., and Finocchiaro, G., Neurospheres enriched in cancer stem-like cells are highly effective in eliciting a dendritic cell-mediated immune response against malignant gliomas. Cancer Res, 2006. 66(21): 10247-52.
- 162. Li, F., Cheng, Y., Lu, J., Hu, R., Wan, Q., and Feng, H., Photodynamic therapy boosts anti-glioma immunity in mice: a dependence on the activities of T cells and complement C3. J Cell Biochem, 2011. 112(10): 3035-43.

- Garg, A.D., Nowis, D., Golab, J., and Agostinis, P., Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity.
 Apoptosis, 2010. 15(9): 1050-71.
- 164. Thong, P.S., Ong, K.W., Goh, N.S., Kho, K.W., Manivasager, V., Bhuvaneswari, R., Olivo, M., and Soo, K.C., Photodynamic-therapy-activated immune response against distant untreated tumours in recurrent angiosarcoma. Lancet Oncol, 2007. 8(10): 950-2.
- 165. Korbelik, M. and Sun, J., Photodynamic therapy-generated vaccine for cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother**, 2006. 55(8): 900-9.
- 166. Fabry, Z., Raine, C.S., and Hart, M.N., Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. Immunol Today, 1994. 15(5): 218-24.
- 167. Tambuyzer, B.R., Ponsaerts, P., and Nouwen, E.J., Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. **J Leukoc Biol**, 2009. 85(3): 352-70.
- 168. Engelhardt, B., Carare, R.O., Bechmann, I., Flugel, A., Laman, J.D., and Weller, R.O., Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. **Acta Neuropathol**, 2016. 132(3): 317-38.
- 169. Jalili, A., Makowski, M., Switaj, T., Nowis, D., Wilczynski, G.M., Wilczek, E., Chorazy-Massalska, M., Radzikowska, A., Maslinski, W., Bialy, L., Sienko, J., Sieron, A., Adamek, M., Basak, G., Mroz, P., Krasnodebski, I.W., Jakobisiak, M., and Golab, J., Effective photoimmunotherapy of murine colon carcinoma induced by the combination of photodynamic therapy and dendritic cells. Clin Cancer Res, 2004. 10(13): 4498-508.
- 170. Wong, E.T., Gautam, S., Malchow, C., Lun, M., Pan, E., and Brem, S., Bevacizumab for recurrent glioblastoma multiforme: a meta-analysis. J Natl Compr Canc Netw, 2011. 9(4): 403-7.
- 171. Andre, F., Deluche, E., and Bonnefoi, H., Bevacizumab: the phoenix of breast oncology? **Lancet Oncol**, 2015. 16(6): 600-1.
- 172. Minion, L.E. and Tewari, K.S., The safety and efficacy of bevacizumab in the treatment of patients with recurrent or metastatic cervical cancer. **Expert Rev Anticancer Ther**, 2016.
- 173. Ferrara, N., Hillan, K.J., and Novotny, W., Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. **Biochem Biophys Res Commun**, 2005. 333(2): 328-35.
- Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., Brandes, A.A., Hilton, M., Abrey, L., and Cloughesy, T., Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. N Engl J Med, 2014. 370(8): 709-22.

- 175. Zhang, X., Jiang, F., Zhang, Z.G., Kalkanis, S.N., Hong, X., deCarvalho, A.C., Chen, J., Yang, H., Robin, A.M., and Chopp, M., Low-dose photodynamic therapy increases endothelial cell proliferation and VEGF expression in nude mice brain. Lasers Med Sci, 2005. 20(2): 74-9.
- 176. Tzerkovsky, D.A., Osharin, V.V., Istomin, Y.P., Alexandrova, E.N., and Vozmitel, M.A., Fluorescent diagnosis and photodynamic therapy for C6 glioma in combination with antiangiogenic therapy in subcutaneous and intracranial tumor models. **Exp Oncol**, 2014. 36(2): 85-9.
- 177. Olzowy, B., Hundt, C.S., Stocker, S., Bise, K., Reulen, H.J., and Stummer, W., Photoirradiation therapy of experimental malignant glioma with 5aminolevulinic acid. J Neurosurg, 2002. 97(4): 970-6.
- 178. Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G., and Hanahan, D., Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. **Cancer Cell**, 2005. 8(4): 299-309.
- 179. Bergers, G. and Hanahan, D., Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. Nat Rev Cancer, 2008. 8(8): 592-603.
- 180. Fernando, N.T., Koch, M., Rothrock, C., Gollogly, L.K., D'Amore, P.A., Ryeom, S., and Yoon, S.S., Tumor escape from endogenous, extracellular matrix-associated angiogenesis inhibitors by up-regulation of multiple proangiogenic factors. Clin Cancer Res, 2008. 14(5): 1529-39.
- 181. Fine, H.A., Bevacizumab in glioblastoma--still much to learn. **N Engl J Med**, 2014. 370(8): 764-5.

6. Danksagung

Vielen Dank an all diejenigen, die mich bei meiner akademischen Ausbildung und meiner Promotion unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. rer. nat. Rüdiger V. Sorg für die Möglichkeit der Anfertigung einer Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe danken. Mit großem Engagement unterstützte er mich während meines Promotionsvorhabens. Auch für die anregenden Diskussionen abseits des Forschungsprojektes bin ich sehr dankbar. Die Zeit im Labor hat mich geprägt.

Danken möchte ich zudem Herrn PD Dr. med. Nima Etminan, der sich als Betreuer der neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt hat.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die mein Promotionsvorhaben in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Sehr dankbar bin ich meiner Freundin Jana für ihr Verständnis und ihre Unterstützung.

Ein weiterer Dank gilt meinen Kollegen, die mir hilfreich zur Seite standen: Frau Dr. rer. nat. Corinna Peters, die mich in die Thematik der Photodynamischen Therapie und Zellkultur eingeführt hat, Frau Dr. rer. nat. Verena Börger für die Unterstützung bei technischen und methodischen Fragenstellungen, Frau Katharina Raba, die mich bei der Planung und technischen Durchführung der FACS-Untersuchungen beraten hat und Frau Heike Krägel, die mir bei allgemeinen technischen Fragen zur Seite stand. Auch weiteren Mitarbeitern des ITZ gilt mein Dank: Malrun, Katrin, Lucas, Sebastian, Michael, Sophie, Sarah, Marc, Aljoscha, Anna und Teja.

Auch bei den Mitarbeitern der neurochirurgischen Klinik, insbesondere bei Frau Senger möchte ich mich für die gute Kooperation und Hilfe bedanken.