Aus dem
Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf
Direktor: Dr. med. Johannes Fischer

Metabolisierung und Effizienz der 5-Aminolävulinsäurebasierten photodynamischen Therapie in Zellen des Medulloblastoms

Dissertation

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

vorgelegt von
Anna Briel-Pump

2020

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

Gez.

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. rer. nat. Rüdiger Sorg

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Accumulation of protoporphyrin IX in medulloblastoma cell lines and sensitivity to subsequent photodynamic treatment. Anna Briel-Pump, Thomas Beez, Lara Ebbert, Marc Remke, Sandra Weinhold, Michael C. Sabel, Rüdiger V. Sorg. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, Volume 189, 2018, Pages 298-305.

Zusammenfassung

Medulloblastome (MB) sind die häufigsten bösartigen Hirntumoren im Kindesalter. Patienten mit hohem Risiko haben eine schlechte Prognose und vor allem jung erkrankte Patienten leiden auch nach Remission unter den Langzeitfolgen der Therapie. Aufgrund dessen müssen weitere Therapieoptionen eruiert werden. Bei Glioblastomen (GBM), den häufigsten bösartigen Hirntumoren im Erwachsenenalter, führt die Verabreichung von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) zur Anreicherung von Protoporphyrin IX (PPIX) in den Tumorzellen. In der fluoreszenzgesteuerten Chirurgie wird dieses Phänomen genutzt, um den Tumor intraoperativ zu identifizieren und hierdurch das Ausmaß der Tumorresektion zu verbessern. Zudem ist PPIX ein Photosensitizer und seine Anregung während der photodynamischen Therapie (PDT) führt zu einer phototoxischen Reaktion, in deren Verlauf die Tumorzellen absterben. Ob MB-Zellen PPIX anreichern und dies zu einer Sensitivität der Zellen für die PDT führt, und ob ggf. das Enzym Ferrochelatase sowie das ABCG2 Transporterprotein (CD338) daran beteiligt sind, wird in dieser Arbeit beleuchtet.

Humane MB-Zelllinien mit (Med8A und D283) bzw. ohne Amplifikation des *MYC*-Gens (UW228-2 und ONS76) wurden mit steigenden Konzentrationen von 5-ALA inkubiert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die PPIX-Anreicherung durchflusszytometrisch gemessen. Um die Sensitivität der Tumorzellen für die PDT zu ermitteln, wurden sie anschließend mit Laserlicht der Wellenlänge 635 nm bestrahlt (18.75 J/cm^2) und nach 24 Stunden die Zellvitalität mittels des WST-1-Tests quantifiziert. Die Expression der Ferrochelatase wurde mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion gemessen, die Aktivität durch die enzymatische Umsetzung von PPIX zu Zink-Protoporphyrin, während die Expression von CD338 durchfluss-zytometrisch ermittelt wurde.

Alle MB-Zelllinien akkumulierten zeit- und dosisabhängig PPIX nach 5-ALA-Applikation und wurden sensitiv für die PDT-induzierte Phototoxizität. Nicht alle Zellen innerhalb der MB-Zelllinien wurden PPIX positiv, und die PPIX-Akkumulation insbesondere nach kürzeren Inkubationsperioden und bei niedrigen 5-ALA-Konzentrationen war im Vergleich zu U373 GBM-Zellen reduziert. Insgesamt war die Phototoxizität bei MB-Zellen mit amplifiziertem *MYC*-Gen mehr ausgeprägt jedoch geringer als bei U373 GBM-Zellen. Unterschiede in der Ferrochelatase-Expression konnten nicht festgestellt werden, aber die enzymatische Aktivität war in MB-Zellen geringer als in GBM-Zellen, während CD338 nur auf den MB-Zelllinien exprimiert wurde.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass MB-Zellen eine niedrige Ferrochelatase-Expression und -Aktivität besitzen, PPIX nach 5-ALA-Applikation akkumulieren und auf eine anschließende PDT sensitiv reagieren. Diese Photosensitivität war bei MB-Zellen mit amplifiziertem *MYC*-Gen besonders ausgeprägt. Im Vergleich zu GBM-Zellen war die PPIX-Akkumulation in MB-Zellen reduziert, auf eine Subpopulation der Zellen begrenzt und resultierte in einer geringeren Photosensitivität, wofür die Expression des ABCG2 Transporterproteins auf den MB-Zellen verantwortlich sein könnte.

Abstract

Medulloblastoma (MB) is the most common malignant primary brain tumor of childhood. High risk patients still have a poor outcome, and especially young patients suffer even after remission from standard therapy induced sequelae. Therefore, other therapeutic options need to be explored. In glioblastoma (GBM), the most frequent malignant brain tumor in adults, application of 5-aminolaevulinic acid (5-ALA) results in selective accumulation of protoporphyrin IX (PPIX) in the tumor cells. This can be exploited during fluorescence-guided surgery to identify tumor tissue intraoperatively, allowing to increase the extent of tumor resection. Moreover, PPIX is a photosensitizer, which upon excitation during photodynamic therapy (PDT) initiates a phototoxic reaction, killing the tumor cells. It is not entirely clear, whether MB cells also accumulate PPIX, become sensitive to PDT-induced phototoxicity and whether ferrochelatase as well as the ABCG2 transporter protein (CD338) are possibly involved.

Human *MYC*-amplified (Med8A and D283) and non-amplified (UW228-2 and ONS76) MB cell lines were incubated for 2 - 6 h with increasing doses of 5-ALA, and PPIX accumulation was determined by flow cytometry. To assess sensitivity to PDT, cells were subsequently exposed to laser light of 635 nm wavelength (18.75 J/cm^2), and after an additional 24 h culture period, viability of cells was quantified using the WST-1 assay. Expression of ferrochelatase was detected by quantitative polymerase chain reaction. Ferrochelatase activity was quantified by measuring the enzymatic conversion of PPIX to zinc-protoporphyrin. Expression of CD338 was detected by flow cytometry.

All MB cell lines showed a time- and dose-dependent accumulation of PPIX after exposure to exogenous 5-ALA and became sensitive to PDT-induced phototoxicity. Not all cells within the MB cell lines became PPIX positive, and PPIX accumulation was reduced compared to U373 GBM cells at shorter incubation periods and limiting 5-ALA doses. Overall, photosensitivity was more pronounced in *MYC*-amplified MB cells, but always lower compared to GBM cells. There was no difference in expression of ferrochelatase, but enzymatic activity appeared to be reduced in the MB cells compared to U373 GBM cells, whereas CD338 was expressed on the MB cells only.

In summary, MB cells show low expression and enzymatic activity of ferrochelatase, accumulate PPIX after application of 5-ALA and become sensitive to subsequent PDT. Photosensitivity is more pronounced in *MYC*-amplified cells. In contrast to GBM cells, however, PPIX accumulation appears to be reduced, restricted to a subset of cells and associated with lower photosensitivity of the MB cells, possibly due to expression of the ABCG2 transporter protein on MB cells.

Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
5-ALA/PDT	5-Aminolävulinsäure-basierte photodynamische Therapie
Abb.	Abbildung
ABCB6	*Adenosine Triphosphate Binding Cassette Subfamily B Member 6*
ABCG2	*Adenosine Triphosphate Binding Cassette Subfamily G Member 2*
CSC	*Cancer Stem Cell*
GBM	Glioblastoma multiforme
MB	Medulloblastoma
MRT	Magnetresonanztomographie
PDT	Photodynamische Therapie
PPIX	Protoporphyrin IX
SHH	*Sonic Hedgehog*
SP	*Stem Cell-Like Side Population*
WNT	*Wingless*
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

1.1 Die Epidemiologie des Medulloblastoms 1
1.2. Die Pathologie des Medulloblastoms 1
1.2.1 WNT-aktiviertes Medulloblastom 2
1.2.2 SHH-aktiviertes Medulloblastom 3
1.2.3 Gruppe 3 Medulloblastome 3
1.2.4 Gruppe 4 Medulloblastome 3
1.3 Die Klinik des Medulloblastoms 4
1.4 Der Therapiestandard des Medulloblastoms 5
1.4 5-Aminolävulinsäure-basierte photodynamische Therapie 7
1.5 Anwendung der 5-ALA/PDT bei Hirntumoren 9

2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT 10

2. *ORIGINALARBEIT* 11

4. DISKUSSION 12

4.1 Protoporphyrin IX-Akkumulation in Medulloblastomzellen mit verringerter Ferrochelataseexpression und -aktivität 12
4.2 Medulloblastomzellen reagieren sensitiv auf eine 5-Aminolävulinsäure basierte photodynamische Therapie 14
4.3 Die Inhibition des ABCG2 Transporters zur Potenzierung der 5-ALA/PDT Wirksamkeit 15
4.4 Weitere Ansätze zur Effektivitätssteigerung der 5-ALA/PDT 16
4.5 Therapieausblick für das Medulloblastom 18
4.6 Schlussfolgerung 19

5. LITERATURVERZEICHNIS 21

6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS 32

1. Einleitung

1.1 Die Epidemiologie des Medulloblastoms

Das Medulloblastom (MB) ist ein neuroepithelialer, primärer Tumor des Gehirns, der im Kleinhirn bzw. im vierten Ventrikel lokalisiert ist [1]. Es macht 15 - 20% aller pädiatrischen Tumoren des Zentralen Nervensystems (ZNS) aus und ist damit das häufigste Malignom des ZNS bei Kindern. Die jährliche Inzidenzrate in Europa ist bei Kindern im Alter von 1 bis 9 Jahren am höchsten, mit knapp unter 8 Fällen pro eine Million Kinder; bei Säuglingen und Kindern im Alter von 10 - 14 Jahren ist die Inzidenz niedriger [2, 3]. In den USA zeigte sich 2001 - 2013 die höchste Inzidenz bei Kindern zwischen 1 - 4 Jahren [3]; 80% aller diagnostizierten MB betrafen Kinder unter 16 Jahren. Unter 5% aller Medulloblastome sind mit hereditären Erkrankungen wie der familiären adenomatösen Polyposis und dem Gorlin-Syndrom einhergehend [4].

1.2 Die Pathologie des Medulloblastoms

Histopathologisch können MB in klassische, desmoplastisch-noduläre, anaplastische und MB mit ausgeprägter Nodularität bzw. großzellig eingeteilt werden. Am seltensten wurde das melanotische MB beschrieben.

Das klassische MB zeichnet sich durch kleine, hyperchromatische Zellkerne und wenig Zytoplasma aus. Das desmoplastische-noduläre MB ist histologisch durch Reikulinfaser-freie Zellinseln gekennzeichnet, die von desmoplatischen, d.h. Retikulinfaser-reichen, mitotisch aktiven Tumoranteilen umgeben werden Anaplastische MB zeigen einen Pleomorphismus im Tumorbereich, oft assoziiert mit einer hohen Rate an Mitosen und apoptotischen Zellen. Das MB mit ausgeprägter Nodularität besteht aus großen, knötchenförmigen, Retikulinfaser-freien Inseln mit neurozytär differenzierten Tumorzellen in einer Neuropilartigen Matrix. Diese werden von meist relativ spärlich ausgeprägten, Retikulinfaser-reichen Septen mit eingelagerten undifferenzierten Tumorzellen umgeben. Akkumuliert Melanin im Zytoplasma der neuroepithelialen MB-Zellen, handelt es sich um ein melanotisches MB.

2010 legten Experten in Boston die Einteilung des MB in vier Subtypen fest, welche von der WHO übernommen wurde (Abb. 1). Die WHO teilte das MB genetisch in die Subtypen *Wingless* (WNT)-aktiviert, *Sonic-Hedgehog* (SHH)-aktiviert, Gruppe 3 und Gruppe 4 ein. Die zugrunde liegenden Signalwege in Gruppe 3 und 4 sind bis dato

noch nicht bekannt, jedoch werden innerhalb der vier Gruppen zunehmend Subgruppen identifiziert [5, 6].

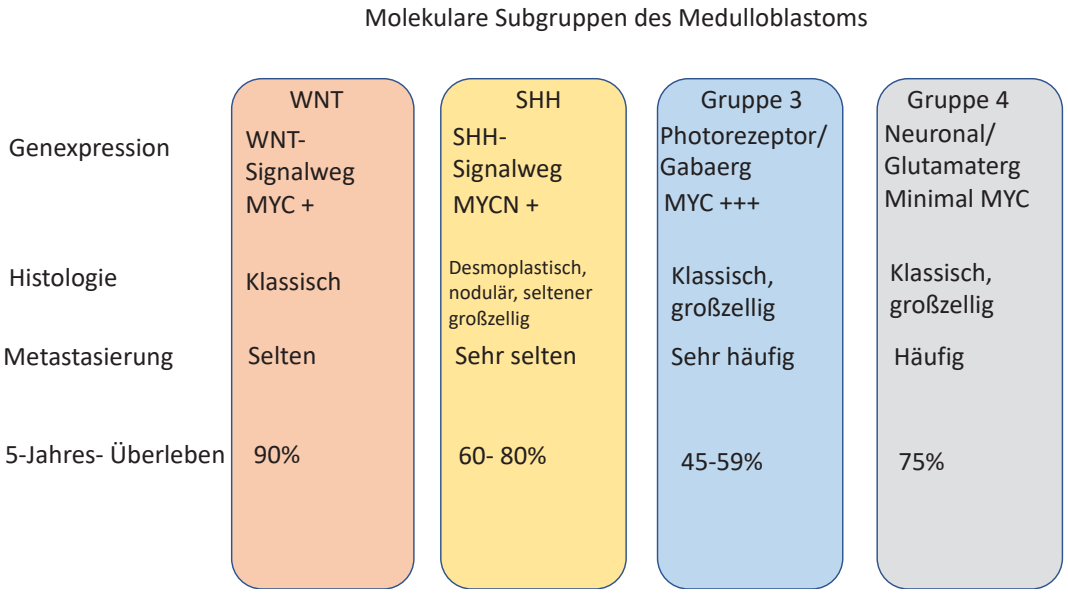

Abb. 1: Die molekularen Subgruppen des Medulloblastoms (modifiziert nach Millard et al. [7]).

1.2.1 WNT-aktiviertes Medulloblastom

Die WNT-Gruppe macht 10% aller MB aus. Die Tumoren zeigen die klassische Histologie und metastasieren selten. Die Patienten haben mit 95% die besten 5- und 10-Jahres-Überlebensraten [8-10]. Im Durchschnitt sind Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zehn Jahre alt.

90% der Tumoren haben Mutationen im ß-Catenin (CTNNB1), einer Schlüsselkomponente des WNT-Signalwegs, dessen durchgehende Aktivierung wahrscheinlich ursächlich an der Ausbildung des MB der WNT-Subgruppe beteiligt ist [8, 11-13]. In der WNT-Gruppe zeigen die Tumoren eine relativ hohe *MYC*-Expression, vergleichbar zur Gruppe 3, obwohl eine *MYC*-Überexpression normalerweise mit einer schlechteren Prognose einhergeht [14]. Interessanterweise besitzen die Tumoren keine *MYC*-Amplifikation [15]. *MYC* wird vermutlich aufgrund der Interaktion von ß-Catenin mit den TCF/LEF Proteinen des WNT-Signalwegs überexprimiert, weshalb davon auszugehen ist, dass die *MYC*-Überexpression in der WNT-Gruppe keine Ursache für die Tumorgenese ist, sondern ein Ergebnis der verstärkten WNT-Aktivierung darstellt [16].

1.2.2 SHH-aktiviertes Medulloblastom

SHH-aktivierte MB machen 30% der MB aus [12]. Die Tumoren sind histologisch hauptsächlich vom desmoplastischen oder nodulären Typ und zeichnet sich durch eine übermäßige Aktivierung des SHH-Signalwegs aus. Hierdurch kommt es zur Expression von Cyclin D1, welches als Komplex mit *CDK*4 und 6 den Übertritt von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus bewirkt.

Bei Patienten mit SHH-aktivierten MB zeigt sich ein Gesamtüberleben nach fünf und zehn Jahren von 60 - 80% [17, 18]. SHH-aktivierte MB finden sich gehäuft in den Kleinhirnhemisphären [19]. Die SHH-Gruppe kann weiter in Tumoren mit mutiertem bzw. Wildtyp *TP53* differenziert werden, die große Unterschiede im klinischen Outcome zeigen. Bei Patienten mit *TP53*- Mutation lag das 5-Jahres-Überleben bei 41% ± 9%, während Patienten ohne *TP53*-Mutation ein 5-Jahres-Überleben von 81% ± 5 % zeigten [20]. MB mit *TP53*-Mutationen sind oft mit einer Resistenz gegenüber den konventionellen Therapieschemata vergesellschaftet und bedürfen alternativer Therapiemethoden [20-22]. *TP53*-Mutationen findet man ebenfalls in der WNT-Gruppe, scheinen jedoch dort das Outcome der Patienten nicht zu verschlechtern [23].

1.2.3 Gruppe 3 Medulloblastome

Gruppe 3 MB machen 25% der MB aus und das Alter der Patienten zum Diagnosezeitpunkt liegt zwischen drei und fünf Jahren [12]. Die Tumoren zeigen häufig Amplifikationen der *MYC*- und *OTX-2*-Protoonkogene. Die Metastasierungsrate ist in Gruppe 3 MB höher als bei den anderen Subgruppen. Auch kommt es bei Gruppe 3 MB eher zum Rezidiv fernab des ursprünglichen Tumorbettes [23-25]. Gruppe 3 Tumoren zeichnen sich durch eine ausgeprägte genomische Instabilität aus, was zu einem sehr schlechten Outcome für die Patienten führt [9, 11]. Bei Kleinkindern liegt das 5-Jahres-Überleben bei 45%, bei Kindern bei 58%. Wenn keine *MYC*-Amplifikation vorliegt, wird ein MB der Gruppe 3 hingegen entsprechend dem Standardrisiko einstuft. Im Gegensatz zu Gruppe 4 MB kommen Amplifikationen von *MYCN*- und *Cyclin-Dependent Kinase 6* (CDK6) Protoonkogenen kaum vor.

1.2.4 Gruppe 4 Medulloblastome

Gruppe 4 MB ist die am häufigsten auftretende Subgruppe mit einem Anteil von 35% [17]. Dennoch ist dieser Subtyp bisher am wenigstens molekulargenetisch genau charakterisiert. In Gruppe 4 kommen vermehrt Amplifikationen von *MYCN* und *CDK6* vor. Bei weiblichen MB-Patientinnen zeigt sich bei 80% ein Verlust eines X-Chromosoms. [11] 30% aller Patienten mit einem MB der Gruppe 4 haben zum

Diagnosezeitpunkt bereits Metastasen [11]. Das 5-Jahres-Überleben liegt bei 75%, ist jedoch abhängig vom Metastasierungsgrad und der Anwesenheit von Chromosom 11 [11, 23]. Im Gegensatz zu Gruppe 3-Tumoren haben Patienten mit Gruppe 4 MB mit Verlust von Chromosom 11 ein besseres Outcome [26]. Bei Kindern mit MB der Gruppe 4 ist die Prognose für Kinder vergleichbar der SHH-Tumoren, bei Erwachsenen jedoch ist die Prognose deutlich schlechter. Gruppe 3 und 4 MB sind sich ähnlicher als WNT und SHH MB.

1.3 Die Klinik des Medulloblastoms

Die Klinik des MB präsentiert sich in der Regel lokalisationsabhängig sowie altersabhängig [27]. Da MB zumeist im vierten Ventrikel lokalisiert sind, sind die Symptome meistens häufiges Erbrechen und wiederkehrende Kopfschmerzen. Dies ist auf den erhöhten intrakraniellen Druck zurückzuführen. In den Kleinhirnhemisphären gelegene MB gehen häufig mit einer Ataxie einher. [7]. Bei Diagnose zeigt sich oft ein Papillenödem, Nystagmen oder aber auch Läsionen von Hirnnerven, besonders häufig des N. oculomotorius, N. trochlearis und N. abducens. Bei kleineren Kindern ist die Diagnosestellung oft erschwert. Hier können motorische als auch geistige Entwicklungsverzögerungen sowie eine Zunahme des Kopfumfanges im Rahmen eines Hydrozephalus Hinweise sein. Aber auch hier können Trinkschwäche und Erbrechen Symptome sein [28]. Die WNT-Gruppe scheint als einziger Subtyp eher nicht mit einem Hydrozephalus als Symptom einherzugehen [29]. Die Vorstellung der Patienten erfolgt durch das meist große Ausmaß sowie die Schwere der Klinik bei bis zu 80% innerhalb von 12 Wochen nach dem Beginn der ersten Symptome [30]. Ein längeres Zeitfenster von ersten Symptomen bis zur Diagnose ist verbunden mit endokrinen Defiziten, Visusverlust und Schiefhaltung des Kopfes [31].

Diagnostiziert wird das MB mittels Computertomographie oder Magnetresonanztomographie (MRT) [32]. Im MRT Schädel zeigt sich eine hypointense Raumforderung in der T1-Wichtung mit heterogener Anreicherung des Kontrastmittels Gadolinium [33]. Muster im Anreicherungsverhalten von Kontrastmitteln sowie der Tumorlokalisation im MRT scheinen spezifisch je nach Subgruppe zu sein [29]. Differentialdiagnostisch kommen in der Bildgebung bei Raumforderung in der Fossa cranii posterior von Kindern auch Ependymome, pilozytische Astrozytome, Teratome und Hämangioblastome in Frage [34]. Bei der Diagnosestellung eines MB ist eine komplette Bildgebung vom Gehirn bis zum Spinalkanal indiziert, um eine Ausbreitung des MB entlang des Liquorsystems und daraus entstehende mögliche Abtropfmetastasen zu diagnostizieren.

Zur Sicherung der Diagnose durch eine Biopsie gibt es die Methode des stereotaktischen Operierens. Diese Methode benötigt jedoch eine Fixierung am Schädel, was gerade bei Kleinkindern kontraindiziert ist. Die elektromagnetische chirurgische Navigation hingegen benötigt keine Fixierung und erlaubt Bewegungen des Kopfes, welches sie jedoch unpräziser als das stereotaktische Verfahren macht [35]. Um die meningeale Dissemination nachzuweisen ist ebenfalls die Gewinnung einer Zytologie durch eine Lumbalpunktion zu empfehlen. Bei Patienten, die mit einem Hydrozephalus vorstellig werden, ist die Lumbalpunktion jedoch kontraindiziert und kann erst postoperativ durchgeführt werden [36].

1.4 Der Therapiestandard des Medulloblastoms

Der aktuelle Therapiestandard besteht aus möglichst umfassender und sicherer Resektion, kraniospinaler Radiatio sowie adjuvanter Chemotherapie [2]. Bei Tumoren mit normalem Risiko wird eine kraniospinale Bestrahlung mit 23,4 Gy benutzt mit Boosterung des Tumorbetts mit 54 Gy. Patienten werden der *High Risk*-Gruppe zugeordnet, wenn sie ein Residuum des Tumors von > 1,5 cm^2 haben, lokale oder disseminierte Metastasen vorliegen und die Liquor-Zytologie positiv ist [37]. Bei High Risk-Patienten erfolgt eine kraniospinale Bestrahlung mit bis zu 39,6 Gy mit einer Boosterung bis zu 55,8 Gy, je nach Ausmaß der Metastasierung. Das Schema der Chemotherapie besteht aus Cyclophosphamid, Vincristin und Cisplatin; das rezidivierende MB wird mit Topotecan behandelt [38]. In aktuellen Studien scheint beim Rezidiv zudem Temozolomid ein vielversprechender Therapieansatz zu sein [39]. Um das Ausmaß von Therapieschäden möglichst gering zu halten, werden strahlenreduzierte Protokolle bei Kleinkindern sowie dosisreduzierte Schemata bei Patienten, die nicht zur *High Risk*-Gruppe gehören eingesetzt.

Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit operativer Therapie liegt bei 72 ± 1%, ohne Operation reduzierte sich das Überleben auf 35 ± 6% [40]. Nach einem Rezidiv ist das mediane Überleben 10,3 Monate [41].

Die 5-Jahres-Überlebensrate der MB-Patienten liegt abhängig von Subtyp, Risikogruppe und Krankheitsausmaß bei Diagnosestellung zwischen 60 - 95% [2, 9, 24, 42]. Sobald das MB rezidiviert, sinkt das 2-Jahres-Überleben auf 9% - 18% [41, 43]. Die Haupttodesursache bei Patienten mit Medulloblastom ist die Metastasierung.

Die Subgruppe sollte bei Therapieentscheidungen sowie Risikostratifizierung hinzugezogen werden [42]. Mit Erreichen von < 1,5 cm^2 Resttumor korreliert das Ausmaß der Resektion mit dem Gesamtüberleben der Patienten. Dies ist durch die

Infiltration des Tumors in nicht-resezierbare Bereiche wie den Hirnstamm erschwert. Hinzukommend ist es zudem nicht immer möglich, das Tumorgewebe vom gesunden Hirngewebe intraoperativ zu differenzieren, was ebenfalls eine nahezu komplette Resektion verhindern kann [43]. Bei nahezu totaler Resektion ist die totale Resektion dieser, aufgrund postoperativer neurologischer Defizite, nicht überlegen, unabhängig von der Subgruppe [44].

Da das MB vor allem Kleinkinder und Kinder trifft, sollte man ebenfalls die Langzeitfolgen der aktuellen Therapieschemata betrachten. Eine bekannte Komplikation, die ein Viertel der operierten Patienten betrifft, ist das Posterior-Fossa-Syndrom. Es entsteht meist nach der Resektion von MB in der Fossa cranii posterior. Das Syndrom besteht aus reduzierter Sprache bis hin zu komplettem Mutismus, Ataxie und muskulärer Stammhypotonie. Die Symptome manifestieren sich ein bis zwei Tage nach der Operation und sind häufig assoziiert mit radikaler Resektion sowie Hirnstamminfiltration des MB. Bei Tumorresektion in der zerebellären Hemisphäre wurde das Syndrom bisher nicht beschrieben. Auch über ein Jahr nach der Resektion sind viele Patienten immer noch massiv beeinträchtigt [45, 46]. Männliche Patienten sind eher von diesem Syndrom betroffen und auch die Ausprägung des postoperativen Ödems sowie die transiente Ischämie scheinen die Entstehung des Posterior-Fossa-Syndroms zu fördern [47]. Eine neuere Studie [48] zeigt außerdem einen Zusammenhang zwischen der Subgruppe und der Entwicklung eines postoperativen Mutismus auf. Hier schienen WNT-aktivierte MB und MB der Gruppe 3 und 4 ein höheres Risiko als Patienten der SHH- Gruppe zu haben.

Bei Kindern unter einem Jahr, Erwachsenen und *High Risk*-Patienten sind die Outcomes schlecht, und viele der Patienten leiden trotz langer Überlebensdauer an den therapieinduzierten Folgen und Komplikationen der kranialen Bestrahlung und Chemotherapie. Zu diesen gehören neben neuroendokriner Dysfunktion auch neurologische und psychosoziale Defizite, Störungen der Entwicklung oder sekundäre Neoplasien [3, 49-53]. Die 10-Jahres-Rate an Sekundärtumoren liegt bei 4,2% nach Therapie. Die Zweitumoren sind häufig maligne *hochgradige* Gliome, die oft über fünf Jahre nach Behandlung des MB entstehen und diagnostiziert werden [54]. Zudem haben Patienten mit Zustand nach Radiatio ein signifikant höheres Risiko gegenüber der Normalbevölkerung, einen Schlaganfall zu bekommen [55].

Diese Therapiefolgen halten teilweise noch Jahre nach der Behandlung und der Remission an, so beispielsweise die Vincristin-induzierte periphere Neuropathie, welche oft persistiert oder sich über Monate verschlechtert [56]. Cisplatin kann ebenfalls zu einer peripheren Neuropathie führen, von der sich die Patienten nicht komplett erholen. Zudem kann Cisplatin irreversibel ototoxisch wirken und betrifft mit

dieser Nebenwirkung vor allem Kinder unter fünf Jahren, was soziale Interaktionen als auch die akademische Karriere maßgeblich einschränkt [57, 58]. Zusammen führen diese therapieinduzierten Spätfolgen zudem zu einer sozialen Isolation, die die Lebensqualität der meisten Patienten auch noch nach Jahren bis Jahrzehnte stark beeinträchtigt [59-64]. Die Therapiefolgen und insbesondere die Ausbildung von Sekundärtumoren wird mit Verbesserung der Therapiekonzepte und Verlängerung des Überlebens der Patienten immer mehr in den Mittelpunkt rücken.

Die Subgruppe des MB wechselt auch nicht bei Rezidiven, sodass die initiale Therapie entsprechend spezialisiert werden sollte, wobei bei Gruppe 3 und 4 Tumoren vor allem auf Metastasen ausgelegte Therapiemodelle evaluiert werden sollten [25]. Dennoch zeigen metastasierte MB molekulare Besonderheiten, die im Primärtumor nicht vorkommen, weswegen bei Rezidiv eine erneute Tumoruntersuchung empfehlenswert scheint [65].

1.5 5-Aminolävulinsäure-basierte photodynamische Therapie

Die photodynamische Therapie (PDT) nutzt die selektive Anreicherung eines Photosensitizers in Zellen, der durch Licht einer definierten Wellenlänge angeregt wird, wodurch es zu einer photochemischen Reaktion kommt, in deren Verlauf reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, die die entsprechenden Zellen abtöten [66-68].

1904 beschrieben Von Tappeiner und Jodblauer zum ersten Mal einen „photodynamischen Effekt“ in der topischen Anwendung von Anilinfarbstoffen, was zu einer Fluoreszenz in Protozoen führte [69, 70]. 1908 wurde der Einsatz von Hämatoporphyrin im Rahmen der Photodynamik in einer ersten Studie von Hausmann im Mausmodell berichtet. Mit Studien Anfang des 20. Jahrhunderts und bis heute wurde dann der Grundstein für die photodynamische Therapie und den heutigen Einsatz in der Tumortherapie gelegt [71-74].

1990 präsentierten Kennedy und Kollegen 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) als neuen Photosensitizer [75, 76]. 5-ALA ist ein Metabolit der Hämsynthese (Abb. 2). Nach oraler Verabreichung kann es die Blut-Hirn-Schranke passieren und wird durch die Peptidtransporter 1 und 2 ins Zytosol von Zellen transportiert. Aus zwei Molekülen 5-ALA entsteht Porphobilinogen, welches vom Zytosol über den *Adenosine Triphosphate Binding Cassette Subfamily B Member 6 (*ABCG6) Transporter in die Mitochondrien transportiert und dort über drei weitere Reaktionen zu Protoporphyrin IX (PPIX) umgewandelt wird [77-79]. Das Enzym Ferrochelatase katalysiert anschließend die Reaktion von PPIX zu Häm durch den Einbau von Eisen [80-82]. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Ein Mangel an Ferrochelatase führt bei

zahlreichen Tumorentitäten zur selektiven Anreicherung von PPIX in den Tumorzellen. Ein Gegenspieler ist das *Adenosine Triphosphate Binding Cassette Subfamily G Member 2 (*ABCG2) Transporterprotein (CD338), welches PPIX wieder aus den Zellen transportieren kann [78, 83, 84].

ABCG2 hat mehrere Ansatzpunkte für pharmakologische Substanzen. Es führt durch einen Adenosintriphosphat-abhängigen Efflux von Chemotherapeutika zudem in vielen Malignomen zur Therapieresistenz [85, 86].

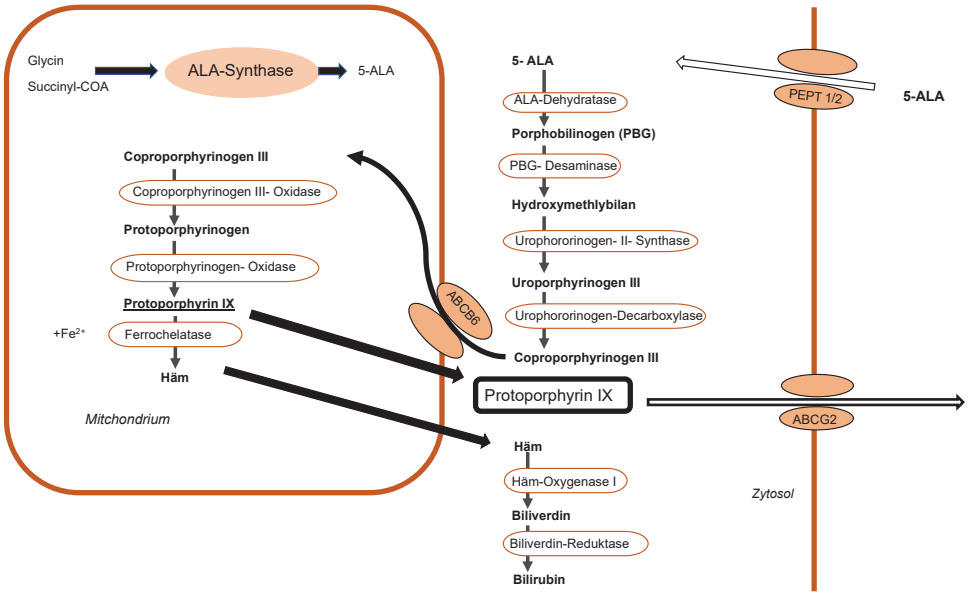

Abb. 2: Die Hämsynthese und die Verstoffwechselung von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA): 5-ALA kann durch die 5-ALA-Synthase im Mitochondrium aus Glycin und Succinyl-COA gebildet werden. Coproporphyrinogen III kann über den ABCB6-Transporter aus dem Zytosol in das Mitochondrium transportiert werden, wo es enzymatisch zu PPIX umgewandelt wird. 5-ALA gelangt nach oraler Applikation über den PEPT1- und PEPT2-Transporter in die Zelle und wird dort zu Coproporphyrogen metabolisiert. Modifiziert nach Teng et al. [87].

Bei der 5-Aminolävulinsäure-basierten photodynamischen Therapie (5-ALA/PDT) wird die selektive Anreicherung des Photosensitizers PPIX ausgenutzt, um Tumorzellen durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 635 nm abzutöten. Sie ist für verschiedene Tumorerkrankungen, wie zum Beispiel Hauttumoren, dermatologische Präkanzerosen wie aktinische Keratosen, Blasenkarzinome oder das Kolonkarzinom eine zugelassene Therapieoption [88-91]. Maßgeblich für den Erfolg und die Wirkung der 5-ALA/PDT ist das Ausmaß der PPIX-Anreicherung nach der Applikation von 5-ALA. Hierfür ist einerseits eine niedrige Aktivität der Ferrochelatase entscheidend, andererseits aber auch von Proteinen wie ABCG2, welche PPIX aus den Zellen hinaus transportieren [92]. 5-ALA besitzt dabei außerdem in der klinischen Anwendung

gegenüber anderen Photosensitizern den Vorteil einer kurzen Eliminationszeit, sodass es zu einer besseren Lebensqualität seitens der Patienten kommt und schwere Nebenwirkungen wie Hautreaktionen durch UV-Strahlung vermieden werden können [93].

Mittels spezieller Operationsmikroskope wird darüber hinaus der Einsatz von 5-ALA für die intraoperative Photodiagnostik möglich. Werden Tumoren, in welchen es nach Applikation von 5-ALA zu einer PPIX-Anreicherung kam, mit Licht im blauen Spektralbereich (400 nm) beleuchtet, emittieren die Tumorzellen rotes Licht einer Wellenlänge von 635 nm, welches zur intraoperativen Visualisierung des Tumors und hierdurch zur Verbesserung des Resektionsausmaßes genutzt werden kann. Beim Glioblastom (GBM) findet dieses Verfahren bereits Anwendung [94-96].

1.6 Anwendung der 5-ALA/PDT bei Hirntumoren

In Zellen des GBM konnte eine niedrige Aktivität der Ferrochelatase nachgewiesen werden [97], die nach 5-ALA-Applikation zu einer Anreicherung von PPIX führt und dadurch eine intraoperative Visualisierung des Tumors bei Bestrahlung mit Licht von 400 nm Wellenlänge ermöglicht. Hierdurch konnte der Anteil komplett resezierter Tumoren signifikant erhöht werden, verbunden mit einem Überlebensvorteil für die Patienten [98, 99]. Auch der Einsatz der 5-ALA/PDT in ersten klinischen Studien ist vielversprechend und deutet eine Wirksamkeit dieses Therapieansatzes beim GBM an [88, 95, 99-102]. Selbst die ansonsten für die Chemo- oder Radiotherapie resistenten GBM-Stammzellen scheinen zumindest *in vitro* sensitiv für die 5-ALA/PDT zu sein [103].

Auch für andere Hirntumoren, wie das Meningeom und Hypophysenadenom, konnte bereits dokumentiert werden, dass sie PPIX anreichern und hierdurch einerseits sensitiv für die 5-ALA/PDT werden und andererseits eine photodiagnostische intraoperative Identifizierung des Tumors möglich wird [104-106].

Für das MB wurde ebenfalls eine verringerte Aktivität der Ferrochelatase berichtet [107] und erste *Case Reports* beschreiben den Einsatz der fluoreszenzgesteuerten Chirurgie bei pädiatrischen Hirntumoren, wobei nicht für alle MB Tumoren eine PPIX-Anreicherung beobachtet wurde, die eine diagnostische Ausnutzung ermöglichte [107-109]. In einer Studie wurde des Weiteren *in vitro* die Sensitivität von MB-Zellen gegenüber einer 5-ALA-basierter PDT nachgewiesen [110].

2. Zielsetzung der Arbeit

Bisher ist nicht eindeutig geklärt, ob MB-Zellen PPIX nach der Applikation von 5-ALA anreichern und hierdurch sensitiv für eine PDT werden bzw. ob die Anreicherung photodiagnostisch ausgenutzt werden kann. Vier vorherige Veröffentlichungen weisen auf eine PPIX-Akkumulation *in vitro* hin [110-113] und drei dieser Studien zeigen auch eine Sensitivität der MB-Zellen gegenüber der PDT [110, 112, 113]. *In vivo* sind die Ergebnisse bisher jedoch noch sehr uneinheitlich. In vier *Case Reports* [107-109, 114] und zwei kleineren Studien zu pädiatrischen Hirntumoren, einschließlich des MB [115, 116], konnte eine PPIX-Fluoreszenz nur in vier von elf MB-Patienten nachgewiesen werden.

Zur genaueren Evaluierung der PPIX-Akkumulation sowie ihrer Auswirkung auf die Sensitivität der Zellen für eine PDT sollte deshalb an vier MB-Zelllinien *(zwei mit und zwei ohne Amplifikation des MYC-Gens)* die Dosis- und Zeitabhängigkeit der PPIX-Anreicherung untersucht und mit der Anreicherung in GBM-Zellen verglichen werden. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob die PPIX-Anreicherung in den MB-Zellen ggf. in ihrer Sensitivität gegenüber einer PDT-Behandlung resultiert und ob das Enzym Ferrochelatase bzw. der ABCG2 Transporter an der PPIX-Akkumulation in den MB-Zellen beteiligt sind.

3. Originalarbeit

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 189 (2018) 298–305

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Accumulation of protoporphyrin IX in medulloblastoma cell lines and sensitivity to subsequent photodynamic treatment

Anna Briel-Pump[a,b], Thomas Beez[b], Lara Ebbert[a], Marc Remke[c,d,e,f], Sandra Weinhold[a], Michael C. Sabel[b], Rüdiger V. Sorg[a,*]

[a] Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Heinrich Heine University Hospital, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany
[b] Department of Neurosurgery, Heinrich Heine University Hospital, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany
[c] Department of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Heinrich Heine University Hospital, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany
[d] Department of Neuropathology, Medical Faculty, Heinrich Heine University Hospital, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany
[e] Department of Pediatric Neuro-Oncogenomics, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany
[f] German Cancer Consortium (DKTK), partner site Essen/Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
5-ALA
Medulloblastoma
PDT
Photodiagnosis
Ferrochelatase
ABCG2

SUMMARY

Background: Medulloblastoma (MB) is the most common malignant primary brain tumor of childhood. High risk patients still have a poor outcome, and especially young patients suffer from standard therapy induced sequelae. Therefore, other therapeutic options need to be explored. In glioblastoma (GBM), application of 5-aminolaevulinic acid (5-ALA) results in selective accumulation of protoporphyrin IX (PPIX) in the tumor cells, which can be exploited during fluorescence-guided surgery to increase the extent of resection or for photodynamic therapy (PDT) induced phototoxicity. It is not entirely clear, whether MB cells accumulate PPIX and are sensitive to PDT.
Methods: Human *MYC*-amplified (Med8A and D283) and non-amplified (UW228–2 and ONS76) MB cell lines were incubated for 2, 4 or 6 h with increasing doses (0–100 μg/ml) of 5-ALA, and PPIX accumulation was determined by flow cytometry. To assess sensitivity to 5-ALA/PDT, cells were incubated with 5-ALA and subsequently exposed to laser light of 635 nm wavelength (18.75 J/cm^2). After an additional 24 h culture period, viability of cells was quantified using the WST-1 assay. Expression of ferrochelatase was detected by reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction. Ferrochelatase activity was quantified by measuring the enzymatic conversion of PPIX to zinc-protoporphyrin. Expression of the ABCG2 transporter protein CD338 was detected by flow cytometry.
Results: All MB cell lines showed a time- and dose-dependent accumulation of PPIX after exposure to exogenous 5-ALA and became sensitive to 5-ALA/PDT-induced phototoxicity. PPIX accumulation was reduced compared to U373 GBM cells at shorter incubation periods and limiting 5-ALA doses. Moreover, not all MB cells became PPIX positive and overall phototoxicity was lower in the MB cell lines. Notably, the *MYC*-amplified MB cells demonstrated a more pronounced photosensitivity compared to their non-amplified counterparts. There was no difference in expression of ferrochelatase, but enzymatic activity appeared to be reduced in the MB cells compared to U373 GBM cells, whereas CD338 was expressed on the MB cells only.
Conclusion: Medulloblastoma cell lines accumulate PPIX after application of 5-ALA and become sensitive to PDT, associated with low ferrochelatase expression and activity. Photosensitivity is more pronounced in *MYC*-amplified cell lines. In contrast to GBM cells, however, PPIX accumulation appears to be reduced, restricted to a subset of cells and associated with lower photosensitivity of the MB cell lines, possibly due to expression of the ABCG2 transporter protein CD338 on MB cells.

Abbreviations: MB, medulloblastoma; GBM, glioblastoma; 5-ALA, 5-aminolaevulinic acid; PPIX, protoporphyrin IX; PDT, photodynamic therapy; CNS, central nervous system; ZnPP, zinc-protoporphyrin; ABCG2, adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette subfamily G member 2

* Corresponding author at: Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Heinrich Heine University Medical Faculty, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany.
E-mail address: Ruediger.Sorg@med.uni-duesseldorf.de (R.V. Sorg).

https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.11.002
Received 13 September 2018; Accepted 4 November 2018
Available online 07 November 2018
1011-1344/ © 2018 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/).

1. Introduction

Medulloblastoma (MB) is a neuroepithelial, WHO grade IV primary brain tumor, located in the cerebellum and the fourth ventricle. Metastatic dissemination through the cerebrospinal fluid is detected in approximately one third of children at diagnosis. The risk of metastatic disease varies significantly between molecular subgroups and specific subtypes [1,2]. In children, MB is the most frequent malignant tumor of the central nervous system (CNS), accounting for 15–20% of pediatric CNS tumors [3,4]. The highest incidence (6–9 per million) is found in children of age 1–9; in adults it is rare (0.6 per million) [3,5]. Histologically, classic, desmoplastic-nodular, large-cell/anaplastic and MB with extensive nodularity (MBEN) subtypes can be discriminated, whereas the genetic classification of the WHO divides the tumors into wingless (WNT)-activated, sonic-hedgehog (SHH)-activated, group 3 and group 4 MB [6–10]. The current multimodal treatment combines maximal safe resection, craniospinal irradiation and chemotherapy. Due to therapy-associated sequelae, including neurological, neuroendocrine, developmental and psychosocial deficits, radiation sparing protocols are used in infants and reduced-dose protocols in standard risk children and adolescent/adult patients. Five-year survival ranges from 60 to 95%, depending on subtype and risk group [3,4,11,12].

The extent of surgical resection is a strong prognostic factor. Patients in whom gross-total resection has been achieved (residual tumor $< 1.5\,cm^2$) have superior overall survival [13], and they are stratified accordingly into standard and high risk groups, with the latter receiving intensified treatment [3,4]. However, gross-total resection is a neurosurgical challenge. Medulloblastoma frequently infiltrates adjacent vulnerable areas, including the brainstem, and clear intraoperative identification of the tumor can be difficult, increasing the risk for resection-associated morbidity. Thus, intraoperative visualization of the tumor may contribute to improve the extent of resection in MB. Moreover, in high risk patients prognosis is still poor and novel therapeutic modalities are needed.

In glioblastoma (GBM), the most frequent primary brain tumor in adults [14], 5-aminolaevulinic acid (5-ALA)-based intraoperative photodiagnosis and photodynamic therapy (PDT) [15–20] are potent diagnostic and therapeutic approaches, respectively. Supplementation with exogenous 5-ALA results in protoporphyrin IX (PPIX) accumulation in GBM cells, partially due to low ferrochelatase activity [21,22], allowing for intraoperative identification of the tumor, when exposed to light near 400 nm wavelength during fluorescence-guided surgery [15,16]. Thereby, the extent of resection can safely be increased, providing a survival benefit for the patients [16,20]. When exposed to light of 635 nm wavelength, PPIX acts as a potent photosensitizer for PDT [18,23]. Its excitation initiates a photochemical reaction, generating highly reactive oxygen species, particularly singlet oxygen, which kill the tumor cells [24]. Early clinical reports suggest that 5-ALA/PDT is feasible, safe and potentially effective in treating GBM [17,19,25].

Whether MB cells accumulate PPIX after application of 5-ALA and thereby become sensitive to PDT is not entirely clear. There are four previous reports indicating PPIX accumulation *in vitro* [26–29], with three of the studies showing also sensitivity to PDT [26,27,29]. However, *in vivo* data are conflicting. In four case reports [30–33] and two smaller studies on pediatric brain tumors, including MB [34,35], PPIX fluorescence has been observed after application of 5-ALA in 4 out of 11 patients only. To further evaluate the therapeutic potential of 5-ALA in MB, we have compared four MB cell with and without *MYC* amplification to an established GBM cell line and addressed the questions whether they accumulate PPIX, become sensitive to PDT and whether they differ in ferrochelatase expression and activity and ABCG2 (adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette subfamily G member 2; CD338) transporter protein expression.

2. Material and Methods

2.1. Cell Culture

The MB cell lines Med8A (*MYC*-amplified), UW228–2 (non-*MYC*-amplified) and ONS76 (non-*MYC*-amplified) [36] were cultured as monolayers at 37 °C and 5% CO_2 in a humidified atmosphere in high glucose DMEM medium (Gibco/ThermoFisher Scientific, Karlsruhe, Germany) supplemented with 2 mM L-glutamine (Lonza, Verviers, Belgium), 50 µg/ml gentamycin (Lonza) and 10% fetal calf serum (FCS; Gibco/ThermoFisher Scientific). The MB cell line D283 (*MYC*-amplified) [36] was cultured in supplemented (see above) MEM medium (Gibco/ThermoFisher Scientific). Cells were passaged when they reached 80–90% confluency.

The GBM cell line U373 served as positive control for all experiments. It was maintained in low glucose DMEM medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 µg/ml gentamycin (all from Lonza) and 10% FCS (Gibco/ThermoFisher Scientific).

2.2. Flow Cytometric Detection of PPIX Accumulation and CD338 Expression

Flow cytometric detection of accumulation of PPIX has been performed as described previously [37,38]. Med8A, D283, UW228–2, ONS76 and U373 cells were resuspended in DMEM or MEM medium at 1×10^5 cells/ml. They were incubated at 37 °C and 5% CO_2 for 2, 4 or 6 h with graded doses of 5-ALA (0–100 µg/ml; Merck, Darmstadt, Germany). After washing the cells with phosphate-buffered saline (PBS; Gibco/ThermoFisher Scientific), accumulation of PPIX was detected by flow cytometry (LP 670/50 nm) on a CyAn flow cytometer (Beckmann-Coulter, Krefeld, Germany) using an excitation wavelength of 405 nm.

To detect expression of CD338, cells were stained with a fluorescein-isothiocyanate-conjugated CD338-specific monoclonal antibody (clone 5D3, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and analyzed by flow cytometry on a CyAn flow cytometer.

2.3. 5-ALA/PDT Treatment

Med8A, D283, UW228-2, ONS76 and U373 cells were plated at 1×10^5 cells/ml in 100 µl supplemented, phenol red-free DMEM medium per well in 96-well flat-bottom plates (Greiner BioOne, Frickenhausen, Germany) and incubated with increasing doses of 5-ALA (0–100 µg/ml) for 4 h at 37 °C and 5% CO_2 in a final volume of 150 µl/well. Subsequently, cells were exposed to laser light of 635 nm wavelength, using a Ceralas 635 nm PDT diode laser (Biolitec, Jena, Germany) and a fiberglass probe with a diffusor lens. The distance between probe and 96-well plate was adjusted to 93 mm, resulting in an intensity of $30\,mW/cm^2$. Exposure time was set to 625 s, corresponding to a total dose of $18.75\,J/cm^2$, which has been used in previous studies for gliomas as well [39,40]. Cells exposed to laser light only or treated with 5-ALA without exposure to laser light served as negative controls.

2.4. Assessment of Viability after 5-ALA/PDT Treatment

Subsequently to 5-ALA/PDT treatment, cells were cultured for an additional 24 h at 37 °C and 5% CO_2, and viability was determined using the WST1 assay according to the instructions of the manufacturer (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The tetrazolium salt WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) is cleaved by mitochondrial dehydrogenases to form the dark red colored formazan, with the color gradation correlating with the number of viable cells. Briefly, 15 µl/well of WST-1 reagent were added and cells incubated for 30 min at 37 °C and 5% CO_2. Absorbance was measured at 450 nm wavelength using a 680XR microplate reader (BioRad, Munich, Germany). The absorbance of wells

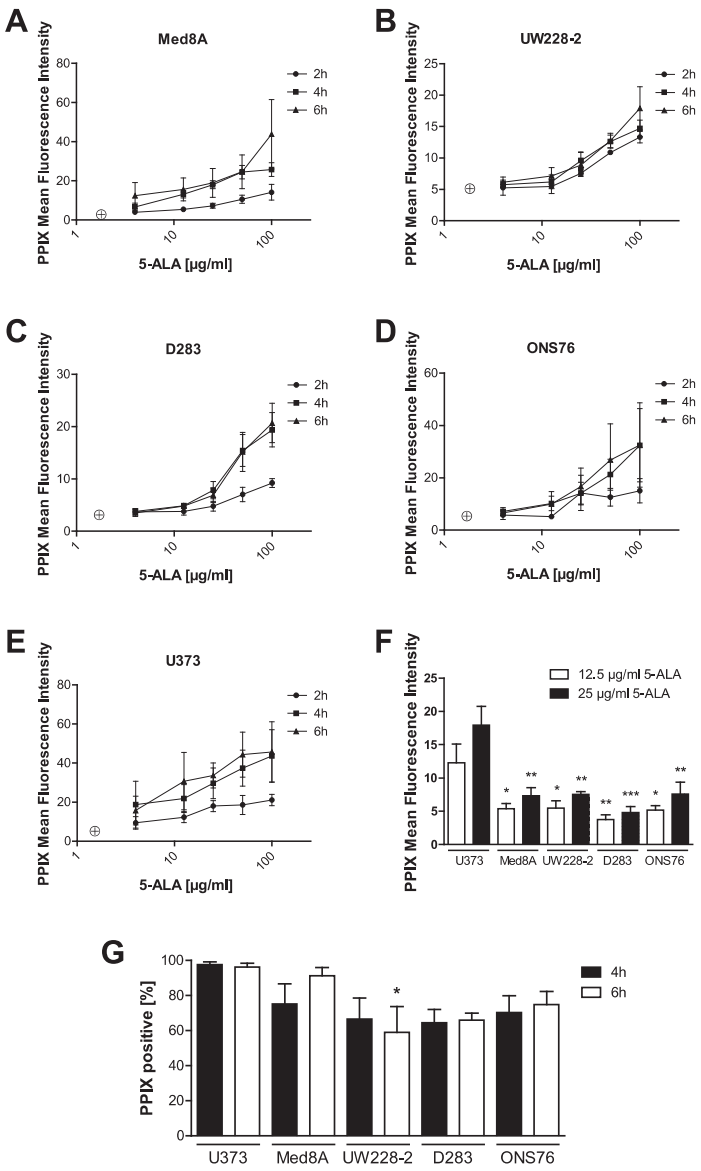

Fig. 1. Dose- and time-dependent accumulation of PPIX in MB cells after 5-ALA supplementation. The MB cell lines Med8A, UW228–2, D283 and ONS76 as well as the GBM cell line U373 were incubated with increasing doses of 5-ALA (0–100 µg/ml) for 2, 4 or 6 h (A-E), for 2 h in the presence of 12.5 or 25 µg/ml 5-ALA (F) or for 4 h and 6 h in the presence of 100 µg/ml 5-ALA (G), and the PPIX mean fluorescence intensity (MFI, A–F) and the frequency of $PPIX^+$ cells (G) were determined by flow cytometry. MFI of untreated cells is shown by ⊕. Data are shown as mean ± SEM of three independent experiments. Statistical significance for a comparison to U373 cells (F, G) is indicated. * - $p \leq .05$; ** - $p \leq .01$; *** - $p \leq .001$.

filled with medium only was subtracted to exclude background absorbance. The absorbance for untreated controls was set to 100%.

2.5. Real Time PCR Analysis of Ferrochelatase Expression

RNA of 1×10^6 cells of the Med8A, D283, UW228–2, ONS76 and U373 cell lines was isolated using the TRizol method. One µg of RNA was reverse transcribed in a final volume of 25 µl using oligo-dT (Promega, Mannheim, Germany) priming by MMLV reverse transcriptase (Promega). For quantitative polymerase chain reaction, 1 µl of cDNA was mixed with 10 µl TaqMan universal master mix II (ThermoFisher Scientific), 8 µl H_20 and 1 µl TaqMan primers. After incubation for 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C, samples were subjected to 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C on a Step One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems Instruments/ThermoFisher Scientific). TaqMan primers specific for ferrochelatase (assay ID Hs01555261_m1) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; assay ID Hs99999905_m1) transcripts were purchased from

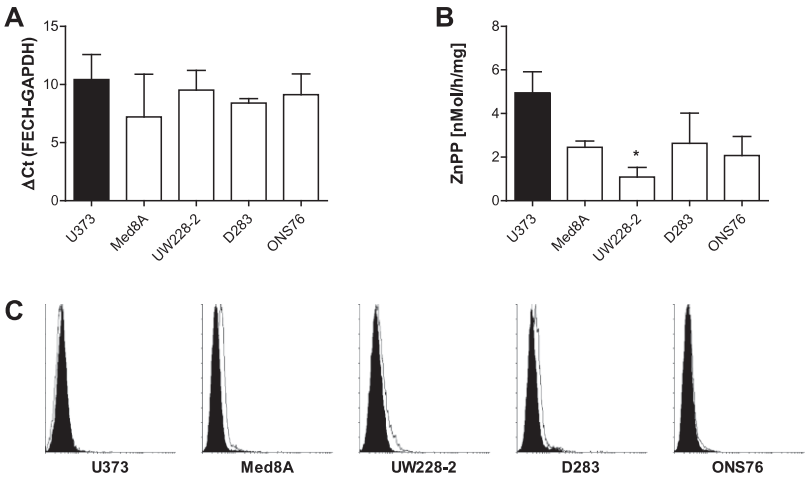

Fig. 2. Expression and activity of ferrochelatase and expression of ABCG2 transporter in MB cells. Expression of ferrochelatase in the MB cell lines Med8A, UW228–2, D283 and ONS76 as well as in the GBM cell line U373 was determined by reverse transcription/quantitative PCR analysis (A). It is shown as mean ± SEM of ΔCT values of three independent experiments performed in triplicate, with GAPDH expression serving as reference. Ferrochelatase enzymatic activity (B) was detected by optically measuring the conversion of PPIX to zinc-protoporphyrin (ZnPP) catalyzed by lysates of the cells. Values were normalized to protein content of lysates and are presented as mean ± SEM of three independent experiments. Statistical significance for a comparison to U373 cells (A, B) is indicated. * - $p \leq .05$. Expression of the ABCG2 transporter (CD338) was detected by flow cytometry (C) after staining with a CD338-specific monoclonal antibody (open histograms). Stainings with an isotype control antibody are shown as black histograms.

ThermoFisher Scientific. Cycle threshold (CT) values were determined and ΔCT values (CT(ferrochelatase) - CT(GAPDH)) calculated.

2.6. Assessment of Ferrochelatase Activity

Ferrochelatase activity of cells was determined by measuring the enzymatic catalysis of zinc-protoporphyrin (ZnPP) from PPIX by ferrochelatase [41]. Med8A, D283, UW228-2, ONS76 and U373 cells were harvested and cell pellets of at least 1×10^6 cells stored frozen at −80 °C until analysis. Cell pellets were thawed, resuspended in 148.5 µl PBS and 1.5 µl 100 mM dithiotreitol (DTT, Merck) and sonicated. Subsequently, lysates were centrifuged to remove non-soluble components. To 20 µl of cell lysate, 10 µl 1 mM zinc acetate (Merck), 5 µl Tween 80 (Merck), 5 µl 10 mM DTT, 5 µl 0.5 M 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES; Merck)/0.15 M 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS; Merck)/0.7 M tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris; Merck) pH 5.8, 3 µl 16.7 mM palmitate (Merck) and 2 µl 1.25 mM PPIX (in MES/MOPS/Tris buffer; Sigma-Aldrich; Seelze, Germany) were added. Samples were incubated for 2 h at 37 °C and the reaction stopped by adding 1950 µl of ethanol (Merck). ZnPP was measured at 550–620 nm using an excitation wavelength of 410 nm on a luminescence spectrometer (LS50B, Perkin-Elmer; Seer Green, UK).

Protein content of lysates was determined to normalize ferrochelatase activity, using the protein DC assay kit according to the instructions of the manufacturer (BioRad). Briefly, 5 µl/well of bovine serum albumin standards or lysates were mixed in 96-well flat-bottom plates (Greiner) with 25 µl/well of reagent A' (kit) and 200 µl/well of reagent B (kit). After an incubation period of 15 min at room temperature, absorption was measured at 750 nm on a microplate reader (MQX 200, BioTek Instruments; Bad Friedrichshall, Germany).

2.7. Statistical Analysis

All data represent mean ± standard error of the mean (SEM) of three independent experiments unless stated otherwise. For analysis GraphPad Prism 5.01 (GraphPad, San Diego, CA, USA) was used. Statistical tests were considered significant at $p \leq .05$. For comparison of data, one-way and two-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc multiple comparison test and the student's *t*-test were used.

3. Results

3.1. Accumulation of PPIX after Application of 5-ALA in Medulloblastoma Cells

To determine whether MB cells accumulate PPIX when subjected to exogenous 5-ALA, the MB cell lines Med8A, UW228–2, D283 and ONS76 were incubated for 2, 4 or 6 h with increasing doses of 5-ALA, and PPIX accumulation was measured by flow cytometry.

All cell lines showed a time- and dose-dependent accumulation of PPIX ($p \leq .05$; 2-way ANOVA; Fig. 1A-D). The highest accumulation was observed at 100 µg/ml after an incubation period of at least 4 h. U373 GBM cells, which served as controls, showed a similar time- and dose-dependency of PPIX accumulation (Fig. 1E). At 100 µg/ml 5-ALA, neither after 4 h nor after 6 h of incubation, a significant difference in PPIX accumulation between U373 GBM cells and the MB cell lines was observed ($p > .05$; 1-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison test). However, at low 5-ALA concentrations (12.5/25 µg/ml) or short incubation time (2 h), PPXI accumulation was significantly reduced in all MB cell lines compared U373 GBM cells (Fig. 1F).

The frequency of PPIX-positive MB cells at 100 µg/ml 5-ALA varied between 64.4 and 75.2% (4 h) and 58.9–91.2 (6 h) (Fig. 1G), but was not significantly different for any of the four cell lines between the two incubation periods ($p > .05$; students *t*-test). Compared to U373 cells (97.6 ± 1.6% and 96.2 ± 2.3% $PPIX^+$ at 4 and 6 h, respectively) frequencies were reduced, but differences reached statistical significance only for UW228–2 cells at 6 h ($p \leq .05$, $n = 3$; 1-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison test).

3.2. Expression of Ferrochelatase and ABCG2 Transporter CD338 and Ferrochelatase Enzymatic Activity in Medulloblastoma Cells

Reduced ferrochelatase has been suggested to be involved in accumulation of PPIX in GBM cells [21]. Therefore, ferrochelatase expression and activity was determined for the four MB cell lines and compared to the U373 GBM cells.

Reverse transcription/quantitative PCR analysis revealed cycle threshold (CT) values of 20.5–24.3 for the four MB cells lines and 23.3 ± 3.7 for U373 cells (n = 3). When normalized to the expression of the reference gene GAPDH, no significant differences in ΔCT values between MB cell lines and U373 were observed (1-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison test; Fig. 2A).

Ferrochelatase activity in MB cells was measured by quantifying the enzymatic conversion of PPIX to ZnPP. All MB cell lines showed a ferrochelatase activity lower than that of U373 GBM cells, although the difference reached statistical significance only for UW228–2 cells (p = .0221, n = 3, student's t-test).

The adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette subfamily G member 2 transporter protein (ABCG2, CD338) contributes to transporting PPIX out of the cells and thereby may counteract PPIX accumulation [42,43]. All four MB cell lines showed expression of CD338 on at least a subpopulation of cells, whereas CD338 could not be detected on U373 GBM cells (Fig. 2C).

3.3. Sensitivity of Medulloblastoma Cell to 5-ALA/PDT Treatment

To assess sensitivity of MB cells to 5-ALA/PDT, the MB cell lines were incubated with 25, 75 or 100 µg/ml 5-ALA for 4 h, exposed to laser light of 635 nm wavelength, and after additional 24 h of cell culture, viability of cells was determined using the WST-1 assay. Untreated cells or cells treated with laser light only or subjected to 5-ALA without laser-light exposure served as controls.

Treatment with 100 µg/ml 5-ALA alone or exposure to laser light without prior supplementation with 5-ALA had no effect on the viability of cells (Fig. 3A). However, 5-ALA/PDT was phototoxic. It resulted in a significant (1-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison test) and substantial 5-ALA-dose-dependent reduction in cell viability in all MB cell lines, except for ONS76, for which ALA/PDT reduced cell viability, but reduction did not reach statistical significance. Compared to U373 GBM cells, photosensitivity was reduced in MB cells. At 100 µg/ml 5-ALA, viability of U373 GBM cells was reduced by 79.9 ± 6.3% compared to 45.6 ± 6.2% for all MB cells combined, with reduction being significantly lower for UW228–2 (39.1 ± 1.7%; p = .003, n = 3, student's t-test) and ONS76 cells (20.1 ± 11.6%; p = .011, n = 3, student's t-test). For Med8A (57.5 ± 10.0%) and D283 cells (65.8 ± 1.6%), reduction was reduced as well, but the differences did not reach statistical significance.

When survival after 5-ALA/PDT treatment was plotted against PPIX accumulation at 0, 25, 50 and 100 µg/ml 5-ALA for all cell lines (Fig. 3B), an almost linear relationship was observed (r^2 = 0.58; $p \leq .0001$), implying that PPIX accumulation is the most important parameter for the phototoxic effect of 5-ALA/PDT in MB cells.

4. Discussion

In GBM, accumulation of PPIX after application of 5-ALA is well established and its diagnostic usefulness during fluorescence-guided surgery is well documented [15,16]. Moreover, preliminary results on PPIX as photosensitizer for PDT of GBM are promising [17,19,25]. In agreement with these observations and with previous reports [27,29], the GBM cell line U373, which was used as control, showed strong accumulation of PPIX and was highly sensitive to 5-ALA/PDT. For the four MB cell lines studied here (Med8A, UW228-2, D283, ONS76), encompassing *MYC*-amplified and non-amplified models [36], a time- and dose-dependent accumulation of PPIX after application of 5-ALA was detected as well. However, U373 GBM cells were more efficient, which became particularly apparent at limiting incubation times and 5-ALA concentrations: there was a significantly higher accumulation of PPIX in the GBM cell line than in all four MB cell lines. Similarly, Schwake et al. reported a lower accumulation of PPIX in UW228 MB cells compared to U87 GBM cells [28]. Another MB cell line tested by these authors, DAOY, suggested to represent the same molecular subgroup as the UW228 cells (SHH; [36]), revealed a higher PPIX accumulation than U87 GBM cells. Thus, there appears to be variation in PPIX accumulation between MB cell lines and in how accumulation compares to GBM cells.

These results reflect previous results of PPIX accumulation after application of 5-ALA *in vivo*. In only 4 of 11 MB patients, PPIX accumulation was detected during fluorescence-guided surgery [30–35] and was useful in 2 of 8 cases, *i.e.* led to changes in the surgical strategy or allowed intraoperative identification of the tumor [44]. Interestingly, a

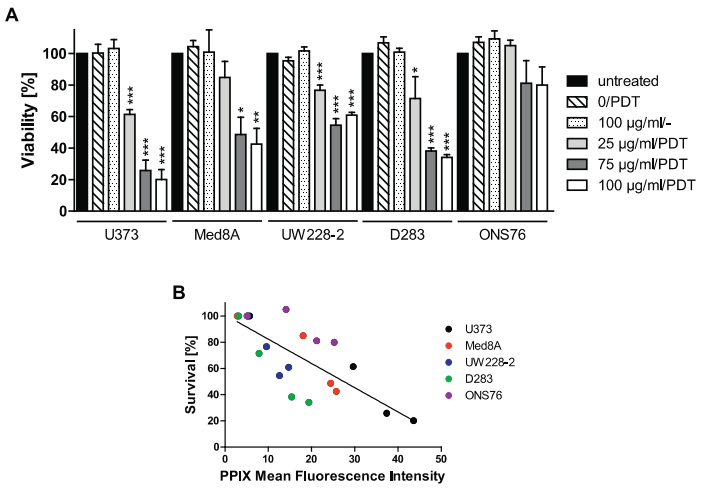

Fig. 3. Dose-dependent sensitivity of MB cells to 5-ALA/PDT induced phototoxicity. The MB cell lines Med8A, UW228-2, D283 and ONS76 were incubated with 0, 25, 75 or 100 µg/ml 5-ALA for 4 h and subsequently exposed to laser light of 635 nm wavelength (A). The GBM cell line U373 served as positive control. Viability of cells was determined after an additional 24 h culture period using the WST-1 assay. Cells exposed to laser light only (0/PDT), subjected to 100 µg/ml 5-ALA without subsequent exposure to laser light (100 µg/ml/−) and untreated cells served as controls. Data were normalized to untreated controls (100%) and are presented as mean ± SEM of three independent experiments. Statistical significance (1-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparison test) for a comparison to the respective untreated cells is indicated. * - $p \leq .05$%; ** - $p \leq .01$; *** - $p \leq .001$. Survival after 5-ALA/PDT using 0, 25, 50 or 100 µg/ml 5-ALA was plotted against the corresponding PPIX mean fluorescence intensity determined by flow cytometry and a linear regression analysis was performed (B).

patchy appearance of fluorescence has been described [31,35], and Della Puppa et al. have shown that different cellular subsets of MB may differ in PPIX accumulation [31]. When the frequency of accumulating cells was compared, in the GBM cell line nearly all cells became positive for PPIX fluorescence, whereas in the MB cell lines always a substantial part of cells remained negative even at 100 µg/ml 5-ALA, ranging from 24.8 to 35.6% and 8.8 to 41.1% of cells after 4 and 6 h incubation periods, respectively. Whether such accumulating and non-accumulating cells represent distinct cellular subsets and whether they contribute to the patchy appearance of MB tumors *in vivo* remains to be determined.

The reasons for such variations are unknown. Deficiency in ferrochelatase, which catalyzes the final step of heme biosynthesis, the insertion of ferrous iron into PPIX, appears to play a major role in PPIX accumulation in malignant cells, and down-regulation of ferrochelatase mRNA in GBM compared to normal tissue has been reported [21,22,45–47]. When ferrochelatase mRNA expression was compared between GBM and MB cell lines, no difference was observed. Enzymatic activity was even slightly lower in the MB cell lines, suggesting that differences in ferrochelatase do not account for the differences in PPIX accumulation. Nevertheless, it will be interesting to determine, whether PPIX accumulation in MB cells can be further enhanced by ferrochelatase inhibitors such as the iron chelator deferoxamine [45,46,48].

The transporter protein ABCG2 (CD338) contributes to transporting PPIX from the mitochondria to the cytosol and out of the cell and counteracts PPIX accumulation [42,43,49]. Only MB cells, but not the GBM cell line U373, expressed ABCG2, consistent with lower accumulation of PPIX in those cells. Its overall contribution to the variation of PPIX accumulation in MB requires further investigations, particularly assessment of ABCG2 expression in primary tumor tissue as well as functional and silencing studies. Nevertheless, there is evidence from another study showing expression of ABCG2 at least for the group 3 MB [50], thus, the suggested subgroup of Med8A and D283 cell lines [36], which show the highest apparent expression density of ABCG2.

Besides ferrochelatase and ABCG2 transporter, efficiency of cellular 5-ALA uptake, its metabolization towards PPIX, the availability of ferrous iron or even the formation of non-fluorescent aggregates can affect the extent of PPIX accumulation [46,49,51,52]. The contribution of each of these mechanisms to the variation in PPIX accumulation in MB cells is currently unclear. Moreover, *in vivo* there may also be differences in pharmacokinetics of 5-ALA and particularly access to the tumor tissue may be limited, *e.g.* when the blood-brain-barrier is undisturbed or capillary permeability and blood flow are low [53,54].

So far no association of PPIX accumulation and the molecular subtype or myc activity of MB cells has been observed, although the number of samples tested is low and experiments have been performed with established cell lines only, which may not fully comply with classification and may have undergone further changes.

Accumulation of PPIX in the MB cells made them sensitive to PDT-induced phototoxicity. However, photosensitivity was reduced compared to U373 GBM cells and even for the highest 5-ALA concentration used (100 µg/ml), a substantial fraction of the MB cell lines survived treatment, ranging from 34.3% (D283) to 79.9% (ONS76). Indeed, photosensitivity of MB cells appears to be directly dependent on PPIX accumulation, since survival after 5-ALA/PDT treatment and PPIX accumulation show an almost linear relationship. Thus, other factors such as oxygen concentration [55] seem to have minor influence. Previously, photosensitivity of MB cells after 5-ALA/PDT has only been reported for the UW228 and DAOY cell lines [29], with DAOY cells being more sensitive than UW228 cells. A comparison to GBM cells has not been made, but these data are in agreement with an earlier report showing higher PPIX accumulation in DAOY than in UW228 cells [28].

In summary, although the therapeutic importance of complete surgical resection of MB [3,4,13] as well as the photodiagnostic potential of PPIX accumulation in GBM are well established [15–20], efficient use of 5-ALA for photodiagnosis or PDT in MB may require further optimization of the current protocol, *e.g.* by increasing 5-ALA dose, extending the period for *in vivo* metabolization or most likely, the combination with inhibitors, which suppress ferrochelatase, ABCG2 transporters or other factors, which may counteract efficient accumulation of PPIX. Whether such approaches may also contribute to improving photodiagnosis/therapy of other pediatric brain tumors, which currently show no or only limited accumulation of PPIX after application of 5-ALA [34,35,44], needs to be determined. It is also possible that other substances such as hypericin [27] or 5-ALA-hexylester [26] will have to be used for efficient photodiagnosis and PDT of those tumors.

Acknowledgements

The authors would like to thank Brigitte Senger, Heike Krägel and Viola Kürten for excellent technical assistance.

Declaration of interests

None.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

[1] P.A. Northcott, I. Buchhalter, A.S. Morrissy, V. Hovestadt, J. Weischenfeldt, T. Ehrenberger, S. Grobner, M. Segura-Wang, T. Zichner, V.A. Rudneva, H.J. Warnatz, N. Sidiropoulos, A.H. Phillips, S. Schumacher, K. Kleinheinz, S.M. Waszak, S. Erkek, D.T.W. Jones, B.C. Worst, M. Kool, M. Zapatka, N. Jager, L. Chavez, B. Hutter, M. Bieg, N. Paramasivam, M. Heinold, Z. Gu, N. Ishaque, C. Jager-Schmidt, C.D. Imbusch, A. Jugold, D. Hubschmann, T. Risch, V. Amstislavskiy, F.G.R. Gonzalez, U.D. Weber, S. Wolf, G.W. Robinson, X. Zhou, G. Wu, D. Finkelstein, Y. Liu, F.M.G. Cavalli, B. Luu, V. Ramaswamy, X. Wu, J. Koster, M. Ryzhova, Y.J. Cho, S.L. Pomeroy, C. Herold-Mende, M. Schuhmann, M. Ebinger, L.M. Liau, J. Mora, R.E. McLendon, N. Jabado, T. Kumabe, E. Chuah, Y. Ma, R.A. Moore, A.J. Mungall, K.L. Mungall, N. Thiessen, K. Tse, T. Wong, S.J.M. Jones, O. Witt, T. Milde, A. Von Deimling, D. Capper, A. Korshunov, M.L. Yaspo, R. Kriwacki, A. Gajjar, J. Zhang, R. Beroukhim, E. Fraenkel, J.O. Korbel, B. Brors, M. Schlesner, R. Eils, M.A. Marra, S.M. Pfister, M.D. Taylor, P. Lichter, The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes, Nature 547 (2017) 311–317, https://doi.org/10.1038/nature22973.

[2] F.M.G. Cavalli, M. Remke, L. Rampasek, J. Peacock, D.J.H. Shih, B. Luu, L. Garzia, J. Torchia, C. Nor, A.S. Morrissy, S. Agnihotri, Y.Y. Thompson, C.M. Kuzan-Fischer, H. Farooq, K. Isaev, C. Daniels, B.K. Cho, S.K. Kim, K.C. Wang, J.Y. Lee, W.A. Grajkowska, M. Perek-Polnik, A. Vasiljevic, C. Faure-Conter, A. Jouvet, C. Giannini, A.A. Nageswara Rao, K.K.W. Li, H.K. Ng, C.G. Eberhart, I.F. Pollack, R.L. Hamilton, G.Y. Gillespie, J.M. Olson, S. Leary, W.A. Weiss, B. Lach, L.B. Chambless, R.C. Thompson, M.K. Cooper, R. Vibhakar, P. Hauser, M.C. van Veelen, J.M. Kros, P.J. French, Y.S. Ra, T. Kumabe, E. Lopez-Aguilar, K. Zitterbart, J. Sterba, G. Finocchiaro, M. Massimino, E.G. Van Meir, S. Osuka, T. Shofuda, A. Klekner, M. Zollo, J.R. Leonard, J.B. Rubin, N. Jabado, S. Albrecht, J. Mora, T.E. Van Meter, S. Jung, A.S. Moore, A.R. Hallahan, J.A. Chan, D.P.C. Tirapelli, C.G. Carlotti, M. Fouladi, J. Pimentel, C.C. Faria, A.G. Saad, L. Massimi, L.M. Liau, H. Wheeler, H. Nakamura, S.K. Elbabaa, M. Perezpena-Diazconti, F. Chico Ponce De Leon, S. Robinson, M. Zapotocky, A. Lassaletta, A. Huang, C.E. Hawkins, U. Tabori, E. Bouffet, U. Bartels, P.B. Dirks, J.T. Rutka, G.D. Bader, J. Reimand, A. Goldenberg, V. Ramaswamy, M.D. Taylor, Intertumoral heterogeneity within medulloblastoma subgroups, Cancer Cell 31 (2017), https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.005 737–754 e736.

[3] M. Massimino, V. Biassoni, L. Gandola, M.L. Garre, G. Gatta, F. Giangaspero, G. Poggi, S. Rutkowski, Childhood medulloblastoma, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 105 (2016) 35–51, https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.05.012.

[4] S. Khatua, A. Song, D.C. Sridhar, S.C. Mack, Childhood medulloblastoma: current therapies, emerging molecular landscape and newer therapeutic insights, Curr. Neuropharmacol. 14 (2018) 1–14, https://doi.org/10.2174/1570159X15666171129111324.

[5] N.R. Smoll, K.J. Drummond, The incidence of medulloblastomas and primitive neurectodermal tumours in adults and children, J. Clin. Neurosci. 19 (2012) 1541–1544, https://doi.org/10.1016/j.jocn.2012.04.009.

[6] M.D. Taylor, P.A. Northcott, A. Korshunov, M. Remke, Y.J. Cho, S.C. Clifford, C.G. Eberhart, D.W. Parsons, S. Rutkowski, A. Gajjar, D.W. Ellison, P. Lichter, R.J. Gilbertson, S.L. Pomeroy, M. Kool, S.M. Pfister, Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus, Acta Neuropathol. 123 (2012) 465–472, https://doi.org/10.1007/s00401-011-0922-z.

[7] M. Remke, T. Hielscher, P.A. Northcott, H. Witt, M. Ryzhova, A. Wittmann,

A. Benner, A. von Deimling, W. Scheurlen, A. Perry, S. Croul, A.E. Kulozik, P. Lichter, M.D. Taylor, S.M. Pfister, A. Korshunov, Adult medulloblastoma comprises three major molecular variants, J. Clin. Oncol. 29 (2011) 2717–2723, https://doi.org/10.1200/JCO.2011.34.9373.
[8] M. Remke, T. Hielscher, A. Korshunov, P.A. Northcott, S. Bender, M. Kool, F. Westermann, A. Benner, H. Cin, M. Ryzhova, D. Sturm, H. Witt, D. Haag, G. Toedt, A. Wittmann, A. Schottler, A.O. von Bueren, A. von Deimling, S. Rutkowski, W. Scheurlen, A.E. Kulozik, M.D. Taylor, P. Lichter, S.M. Pfister, FSTL5 is a marker of poor prognosis in non-WNT/non-SHH medulloblastoma, J. Clin. Oncol. 29 (2011) 3852–3861, https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.2798.
[9] V. Ramaswamy, M. Remke, E. Bouffet, S. Bailey, S.C. Clifford, F. Doz, M. Kool, C. Dufour, G. Vassal, T. Milde, O. Witt, K. von Hoff, T. Pietsch, P.A. Northcott, A. Gajjar, G.W. Robinson, L. Padovani, N. Andre, M. Massimino, B. Pizer, R. Packer, S. Rutkowski, S.M. Pfister, M.D. Taylor, S.L. Pomeroy, Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus, Acta Neuropathol. 131 (2016) 821–831, https://doi.org/10.1007/s00401-016-1569-6.
[10] 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, https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1.
[11] V. Ramaswamy, M.D. Taylor, Medulloblastoma: from myth to molecular, J. Clin. Oncol. 35 (2017) 2355–2363, https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.7842.
[12] E.C. Schwalbe, J.C. Lindsey, S. Nakjang, S. Crosier, A.J. Smith, D. Hicks, G. Rafiee, R.M. Hill, A. Iliasova, T. Stone, B. Pizer, A. Michalski, A. Joshi, S.B. Wharton, T.S. Jacques, S. Bailey, D. Williamson, S.C. Clifford, Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study, Lancet Oncol. 18 (2017) 958–971, https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30243-7.
[13] P.M. Zeltzer, J.M. Boyett, J.L. Finlay, A.L. Albright, L.B. Rorke, J.M. Milstein, J.C. Allen, K.R. Stevens, P. Stanley, H. Li, J.H. Wisoff, J.R. Geyer, P. McGuire-Cullen, J.A. Stehbens, S.B. Shurin, R.J. Packer, Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study, J. Clin. Oncol. 17 (1999) 832–845, https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.3.832.
[14] 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-Oncology 16 (2014) 896–913, https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087.
[15] W. Stummer, H.J. Reulen, T. Meinel, U. Pichlmeier, W. Schumacher, J.C. Tonn, V. Rohde, F. Oppel, B. Turowski, C. Woiciechowsky, K. Franz, T. Pietsch, A.L.-G.S. Group, Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias, Neurosurgery 62 (2008) 564–576, https://doi.org/10.1227/01.neu.0000317304.31579.17.
[16] W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O.D. Wiestler, F. Zanella, H.J. Reulen, Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial, Lancet Oncol. 7 (2006) 392–401, https://doi.org/10.1016/s1470-2045(06)70665-9.
[17] W. Stummer, T. Beck, W. Beyer, J.H. Mehrkens, A. Obermeier, N. Etminan, H. Stepp, J.C. Tonn, R. Baumgartner, J. Herms, F.W. Kreth, Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report, J. Neuro-Oncol. 87 (2008) 103–109, https://doi.org/10.1007/s11060-007-9497-x.
[18] B. Olzowy, C.S. Hundt, S. Stocker, K. Bise, H.J. Reulen, W. Stummer, Photoirradiation therapy of experimental malignant glioma with 5-aminolevulinic acid, J. Neurosurg. 97 (2002) 970–976, https://doi.org/10.3171/jns.2002.97.4.0970.
[19] 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 glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX, Lasers Surg. Med. 39 (2007) 386–393, https://doi.org/10.1002/lsm.20507.
[20] J. Guyotat, J. Pallud, X. Armoiry, V. Pavlov, P. Metellus, 5-Aminolevulinic acid-protoporphyrin ix fluorescence-guided surgery of high-grade gliomas: a systematic review, Adv. Tech. Stand. Neurosurg. (2016) 61–90, https://doi.org/10.1007/978-3-319-21359-0_3.
[21] 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 fluorescence and photodynamic therapy efficacy, Br. J. Cancer 104 (2011) 798–807, https://doi.org/10.1038/bjc.2011.12.
[22] 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 IX fluorescence and photodynamic therapy, Photochem. Photobiol. 91 (2015) 923–930, https://doi.org/10.1111/php.12454.
[23] B. Krammer, K. Plaetzer, ALA and its clinical impact, from bench to bedside, Photochem. Photobiol. Sci. 7 (2008) 283–289, https://doi.org/10.1039/b712847a.
[24] 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, https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00030-X.
[25] M.S. Eljamel, C. Goodman, H. Moseley, ALA and Photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre phase III randomised controlled trial, Lasers Med. Sci. 23 (2008) 361–367, https://doi.org/10.1007/s10103-007-0494-2.
[26] E.S. Chu, T.K. Wong, C.M. Yow, Photodynamic effect in medulloblastoma: down-regulation of matrix metalloproteinases and human telomerase reverse transcriptase expressions, Photochem. Photobiol. Sci. 7 (2008) 76–83, https://doi.org/10.1039/b703417b.
[27] R. Ritz, C. Scheidle, S. Noell, F. Roser, M. Schenk, K. Dietz, W.S. Strauss, In vitro comparison of hypericin and 5-aminolevulinic acid-derived protoporphyrin IX for photodynamic inactivation of medulloblastoma cells, PLoS One 7 (2012) e51974, , https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051974.
[28] M. Schwake, D. Gunes, M. Kochling, A. Brentrup, J. Schroeteler, M. Hotfilder, M.C. Fruehwald, W. Stummer, C. Ewelt, Kinetics of porphyrin fluorescence accumulation in pediatric brain tumor cells incubated in 5-aminolevulinic acid, Acta Neurochir. 156 (2014) 1077–1084, https://doi.org/10.1007/s00701-014-2096-7.
[29] M. Schwake, A. Nemes, J. Dondrop, J. Schroeteler, S. Schipmann, V. Senner, W. Stummer, C. Ewelt, In-vitro use of 5-ALA for photodynamic therapy in pediatric brain tumors, Neurosurgery (2018), https://doi.org/10.1093/neuros/nyy054.
[30] G.M. Barbagallo, F. Certo, K. Heiss, V. Albanese, 5-ALA fluorescence-assisted surgery in pediatric brain tumors: report of three cases and review of the literature, Br. J. Neurosurg. 28 (2014) 750–754, https://doi.org/10.3109/02688697.2014.913779.
[31] A. Della Puppa, G. Gioffre, M.P. Gardiman, C. Frasson, D. Cecchin, R. Scienza, L. Persano, Intra-operative 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced fluorescence of medulloblastoma: phenotypic variability and CD133(+) expression according to different fluorescence patterns, Neurol. Sci. 35 (2014) 99–102, https://doi.org/10.1007/s10072-013-1597-0.
[32] S. Eicker, S. Sarikaya-Seiwert, A. Borkhardt, K. Gierga, B. Turowski, H.J. Heiroth, H.J. Steiger, W. Stummer, ALA-induced porphyrin accumulation in medulloblastoma and its use for fluorescence-guided surgery, Cent. Eur. Neurosurg. 72 (2011) 101–103, https://doi.org/10.1055/s-0030-1252010.
[33] J. Skjoth-Rasmussen, L. Bogeskov, A. Sehested, C. Klausen, H. Broholm, K. Nysom, The use of 5-ALA to assist complete removal of residual non-enhancing part of childhood medulloblastoma: a case report, Childs Nerv. Syst. 31 (2015) 2173–2177, https://doi.org/10.1007/s00381-015-2762-y.
[34] T. Beez, S. Sarikaya-Seiwert, H.J. Steiger, D. Hanggi, Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of brain tumors in children–a technical report, Acta Neurochir. 156 (2014) 597–604, https://doi.org/10.1007/s00701-014-1997-9.
[35] M. Preuss, C. Renner, W. Krupp, H. Christiansen, L. Fischer, A. Merkenschlager, W. Kiess, W. Muller, N. Manzo, J. Meixensberger, U. Nestler, The use of 5-aminolevulinic acid fluorescence guidance in resection of pediatric brain tumors, Childs Nerv. Syst. 29 (2013) 1263–1267, https://doi.org/10.1007/s00381-013-2159-8.
[36] D.P. Ivanov, B. Coyle, D.A. Walker, A.M. Grabowska, In vitro models of medulloblastoma: choosing the right tool for the job, J. Biotechnol. 236 (2016) 10–25, https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.028.
[37] A. Schimanski, L. Ebbert, M.C. Sabel, G. Finocchiaro, K. Lamszus, C. Ewelt, N. Etminan, J.C. Fischer, R.V. Sorg, 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 163 (2016) 203–210, https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.043.
[38] J.F. Cornelius, L. Eismann, L. Ebbert, B. Senger, A.K. Petridis, M.A. Kamp, R.V. Sorg, H.J. Steiger, 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy of chordoma: in vitro experiments on a human tumor cell line, Photodiagn. Photodyn. Ther. 20 (2017) 111–115, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.09.011.
[39] N. Etminan, 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, https://doi.org/10.1038/bjc.2011.327.
[40] 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, Lab. Invest. J. Neurosurg. 115 (2011) 281–288, https://doi.org/10.3171/2011.3.JNS10434.
[41] A.V. Nunn, P. Norris, J.L. Hawk, T.M. Cox, Zinc chelatase in human lymphocytes: detection of the enzymatic defect in erythropoietic protoporphyria, Anal. Biochem. 174 (1988) 146–150, https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90529-5.
[42] T. Ishikawa, K. Takahashi, N. Ikeda, Y. Kajimoto, Y. Hagiya, S.I. Ogura, S.I. 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, https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3030615.
[43] H. Kobuchi, K. Moriya, T. Ogino, H. Fujita, K. Inoue, T. Shuin, T. Yasuda, K. Utsumi, T. Utsumi, Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation, PLoS One 7 (2012) e50082, , https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050082.
[44] W. Stummer, F. Rodrigues, P. Schucht, M. Preuss, D. Wiewrodt, U. Nestler, M. Stein, J.M. Artero, N. Platania, J. Skjoth-Rasmussen, A. Della Puppa, J. Caird, S. Cortnum, S. Eljamel, C. Ewald, L. Gonzalez-Garcia, A.J. Martin, A. Melada, A. Peraud, A. Brentrup, T. Santarius, H.H. Steiner, Predicting the "usefulness" of 5-ALA-derived tumor fluorescence for fluorescence-guided resections in pediatric brain tumors: a European survey, Acta Neurochir. 156 (2014) 2315–2324, https://doi.org/10.1007/s00701-014-2234-2.
[45] Y. Ohgari, Y. Nakayasu, S. Kitajima, M. Sawamoto, H. Mori, O. Shimokawa, H. Matsui, S. Taketani, Mechanisms involved in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin, Biochem. Pharmacol. 71 (2005) 42–49, https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.019.
[46] K. Inoue, T. Karashima, M. Kamada, T. Shuin, A. Kurabayashi, M. Furihata, H. Fujita, K. Utsumi, J. Sasaki, Regulation of 5-aminolevulinic acid-mediated

protoporphyrin IX accumulation in human urothelial carcinomas, Pathobiology 76 (2009) 303–314, https://doi.org/10.1159/000245896.
[47] W. Kemmner, K. Wan, S. Ruttinger, B. Ebert, R. MacDonald, U. Klamm, K.T. Moesta, Silencing of human ferrochelatase causes abundant protoporphyrin-IX accumulation in colon cancer, FASEB J. 22 (2008) 500–509, https://doi.org/10.1096/fj.07-8888com.
[48] H. Fukuhara, K. Inoue, A. Kurabayashi, M. Furihata, H. Fujita, K. Utsumi, J. Sasaki, T. Shuin, The inhibition of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action for prostate cancer, Photodiagn. Photodyn. Ther. 10 (2013) 399–409, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.03.003.
[49] Y. Hagiya, H. Fukuhara, K. Matsumoto, Y. Endo, M. Nakajima, T. Tanaka, I. Okura, A. Kurabayashi, M. Furihata, K. Inoue, T. Shuin, S. Ogura, Expression levels of PEPT1 and ABCG2 play key roles in 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced tumor-specific protoporphyrin IX (PpIX) accumulation in bladder cancer, Photodiagn. Photodyn. Ther. 10 (2013) 288–295, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.02.001.
[50] M. Morfouace, S. Cheepala, S. Jackson, Y. Fukuda, Y.T. Patel, S. Fatima, D. Kawauchi, A.A. Shelat, C.F. Stewart, B.P. Sorrentino, J.D. Schuetz, M.F. Roussel, ABCG2 transporter expression impacts group 3 medulloblastoma response to chemotherapy, Cancer Res. 75 (2015) 3879–3889, https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0030.
[51] R.C. Krieg, S. Fickweiler, O.S. Wolfbeis, R. Knuechel, Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro, Photochem. Photobiol. 72 (2000) 226–233, https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)0720226CTSPIM2.0.CO2.
[52] H. Schneckenburger, A. Ruck, B. Bartos, R. Steiner, Intracellular distribution of photosensitizing porphyrins measured by video-enhanced fluorescence microscopy, J. Photochem. Photobiol. B 2 (1988) 355–363, https://doi.org/10.1016/1011-1344(88)85054-1.
[53] P.C. Warnke, K. Kopitzki, J. Timmer, C.B. Ostertag, Capillary physiology of human medulloblastoma: impact on chemotherapy, Cancer 107 (2006) 2223–2227, https://doi.org/10.1002/cncr.22212.
[54] H. Wolburg, S. Noell, P. Fallier-Becker, A.F. Mack, K. Wolburg-Buchholz, The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma, Mol. Asp. Med. 33 (2012) 579–589, https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.02.003.
[55] A.P. Castano, P. Mroz, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy and anti-tumour immunity, Nat. Rev. Cancer 6 (2006) 535–545, https://doi.org/10.1038/nrc1894.

4. Diskussion

4.1 Protoporphyrin IX-Akkumulation in Medulloblastomzellen mit verringerter Ferrochelataseexpression und -aktivität

Die Akkumulation von PPIX nach Verabreichung von 5-ALA ist im GBM gut dokumentiert und der diagnostische Nutzen im Rahmen der fluoreszenzgesteuerten Operation wurde berichtet [96, 98, 99]. Erste Ergebnisse der Anwendung der 5-ALA/PDT beim GBM, welche PPIX als Photosensitizer nutzt, sind vielversprechend [88, 95, 117, 118]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen und vorherigen Studien [111] zeigte die hier als Kontrolle benutzte GBM-Zelllinie U373 eine ausgeprägte Akkumulation von PPIX und Sensitivität für die 5-ALA/PDT. In „*Accumulation of protoporphyrin IX in medulloblastoma cell lines and sensitivity to subsequent photodynamic treatment*“ konnte dargestellt werden, dass die vier untersuchten MB-Zelllinien (Med8A, UW228-2, D283 und ONS76) [119] nach der Verabreichung von 5-ALA eine zeit- und dosisabhängige Akkumulation von PPIX zeigen. Die U373 GBM-Zellen waren jedoch in der Anreicherung effizienter. Sie zeigten eine signifikant höhere PPIX-Akkumulation als alle vier MB-Zelllinien. Dies wurde vor allem bei kürzeren Inkubationszeiten und geringeren 5-ALA-Dosen deutlich. Darüber hinaus wurden unter den hier verwendeten Bedingungen nicht alle Zellen der MB-Zelllinien PPIX positiv.

Ähnliche Ergebnisse haben Schwake et al. beim Vergleich von U87 GBM-Zellen mit der UW228 MB-Zelllinie berichtet [113]. Die gleichen Autoren untersuchten in diesem Rahmen auch die MB-Zelllinie DAOY, welche die gleiche molekulare (SSH-aktiviert) Subgruppe [119] wie UW228 repräsentiert. DAOY MB-Zellen zeigten eine höhere PPIX-Akkumulation als U87 GBM-Zellen [113]. Es scheint also eine Variation der PPIX-Akkumulation zwischen MB-Zelllinien an sich zu geben. In verschiedenen Arbeiten wurde bereits auf eine inhomogene PPIX-Akkumulation beim MB *in vivo* hingewiesen. Von insgesamt zwölf Patienten zeigten nur vier eine PPIX-Akkumulation [108, 109, 114-116, 120], die sich während der fluoreszenzgesteuerten Resektion detektieren ließ und nur in zwei von acht Fällen führte dies zur Änderung der operativen Strategie oder zur optischen Identifizierung des Tumors intraoperativ [121]. Bei pädiatrischen Hirntumoren berichtete eine retrospektive Studie, dass nur in 28 von 78 Patienten eine nützliche Fluoreszenz im Rahmen der fluoreszenzgesteuerten Resektion vorlag. 50% der Medulloblastome zeigten in dieser Studie keine Fluoreszenz [122]. Worauf diese Unterschiede zurückzuführen sind, ist derzeit noch unklar. Della Puppa und Kollegen [109] zeigten, dass unterschiedliche Subgruppen des MB PPIX unterschiedlich akkumulieren, eine Beobachtung, die hier für die 5-

ALA/PDT-Sensitivität, nicht jedoch die PPIX-Akkumulation, bestätigt werden konnte. Eine Assoziation des Ausmaßes der PPIX-Akkumulation mit bestimmten Subgruppen des MB bedarf weiterer sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen.

Auch ist es noch unklar, ob sich die leptomeningeale Dissemination des MB durch 5-ALA darstellen lässt, d.h. ob es lokalisationsabhängige Effekte auf die Anreicherung gibt. In einem *Case Report* zur Dissemination bei einem spinalen Gliom konnte durch Fluoreszenz nach Applikation von 5-ALA der leptomeningeale Befall deutlich dargestellt werden [123]. Für das MB stehen entsprechende Daten noch aus. Da es nach leptomeningealer Metastasierung keinen festgelegten Therapiestandard gibt, sie aber einen großen überlebenslimitierenden Faktor darstellt, sollten entsprechende Studien initiiert werden.

Die MB-Zelllinie D283 wird als repräsentativ für das metastasierte MB angesehen [124]. Hier konnte gezeigt werden, dass D283-Zellen PPIX akkumulieren. Somit könnte die 5-ALA-basierte Photodiagnose oder photodynamische Therapie einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt für das metastasierte MB darstellen. Bei zerebralen Metastasen wurde von Kamp und Kollegen die These aufgestellt, dass das Ausmaß der PPIX-Fluoreszenz direkt mit der lokalen Tumorfreiheit sowie dem Gesamtüberleben der Patienten korreliert und vielleicht sogar als prognostischer Marker in Betracht kommt [125]. Die Verabreichung von 5-ALA und die dadurch bedingte Akkumulation von PPIX in den Tumorzellen konnte beim GBM in einer Studie sogar die Kontrastmittelanreicherung im MRT verbessern [126]. Für das MB fehlen entsprechende Daten noch, aber auch beim MB könnte nicht nur die 5-ALA-basierte intraoperative Identifizierung des Tumors, sondern auch eine verbesserte Darstellung des Tumorvolumens in der Bildgebung einen therapeutischen Vorteil bieten, da dadurch die Resektion verbessert und gegebenenfalls zurückbleibende Tumorresiduen vermieden und damit die Zugehörigkeit der Patienten zur *High Risk*-Gruppe verhindert werden könnte.

Schon in vielen vorangegangenen Studien zeigten sich Probleme, *In-vitro*-Modelle auf die *In-vivo*-Situation zu übertragen. Bei Hypophysenadenomen und GBM war die Aufnahme von 5-ALA und PPIX-Akkumulation in den Zellen *in vitro* und *in vivo* sehr unterschiedlich, wodurch die Dosisfindung für den Einsatz im klinischen Alltag erschwert wurde. Beim GBM und Hypophysenadenom zeigte sich schließlich eine Dosis von 20 mg/kg/Körpergewicht am praktikabelsten [95, 127]. Ob diese Dosis auf das MB übertragbar ist, ist zweifelhaft, da im *In-vitro*-Modell bereits höhere Dosierungen von 5-ALA als beim GBM nötig waren. Eine zu geringe Dosierung bei den vorangegangenen Studien könnte die inhomogene intraoperative Darstellung der MB bei fluoreszenzgesteuerten Operationen erklären. Auch sind andere Störfaktoren mit

einzubeziehen. Bei spektrometrischen Messungen in der Studie zu Meningeomen von Knipps et. al. zeigte sich durch Verunreinigungen wie Blutauflagerung die PPIX-Fluoreszenz verringert bis nicht nachweisbar [104]. Zudem sollte bei der 5-ALA-basierten Resektion immer auf die technisch ausgereiftesten Visualisierungsverfahren zurückgegriffen werden, da diese die Identifizierung und damit das Ausmaß der Resektion verbessern können [128].

Im GBM konnte bereits eine verringerte Expression der Ferrochelatase im Vergleich zu gesundem Gewebe beobachtet werden [92]. In dieser Arbeit wurden die mRNA-Expression und die enzymatische Aktivität der Ferrochelatase zwischen MB- und GBM-Zellen verglichen. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Expression. Die Ferrochelatase-Aktivität war im Vergleich zu U373 bei allen MB-Zelllinien verringert, obwohl dieser Unterschied nur für UW228-2 statistische Signifikanz erreichte. Eine verminderte Ferrochelataseaktivität, als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Hämbiosynthese, trägt maßgeblich zur PPIX-Akkumulation in bösartigen Zellen bei [81, 91, 97, 129]. Dies scheint auch für das MB zuzutreffen. Entsprechend bieten Ferrochelataseinhibitoren wie Deferoxamin, ein Chelatbildner mit einer hohen Affinität für dreiwertiges Eisen [130], einen möglichen Angriffspunkt für die Verstärkung der PPIX-Akkumulation im MB. Deferoxamin zeigte beim GBM bisher gute Ergebnisse bei vertretbaren Nebenwirkungen [131] und es wird bereits bei anderen Malignomen erprobt [91, 132, 133]. Ein Zusammenhang zwischen Ausmaß der PPIX-Akkumulation und Ferrochelatase-Expression/-Aktivität der MB-Zelllinien konnte jedoch nicht festgestellt werden, so dass die Akkumulation noch von weiteren Faktoren beeinflusst zu werden scheint.

4.2 Medulloblastomzellen reagieren sensitiv auf eine 5-Aminolävulinsäure basierte photodynamische Therapie

Nachdem die MB-Zelllinien mit unterschiedlichen 5-ALA-Dosen für vier Stunden inkubiert worden waren, wurden sie mit Licht von 635 nm Wellenlänge bestrahlt. Nach 24 Stunden wurde mittels des WST-1-Assays die Zellvitalität bestimmt. Das leicht rote Tetrazoliumsalz WST-1 wird von der mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase zu dem dunkelroten Formazan umgewandelt. Das Ausmaß der Umsetzung korreliert mit der Anzahl der lebenden, stoffwechselaktiven Zellen [134]. Es zeigte sich eine signifikante 5-ALA-abhängige Reduktion der Zellvitalität bei allen MB-Zelllinien außer ONS76. Im Gegensatz zu U373 GBM-Zellen war die Photosensitivität

jedoch vermindert. Selbst bei der höchsten 5-ALA-Konzentration von 100 µg/ml war ein Teil der MB-Zellen auch nach Behandlung weiterhin vital.

Bisher wurde nur für die MB-Zelllinien UW228 und DAOY eine Photosensitivität nach 5-ALA/PDT berichtet, wobei die DAOY-Zellen sensitiver waren als UW228-Zellen [110, 113]. Ein Vergleich zu GBM-Zellen fand nicht statt. DAOY und UW228 wurden bisher nur unzureichend molekulargenetisch charakterisiert [135, 136]. Eine eindeutige Zuordnung zu einer der molekularen Subgruppe des MB ist nur bedingt möglich. Die Daten von Higdon und Kollegen legen jedoch nahe, dass DAOY der SHH-Subgruppe zuzuordnen ist, während UW228 am ehesten der WNT-Subgruppe zugehörig scheint [137]. Bei Zelllinien müssen solche Ergebnisse jedoch mit Vorsicht betrachtet werden, da die molekularen Veränderungen während der Kultur der Zelllinien entstanden sein können und insgesamt selten die Veränderungen abbilden, wie sie in den Primärtumoren gefunden werden. Ob Subtypunterschiede für die 5-ALA/PDT-Photosensitivität von Bedeutung sind, ist bisher noch unbekannt. Auffällig ist, dass die sensitivere Zelllinie DAOY auch eine höhere PPIX-Akkumulation zeigt. Dies ist in Übereinstimmung mit den hier erhobenen Daten: Die Photosensitivität der MB-Zellen zeigte eine direkte und lineare Abhängigkeit von der PPIX-Akkumulation. Andere Faktoren wie die Sauerstoffkonzentration, die den phototoxischen Effekt beeinflussen können [138], scheinen eher einen geringeren Einfluss zu haben.

4.3 Die Inhibition des ABCG2 Transporters zur Potenzierung der 5-ALA/PDT Wirksamkeit

Neben der niedrigen Ferrochelataseaktivität ist die Expression des ABCG2 Transporters, welcher am Transport von PPIX aus der Zelle beteiligt ist [78, 83, 84], ein weiterer Mechanismus, der die PPIX-Akkumulation beeinflussen kann. Im Gegensatz zu U373 zeigten alle MB-Zelllinien eine Expression des ABCG2 Transporterproteins, passend zu deren geringerer PPIX-Akkumulation und damit auch deren reduzierter Photosensitivität. Unterschiede in ABCG2 könnten auch die heterogene Anreichung von PPIX im Rahmen der fluoreszenzgesteuerten Operationsverfahren *in vivo* [83, 84] und die hier beobachteten Unterschiede in der PPIX-Anreicherung und Photosensitivität der MB-Zelllinien erklären. Die Abklärung einer Beteiligung von ABCG2 bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen, z.B. unter der Verwendung von ABCG2-Inhibitoren.

Möglicherweise bieten ABCG2-Inhibitoren in Kombination mit der 5-ALA/PDT beim MB einen vielversprechenden Therapieansatz zur Potenzierung der Wirkung [139]. ABCG2-Inhibitoren wie Verapamil und Imatinib sind zur Verstärkung der Wirkung der

5-ALA/PDT in malignen Gliomen bereits in einer ersten Studie erprobt worden [83]. Gaber und Kollegen konnten beim GBM durch den Einsatz des Inhibitors Ko143 ebenfalls die Verringerung der PPIX-Akkumulation durch einen ABCG2-vermittelten Efflux blockieren [140]. Die Anwendung von Ko143 resultierte bei diversen Tumorzellen bereits in einer verstärkten Akkumulation von PPIX, und in einer Studie zum triplenegativen Mammakarzinom konnte die Sensitivität gegenüber 5-ALA/PDT durch die Verabreichung von Ko143 wiederhergestellt werden [141]. Bei Studien mit Ko143 sollte jedoch immer beachtet werden, dass Ko143 nicht nur ABCG2 inhibiert [142]. Morfouace und Kollegen konnten bereits zeigen, dass in Gruppe 3 MB verstärkt ABCG2 nachzuweisen ist und die Sensitivität gegenüber Topotecan nach Gabe von ABCG2-Inhibitoren erhöht war [84]. Der *Hedgehog*-Inhibitor *HhAntag691* zeigte sich ebenfalls als potenter Inhibitor von ABCG2 und kann ebenfalls für eine kombinierte Therapie in Erwägung gezogen werden [143]. Die ABCG2-Inhibition ist folglich ein vielversprechender Therapieansatz zur Erhöhung der Akkumulation von PPIX in Tumorzellen, möglicherweise auch in bis dato noch nicht PPIX-akkumulierenden Zellen.

4.4 Weitere Ansätze zur Effektivitätssteigerung der 5-ALA/PDT

Die PDT bietet als neuer Therapieansatz bei Malignomen des ZNS diverse Optimierungsmöglichkeiten, wodurch auch Tumoren wie das MB, die bisher nur inhomogen oder schwach reagierten, möglicherweise sensitiv(er) werden. Nicht nur die Verstärkung der PPIX-Akkumulation bietet ein Ziel für die Adjustierung, auch die Verwendung anderer Photosensitizer könnte zu besseren Effekten führen.

Für Hypericin als Alternative zur 5-ALA-PPIX konnte für die MB-Zelllinien D283, DAOY und D341med bereits eine bessere Tumorvisualisierung und ein größeres Ausmaß der Phototoxizität nachgewiesen werden [111]. In Kombination mit einem ABCG2-Inhibitor wurde beim kolorektalen Karzinom die Wirkung der Hypericin-basierten PDT verstärkt [144]. Auch bei der Pyropheophorbid-Alphamethylester-basierten PDT konnte durch ABCG2-Inhibition beim GBM die Sensibilität erhöht werden [145].

Als weitere Möglichkeit der Inhibition zeigte Doxycyclin bei malignen peripheren Nervenscheidentumoren ebenfalls eine Verstärkung der Effizienz der 5-ALA/PDT [146]. In verschiedenen Studien zu anderen Malignomen konnte bei Anwendung der 5-ALA/PDT in Kombination mit Chemotherapie ein synergistischer Effekt dargestellt werden [147, 148]. Hierbei ist zu beachten, dass die unterschiedlichen Subgruppen des MB unterschiedlich sensibel für eine postoperative Chemotherapie sind und

kraniale Radiatio bei Kindern unter drei Jahren kontraindiziert ist und somit auch das Outcome nicht nur von der Subgruppe abhängt, sondern auch durch das Alter der Patienten beeinflusst wird [149-151], d.h. nicht jede Kombination wird möglich sein.

Ein für den Therapieerfolg entscheidender Ansatz, ergibt sich möglicherweise aus dem *Cancer Stem Cell* (CSC) Modell [152, 153]. CSC machen nur einen kleinen Anteil der Zellen in Tumoren aus. Es sind jedoch die Zellen im Tumor, die sich selbst erhalten und durch Proliferation und Differenzierung die Masse der Tumorzellen hervorbringen [152, 154]. Sprechen die CSC nicht auf eine Therapie an, können sich nach Therapie immer wieder Rezidive ausgehend von den CSC entwickeln. MB mit einem hohen *Stem Cell Self-Renewal Index* zeigten sich aggressiver und es scheint ein Zusammenhang zwischen therapierefraktären CSC, Metastasen und schlechtem Outcome des MB zu bestehen [155]. Besonders in den Subgruppen 3 und 4 ist dies besonders ausgeprägt und kann auf eine Beteiligung von CSC hinweisen [156]. Ob CSC des MB PPIX akkumulieren und hierdurch sensitiv für eine 5-ALA/PDT werden, ist gegenwärtig unbekannt. Beim GBM konnte dagegen eine Sensitivität von *GBM Stem-Like Cells* gegenüber der 5-ALA/PDT *in vitro* bereits nachgewiesen werden [96, 103]. Aber auch hier gibt es eine gewisse Heterogenität hinsichtlich der PPIX-Anreicherung, die durch eine ABCG2-Expression der CSC erklärt werden könnte. ABCG2 transportiert neben PPIX auch den Fluoreszenzfarbsttoff Hoechst 33342 aus den Zellen, wodurch es durchflusszytometrisch möglich ist, Stammzellen als sogenannte *Sidepopulation* darzustellen. Beim GBM ist es bereits nachgewiesen, dass CSC ABCG2 exprimieren [157]. Liu und Kollegen [158] gelang es beim MB eine *Sidepopulation* zu identifizieren sowie eine erhöhte Expression von Stammzellmarkern und die Expression des ABCG2 Transporters nachzuweisen, ein möglicher weiterer Grund für die Therapieresistenz sowie Tumorrekurrenz beim MB [159]. Deshalb könnte auch beim MB die Kombination von 5-ALA/PDT mit ABCG2-Inhibitoren einen guten Ansatz für die Therapieoptimierung darstellen [89, 153].

Der Einsatz der 5-ALA/PDT zeigt insofern Einschränkungen, als dass sie die Operations- und Narkosezeit verlängert. Eine längere Operationsdauer steigert das Risiko für Komplikationen wie Thromboembolien [160]. Die 5-ALA/PDT ist jedoch auch repetitiv anwendbar und kann dadurch in der Wirkung gesteigert werden [161]. Dies bietet die Möglichkeit, die Operationszeit kürzer zu halten. Im Tierexperiment zeigten Ratten nach Implantation von Gliomen Hirnödeme, welche sich postoperativ oft vergrößerten und in einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie resultieren. Auch die PDT selber führte zu einer geringen intrakraniellen Flüssigkeitsansammlung. Der Ausbildung von Ödemen kann zum Teil durch Steroide entgegengewirkt werden [162]. Auch hier darf das Posterior-Fossa-Syndrom als Komplikation jedoch nicht in den

Hintergrund treten. Bei der klinischen Anwendung der 5-ALA/PDT sollte diese insoweit in ihrer Effektivität gesteigert sein, dass die Operationsdauer so kurz wie möglich gehalten wird, um das beste Outcome für die Patienten zu erzielen.

4.5 Therapieausblick für das Medulloblastom

Im Allgemeinen zeichnet sich zunehmend eine personalisierte Therapie des MB unter Einbezug der Subgruppen bei der Entscheidungsfindung ab, da diese auch eine Erklärung für das unterschiedliche Therapieansprechen sind [2, 9, 17, 37, 44, 163]. Hier besteht die Möglichkeit zum einen den subgruppenspezifischen Signalweg (WNT oder SHH) oder bei den bis dato nur schwer zu klassifizierenden Gruppen 3 und 4 andere charakteristische Merkmale, wie verstärkte Angiogenese, anzugreifen.

Ein gutes Beispiel subgruppenspezifischer Therapie ist Vismodegib, ein Inhibitor des SHH-Wegs, der die Option bietet, spezifisch SHH-aktivierte MB zu therapieren [164-167]. Nach dem aktuellen Konsens lässt sich die PDT auch als adjuvante Therapie einsetzen, ohne mit den anderen Therapieoptionen zu interferieren [168]. Die 5-ALA/PDT könnte also mit einer gruppenspezifischen Therapie wie beispielsweise spezifischen SHH-Inhibitoren kombiniert werden. In Basaliomen ist eine Kombination von Vismodegib und nicht invasiver PDT bereits ein vielversprechender Therapieansatz [169]. Ob dieser Ansatz auf das MB und ein entsprechendes Therapieregieme übertragbar ist, erfordert weitere Untersuchungen.

MB der Subgruppe 3 zeigen u.a. eine stark ausgeprägte Angiogenese [170]. Die Expression von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) konnte im MB bereits nachgewiesen werden [171]. VEGF ist somit eine mögliche Zielstruktur für die Hemmung der Angiogenese. Studien mit dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Irinotecan ergaben allerdings uneinheitliche Resultate [172-174] und bedürfen weiterer Überprüfung.

Ein *Case Report*, in dem Bevacizumab mit stereotaktischer Bestrahlung kombiniert wurde, führte zu einem guten Outcome für den Patienten [175]. Beim rezidivierenden GBM kommt Bevacizumab bereits zur Anwendung [176, 177]. Zudem konnte von Jiang und Kollegen eine PDT-induzierte Angiogenese in Rattengehirnen dokumentiert werden [178], und die Kombination von anti-angiogener Behandlung und PDT bei der GBM-Zelllinie U87 zeigte bereits positive Ergebnisse [179]. Auch beim kolorektalen Karzinom konnte bereits ein besseres Therapieansprechen durch eine Kombination von Bevacizumab und PDT nachgewiesen werden [180]. Ein erster *Case Report* zeigte bereits positive Effekte bei der Anwendung von Bevacizumab beim therapierefraktären

MB [175]. Die Kombination eines VGEF-Inhibitors mit der PDT erscheint also nicht nur in Hinblick auf tumorspezifisches Targeting wie beispielsweise MB der Gruppe 3 sinnvoll, sondern auch zur Verbesserung der Wirkung der PDT an sich durch Hemmung der therapieinduzierten Angiogenese nützlich. Andere anti-angiogene Substanzen sind ebenfalls in der Erprobung; Pazopanib, ein Tyrosinkinaseinhibitor, und Sorafenib, ein Multikinaseinhibitor, führen in *In-vivo*-Modellen zu einem verminderten Tumorwachstum [181, 182]. Ob solche anti-angiogenen Therapieansätze sich auf MB der Gruppe 3 anpassen lassen werden und ob die Wirksamkeit in Kombination mit einer 5-ALA/PDT zunimmt, bleibt abzuwarten.

Die Subgruppe des MB genau zu definieren kann jedoch vor allem bei Rekurrenz in Gruppe 3 und 4 Tumoren, die häufig fernab des ursprünglichen Tumorbettes auftritt, erschwert sein, und bei phänotypischer Abweichung der Metastase vom Primarius, die individuelle Therapiefindung erschweren [23]. Auch gab es bereits Fälle, in denen ein durch Radiatio induziertes GBM fälschlicherweise für das Rezidiv eines MB gehalten wurde, weswegen eine Re-Biopsie vor Therapiebeginn bei Rekurrenz empfehlenswert ist [54]. Ebenfalls müssen, neben der Wirksamkeit der 5-ALA/PDT, die Langzeiteffekte, ob alleine oder in Kombination mit verschiedenen Inhibitoren, auf die Entwicklung von Kindern und das Ausmaß von resultierenden neurologischen Defiziten untersucht werden. Gerade in der pädiatrischen Neuroonkologie empfiehlt es sich, den Therapieeffekt auf die Tumorzellen zur konzentrieren und entsprechend die Anreicherung von PPIX in gesunden Zellen so gering wie möglich zu halten.

Zusammenfassend zeigt sich also durch die Tumorklassifikation und Fokussierung auf molekulargenetische Subgruppen ein breites Spektrum an subgruppenspezifischen Therapiemöglichkeiten, die auch in Kombination mit der 5-ALA/PDT denkbar sind.

4.6 Schlussfolgerung

In *„Accumulation of protoporphyrin IX in medulloblastoma cell lines and sensitivity to subsequent photodynamic treatment“* konnte gezeigt werden, dass MB-Zellen unterschiedlicher Subgruppen PPIX nach der Gabe von 5-ALA anreichern und hierdurch sensitiv gegenüber einer PDT werden. Die Anreicherung war assoziiert mit einer geringen Ferrochelataseexpression sowie -aktivität der Zellen. Die Photosensitivität war in Zellen mit amplifiziertem *MYC*-Gen am ausgeprägtesten. Im Vergleich zu GBM-Zellen war die PPIX-Akkumulation reduziert und die Photosensitivität schwächer ausgeprägt, im Einklang damit, dass die PPIX-Akkumulation auf eine Subpopulation der MB-Zellen begrenzt blieb. Eine mögliche

Erklärung für die geringere PPIX-Anreicherung in MB-Zellen ist deren Expression des ABCG2 Transporterproteins.

Die therapeutische Bedeutung einer kompletten chirurgischen Resektion des MB [1, 2, 43] als auch das photodiagnostische Potential der PPIX-Akkumulation im GBM [88, 98-100, 183] sind schon lange etabliert. Auch erste Ergebnisse der 5-ALA-vermittelten photodynamischen Therapie beim GBM sind vielversprechend [96, 117, 118]. Damit das Potenzial der 5-ALA-vermittelten Photodiagnostik auf das MB übertragen werden kann, muss die PPIX-Anreicherung weiter optimiert werden, z.B. durch eine Optimierung der Dosis und Applikation des 5-ALA und/oder die Verwendung von Inhibitoren des ABCG2 Transporters [140, 145, 184], der Ferrochelatase [97, 145] oder der VEGF-regulierten Angiogenese [179]. Zudem sollte an primärem Tumormaterial geklärt werden, ob die einzelnen Subgruppen des MB sich hinsichtlich der PPIX-Anreicherung unterscheiden und es ggf. erforderlich ist, unterschiedliche Optimierungsstrategien zu verwenden bzw. dieses Therapieverfahren nur bei bestimmten Subgruppen des MB anzuwenden. Obwohl der phototoxische Effekt der 5-ALA/PDT direkt mit der PPIX-Anreicherung assoziiert ist und andere Faktoren beim MB von untergeordneter Bedeutung zu sein scheinen, muss dennoch geprüft werden, ob die Optimierung der PPIX-Anreicherung ausreicht, um eine effektive und dennoch selektive Abtötung der Tumorzellen der einzelnen MB-Subgruppen zu erreichen. Dabei wäre auch zu klären, ob auch die *Cancer Stem Cells* des MB bzw. der einzelnen MB-Subgruppen PPIX anreichern und hierdurch sensitiv für die 5-ALA/PDT-induzierte Phototoxizität werde. Dies ist vor allem für das Rezidivrisiko und somit das Gesamtüberleben von besonderer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Optimierung müsste zudem untersucht werden, ob vielleicht andere Substanzen wie Hypericin [111] oder 5-ALA-Hexylester [112] eine effizientere Photodiagnostik und photodynamische Therapie beim MB erlauben, wobei die jeweiligen Nebenwirkungen insbesondere hinsichtlich der geistigen und körperlichen Entwicklung von jungen Patienten berücksichtigt werden müssen.

Zusammenfassend stellt die 5-ALA/PDT trotz der noch ausstehenden Untersuchungen und teilweise bis dato inhomogenen Daten einen vielversprechenden Therapieansatz für das MB dar.

5. Literaturverzeichnis

1 Khatua, S., et al., *Childhood Medulloblastoma: Current Therapies, Emerging Molecular Landscape and Newer Therapeutic Insights.* Curr Neuropharmacol, 2018. **14**: p. 1-14.

2. Massimino, M., et al., *Childhood medulloblastoma.* Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **105**: p. 35-51.

3. Khanna, V., et al., *Incidence and survival trends for medulloblastomas in the United States from 2001 to 2013.* J Neurooncol, 2017. **135**(3): p. 433-441.

4. McNeil, D.E., et al., *Incidence and trends in pediatric malignancies medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumor: a SEER update. Surveillance Epidemiology and End Results.* Med Pediatr Oncol, 2002. **39**(3): p. 190-4.

5. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.* Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 803-20.

6. Cavalli, F.M.G., et al., *Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups.* Cancer Cell, 2017. **31**(6): p. 737-754.e6.

7. Millard, N.E. and K.C. De Braganca, *Medulloblastoma.* J Child Neurol, 2016. **31**(12): p. 1341-53.

8. Ellison, D.W., et al., *beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee.* J Clin Oncol, 2005. **23**(31): p. 7951-7.

9. Taylor, M.D., et al., *Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus.* Acta Neuropathol, 2012. **123**(4): p. 465-72.

10. Clifford, S.C., et al., *Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis.* Cell Cycle, 2006. **5**(22): p. 2666-70.

11. Northcott, P.A., et al., *Medulloblastomics: the end of the beginning.* Nat Rev Cancer, 2012. **12**(12): p. 818-34.

12. Northcott, P.A., et al., *Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes.* Nature, 2012. **488**(7409): p. 49-56.

13. Jones, D.T., et al., *Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma.* Nature, 2012. **488**(7409): p. 100-5.

14. Park, A.K., et al., *Prognostic classification of pediatric medulloblastoma based on chromosome 17p loss, expression of MYCC and MYCN, and Wnt pathway activation.* Neuro Oncol, 2012. **14**(2): p. 203-14.

15. Pugh, T.J., et al., *Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations.* Nature, 2012. **488**(7409): p. 106-10.

16. Ellison, D.W., et al., *Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups.* Acta Neuropathol, 2011. **121**(3): p. 381-96.

17. Kool, M., et al., *Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas.* Acta Neuropathol, 2012. **123**(4): p. 473-84.

18. Northcott, P.A., et al., *Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants.* J Clin Oncol, 2011. **29**(11): p. 1408-14.

19. Gibson, P., et al., *Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins.* Nature, 2010. **468**(7327): p. 1095-9.
20. Zhukova, N., et al., *Subgroup-specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma.* J Clin Oncol, 2013. **31**(23): p. 2927-35.
21. Tabori, U., et al., *Universal poor survival in children with medulloblastoma harboring somatic TP53 mutations.* J Clin Oncol, 2010. **28**(8): p. 1345-50.
22. Rausch, T., et al., *Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations.* Cell, 2012. **148**(1-2): p. 59-71.
23. Ramaswamy, V., et al., *Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus.* Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 821-31.
24. Ramaswamy, V. and M.D. Taylor, *Medulloblastoma: From Myth to Molecular.* J Clin Oncol, 2017. **35**(21): p. 2355-2363.
25. Ramaswamy, V., et al., *Recurrence patterns across medulloblastoma subgroups: an integrated clinical and molecular analysis.* Lancet Oncol, 2013. **14**(12): p. 1200-7.
26. Shih, D.J., et al., *Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups.* J Clin Oncol, 2014. **32**(9): p. 886-96.
27. Wells, E.M. and R.J. Packer, *Pediatric brain tumors.* Continuum (Minneap Minn), 2015. **21**(2 Neuro-oncology): p. 373-96.
28. Taran, S.J., et al., *Paediatric Medulloblastoma: An Updated Review.* West Indian Med J, 2016. **65**(2): p. 363-368.
29. Perreault, S., et al., *MRI surrogates for molecular subgroups of medulloblastoma.* AJNR Am J Neuroradiol, 2014. **35**(7): p. 1263-9.
30. Park, T.S., et al., *Medulloblastoma: clinical presentation and management.* 1983. **58**(4): p. 543.
31. Wilne, S., et al., *Progression from first symptom to diagnosis in childhood brain tumours.* Eur J Pediatr, 2012. **171**(1): p. 87-93.
32. Reith, W., S. Bodea, and R. Muhl-Benninghaus, *[Pediatric brain tumors].* Radiologe, 2017. **57**(9): p. 728-739.
33. Koeller, K.K. and E.J. Rushing, *From the archives of the AFIP: medulloblastoma: a comprehensive review with radiologic-pathologic correlation.* Radiographics, 2003. **23**(6): p. 1613-37.
34. Eran, A., et al., *Medulloblastoma: atypical CT and MRI findings in children.* Pediatr Radiol, 2010. **40**(7): p. 1254-62.
35. Foster, M.T., L.S. Harishchandra, and C. Mallucci, *Pediatric Central Nervous System Tumors: State-of-the-Art and Debated Aspects.* Front Pediatr, 2018. **6**: p. 309.
36. Gajjar, A., et al., *Comparison of lumbar and shunt cerebrospinal fluid specimens for cytologic detection of leptomeningeal disease in pediatric patients with brain tumors.* J Clin Oncol, 1999. **17**(6): p. 1825-8.
37. Sadighi, Z., T. Vats, and S. Khatua, *Childhood medulloblastoma: the paradigm shift in molecular stratification and treatment profile.* J Child Neurol, 2012. **27**(10): p. 1302-7.
38. Wahba, H.A., et al., *Adjuvant chemotherapy after reduced craniospinal irradiation dose in children with average-risk medulloblastoma: a 5-year follow-up study.* J buon, 2013. **18**(2): p. 425-9.

39. Cefalo, G., et al., *Temozolomide is an active agent in children with recurrent medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumor: an Italian multi-institutional phase II trial.* Neuro Oncol, 2014. **16**(5): p. 748-53.
40. Weil, A.G., et al., *Survival in pediatric medulloblastoma: a population-based observational study to improve prognostication.* J Neurooncol, 2017. **132**(1): p. 99-107.
41. Koschmann, C., et al., *Survival After Relapse of Medulloblastoma.* J Pediatr Hematol Oncol, 2016. **38**(4): p. 269-73.
42. Schwalbe, E.C., et al., *Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study.* Lancet Oncol, 2017. **18**(7): p. 958-971.
43. Zeltzer, P.M., et al., *Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study.* J Clin Oncol, 1999. **17**(3): p. 832-45.
44. Thompson, E.M., et al., *Prognostic value of medulloblastoma extent of resection after accounting for molecular subgroup: a retrospective integrated clinical and molecular analysis.* Lancet Oncol, 2016. **17**(4): p. 484-495.
45. Cochrane, D.D., et al., *The surgical and natural morbidity of aggressive resection for posterior fossa tumors in childhood.* Pediatr Neurosurg, 1994. **20**(1): p. 19-29.
46. Robertson, P.L., et al., *Incidence and severity of postoperative cerebellar mutism syndrome in children with medulloblastoma: a prospective study by the Children's Oncology Group.* J Neurosurg, 2006. **105**(6 Suppl): p. 444-51.
47. Gora, N.K., A. Gupta, and V.D. Sinha, *Cerebellar Mutism Syndrome following Midline Posterior Fossa Tumor Resection in Children: An Institutional Experience.* J Pediatr Neurosci, 2017. **12**(4): p. 313-319.
48. Jabarkheel, R., et al., *Molecular correlates of cerebellar mutism syndrome in medulloblastoma.* Neuro Oncol, 2019.
49. Edelstein, K., et al., *Early aging in adult survivors of childhood medulloblastoma: long-term neurocognitive, functional, and physical outcomes.* Neuro Oncol, 2011. **13**(5): p. 536-45.
50. Gottardo, N.G. and A. Gajjar, *Current therapy for medulloblastoma.* Curr Treat Options Neurol, 2006. **8**(4): p. 319-34.
51. Mabbott, D.J., et al., *Core neurocognitive functions in children treated for posterior fossa tumors.* Neuropsychology, 2008. **22**(2): p. 159-68.
52. Gudrunardottir, T., et al., *Treatment developments and the unfolding of the quality of life discussion in childhood medulloblastoma: a review.* Childs Nerv Syst, 2014. **30**(6): p. 979-90.
53. Odagiri, K., et al., *Treatment outcomes and late toxicities in patients with embryonal central nervous system tumors.* Radiat Oncol, 2014. **9**: p. 201.
54. Packer, R.J., et al., *Survival and secondary tumors in children with medulloblastoma receiving radiotherapy and adjuvant chemotherapy: results of Children's Oncology Group trial A9961.* Neuro Oncol, 2013. **15**(1): p. 97-103.
55. Morris, B., et al., *Cerebrovascular disease in childhood cancer survivors: A Children's Oncology Group Report.* Neurology, 2009. **73**(22): p. 1906-13.
56. Kortmann, R.D., et al., *Postoperative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance*

chemotherapy in the treatment of medulloblastoma in childhood: results of the German prospective randomized trial HIT '91. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000. **46**(2): p. 269-79.
57. Li, Y., R.B. Womer, and J.H. Silber, *Predicting cisplatin ototoxicity in children: the influence of age and the cumulative dose.* Eur J Cancer, 2004. **40**(16): p. 2445-51.
58. Knight, K.R., D.F. Kraemer, and E.A. Neuwelt, *Ototoxicity in children receiving platinum chemotherapy: underestimating a commonly occurring toxicity that may influence academic and social development.* J Clin Oncol, 2005. **23**(34): p. 8588-96.
59. Ribi, K., et al., *Outcome of medulloblastoma in children: long-term complications and quality of life.* Neuropediatrics, 2005. **36**(6): p. 357-65.
60. Gerber, N.U., et al., *Outcome in children with brain tumours diagnosed in the first year of life: long-term complications and quality of life.* Arch Dis Child, 2008. **93**(7): p. 582-9.
61. Koustenis, E., et al., *Executive function deficits in pediatric cerebellar tumor survivors.* Eur J Paediatr Neurol, 2016. **20**(1): p. 25-37.
62. Stavinoha, P.L., et al., *Neurocognitive and Psychosocial Outcomes in Pediatric Brain Tumor Survivors.* Bioengineering (Basel), 2018. **5**(3).
63. Maddrey, A.M., et al., *Neuropsychological performance and quality of life of 10 year survivors of childhood medulloblastoma.* J Neurooncol, 2005. **72**(3): p. 245-53.
64. Frange, P., et al., *From childhood to adulthood: long-term outcome of medulloblastoma patients. The Institut Curie experience (1980-2000).* J Neurooncol, 2009. **95**(2): p. 271-279.
65. Miranda Kuzan-Fischer, C., K. Juraschka, and M.D. Taylor, *Medulloblastoma in the Molecular Era.* J Korean Neurosurg Soc, 2018. **61**(3): p. 292-301.
66. Mroz, P., et al., *Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer.* Cancers (Basel), 2011. **3**(2): p. 2516-39.
67. Castano, A.P., T.N. Demidova, and M.R. Hamblin, *Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death.* Photodiagnosis Photodyn Ther, 2005. **2**(1): p. 1-23.
68. Piette, J., et al., *Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers.* Biochem Pharmacol, 2003. **66**(8): p. 1651-9.
69. Gold, M.H. and M.P. Goldman, *5-aminolevulinic acid photodynamic therapy: where we have been and where we are going.* Dermatol Surg, 2004. **30**(8): p. 1077-83; discussion 1083-4.
70. von Tappeiner H., J.A., *Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme.* Deutsches Archiv für klinische Medizin, 1904(80): p. 427-487.
71. Daniell, M.D. and J.S. Hill, *A history of photodynamic therapy.* Aust N Z J Surg, 1991. **61**(5): p. 340-8.
72. Chilakamarthi, U. and L. Giribabu, *Photodynamic Therapy: Past, Present and Future.* Chem Rec, 2017. **17**(8): p. 775-802.
73. Dougherty, T.J., et al., *Photodynamic therapy.* J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(12): p. 889-905.

74. Figge, F.H., G.S. Weiland, and L.O. Manganiello, *Cancer detection and therapy; affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins.* Proc Soc Exp Biol Med, 1948. **68**(3): p. 640.
75. Kennedy, J.C. and R.H. Pottier, *Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy.* J Photochem Photobiol B, 1992. **14**(4): p. 275-92.
76. Kennedy, J.C., R.H. Pottier, and D.C. Pross, *Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience.* J Photochem Photobiol B, 1990. **6**(1-2): p. 143-8.
77. Krishnamurthy, P.C., et al., *Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter.* Nature, 2006. **443**(7111): p. 586-9.
78. Kobuchi, H., et al., *Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation.* PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50082.
79. Hagiya, Y., et al., *Expression levels of PEPT1 and ABCG2 play key roles in 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced tumor-specific protoporphyrin IX (PpIX) accumulation in bladder cancer.* Photodiagnosis Photodyn Ther, 2013. **10**(3): p. 288-95.
80. Hunter, G.A., S. Al-Karadaghi, and G.C. Ferreira, *FERROCHELATASE: THE CONVERGENCE OF THE PORPHYRIN BIOSYNTHESIS AND IRON TRANSPORT PATHWAYS.* J Porphyr Phthalocyanines, 2011. **15**(5-6): p. 350-356.
81. Ohgari, Y., et al., *Mechanisms involved in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin.* Biochem Pharmacol, 2005. **71**(1-2): p. 42-9.
82. Ferreira, G.C., et al., *Structure and function of ferrochelatase.* J Bioenerg Biomembr, 1995. **27**(2): p. 221-9.
83. Ishikawa, T., et al., *Transporter-Mediated Drug Interaction Strategy for 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-Based Photodynamic Diagnosis of Malignant Brain Tumor: Molecular Design of ABCG2 Inhibitors.* Pharmaceutics, 2011. **3**(3): p. 615-635.
84. Morfouace, M., et al., *ABCG2 Transporter Expression Impacts Group 3 Medulloblastoma Response to Chemotherapy.* Cancer Res, 2015. **75**(18): p. 3879-89.
85. McDevitt, C.A., et al., *Is ATP binding responsible for initiating drug translocation by the multidrug transporter ABCG2?* Febs j, 2008. **275**(17): p. 4354-62.
86. Hasanabady, M.H. and F. Kalalinia, *ABCG2 inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer.* J Biosci, 2016. **41**(2): p. 313-24.
87. Teng, L., et al., *Current Applications of 5-ALA in Glioma Diagnostics and Therapy.* 2013.
88. Beck, T.J., et al., *Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX.* Lasers Surg Med, 2007. **39**(5): p. 386-93.
89. Hodgkinson, N., C.A. Kruger, and H. Abrahamse, *Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells.* Tumour Biol, 2017. **39**(10): p. 1010428317734691.
90. Ozog, D.M., et al., *Photodynamic Therapy: A Clinical Consensus Guide.* Dermatol Surg, 2016. **42**(7): p. 804-27.

91. Fukuhara, H., et al., *The inhibition of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action for prostate cancer.* Photodiagnosis Photodyn Ther, 2013. **10**(4): p. 399-409.
92. Yang, X., et al., *Effects of Silencing Heme Biosynthesis Enzymes on 5-Aminolevulinic Acid-mediated Protoporphyrin IX Fluorescence and Photodynamic Therapy.* Photochem Photobiol, 2015. **91**(4): p. 923-30.
93. Tetard, M.C., et al., *Experimental use of photodynamic therapy in high grade gliomas: a review focused on 5-aminolevulinic acid.* Photodiagnosis Photodyn Ther, 2014. **11**(3): p. 319-30.
94. Dolmans, D.E., D. Fukumura, and R.K. Jain, *Photodynamic therapy for cancer.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 380-7.
95. Eljamel, M.S., C. Goodman, and H. Moseley, *ALA and Photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial.* Lasers Med Sci, 2008. **23**(4): p. 361-7.
96. Schimanski, A., et al., *Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogenous 5-aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment.* Journal of photochemistry and photobiology B, Biology, 2016. **163**: p. 203-10.
97. Teng, L., et al., *Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy.* Br J Cancer, 2011. **104**(5): p. 798-807.
98. Stummer, W., et al., *Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias.* Neurosurgery, 2008. **62**(3): p. 564-76; discussion 564-76.
99. Stummer, W., et al., *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial.* Lancet Oncol, 2006. **7**(5): p. 392-401.
100. Stummer, W., et al., *Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report.* J Neurooncol, 2008. **87**(1): p. 103-9.
101. Stepp, H. and W. Stummer, *5-ALA in the management of malignant glioma.* Lasers Surg Med, 2018. **50**(5): p. 399-419.
102. Mahmoudi, K., et al., *5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas.* J Neurooncol, 2019. **141**(3): p. 595-607.
103. Fujishiro, T., et al., *5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can target human glioma stem-like cells refractory to antineoplastic agents.* Photodiagnosis Photodyn Ther, 2018. **24**: p. 58-68.
104. Knipps, J., et al., *Fluorescence Behavior and Dural Infiltration of Meningioma Analyzed by 5-Aminolevulinic Acid-Based Fluorescence: Operating Microscope Versus Mini-Spectrometer.* World Neurosurg, 2017. **108**: p. 118-127.
105. Neumann, L.M., et al., *Efficacy of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in pituitary adenomas-experimental study on rat and human cell cultures.* Photodiagnosis Photodyn Ther, 2016. **14**: p. 77-83.
106. El-Khatib, M., et al., *Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy of human meningioma: an in vitro study on primary cell lines.* Int J Mol Sci, 2015. **16**(5): p. 9936-48.

107. Eicker, S., et al., *ALA-induced porphyrin accumulation in medulloblastoma and its use for fluorescence-guided surgery.* Cent Eur Neurosurg, 2011. **72**(2): p. 101-3.
108. Barbagallo, G.M., et al., *5-ALA fluorescence-assisted surgery in pediatric brain tumors: report of three cases and review of the literature.* Br J Neurosurg, 2014. **28**(6): p. 750-4.
109. Della Puppa, A., et al., *Intra-operative 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced fluorescence of medulloblastoma: phenotypic variability and CD133(+) expression according to different fluorescence patterns.* Neurol Sci, 2014. **35**(1): p. 99-102.
110. Schwake, M., et al., *In-Vitro Use of 5-ALA for Photodynamic Therapy in Pediatric Brain Tumors.* Neurosurgery, 2018.
111. Ritz, R., et al., *In vitro comparison of hypericin and 5-aminolevulinic acid-derived protoporphyrin IX for photodynamic inactivation of medulloblastoma cells.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51974.
112. Chu, E.S., T.K. Wong, and C.M. Yow, *Photodynamic effect in medulloblastoma: downregulation of matrix metalloproteinases and human telomerase reverse transcriptase expressions.* Photochem Photobiol Sci, 2008. **7**(1): p. 76-83.
113. Schwake, M., et al., *Kinetics of porphyrin fluorescence accumulation in pediatric brain tumor cells incubated in 5-aminolevulinic acid.* Acta Neurochir (Wien), 2014. **156**(6): p. 1077-84.
114. Skjoth-Rasmussen, J., et al., *The use of 5-ALA to assist complete removal of residual non-enhancing part of childhood medulloblastoma: a case report.* Childs Nerv Syst, 2015. **31**(11): p. 2173-7.
115. Beez, T., et al., *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of brain tumors in children--a technical report.* Acta Neurochir (Wien), 2014. **156**(3): p. 597-604.
116. Preuss, M., et al., *The use of 5-aminolevulinic acid fluorescence guidance in resection of pediatric brain tumors.* Childs Nerv Syst, 2013. **29**(8): p. 1263-7.
117. Olzowy, B., et al., *Photoirradiation therapy of experimental malignant glioma with 5-aminolevulinic acid.* J Neurosurg, 2002. **97**(4): p. 970-6.
118. Kaneko, S., et al., *Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas.* Prog Neurol Surg, 2018. **32**: p. 1-13.
119. Ivanov, D.P., et al., *In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job.* J Biotechnol, 2016. **236**: p. 10-25.
120. Eicker, S.O., et al., *The impact of fluorescence guidance on spinal intradural tumour surgery.* Eur Spine J, 2013. **22**(6): p. 1394-401.
121. Stummer, W., et al., *Predicting the "usefulness" of 5-ALA-derived tumor fluorescence for fluorescence-guided resections in pediatric brain tumors: a European survey.* Acta Neurochir (Wien), 2014. **156**(12): p. 2315-24.
122. Stummer, W., et al., *Predicting the "usefulness" of 5-ALA-derived tumor fluorescence for fluorescence-guided resections in pediatric brain tumors: a European survey.* Acta Neurochir (Wien), 2014. **156**(12): p. 2315-24.
123. Krause Molle, Z., et al., *5-ALA-Induced Fluorescence in Leptomeningeal Dissemination of Spinal Malignant Glioma.* World Neurosurg, 2018. **110**: p. 345-348.

124. Cappellari, A.R., et al., *Characterization of ectonucleotidases in human medulloblastoma cell lines: ecto-5'NT/CD73 in metastasis as potential prognostic factor.* PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47468.
125. Kamp, M.A., et al., *Is 5-ALA fluorescence of cerebral metastases a prognostic factor for local recurrence and overall survival?* J Neurooncol, 2019. **141**(3): p. 547-553.
126. Yamamoto, J., et al., *Improving contrast enhancement in magnetic resonance imaging using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX for high-grade gliomas.* Oncol Lett, 2017. **13**(3): p. 1269-1275.
127. Eljamel, M.S., G. Leese, and H. Moseley, *Intraoperative optical identification of pituitary adenomas.* J Neurooncol, 2009. **92**(3): p. 417-21.
128. Wei, L., et al., *Visualization technologies for 5-ALA-based fluorescence-guided surgeries.* J Neurooncol, 2019. **141**(3): p. 495-505.
129. Kemmner, W., et al., *Silencing of human ferrochelatase causes abundant protoporphyrin-IX accumulation in colon cancer.* FASEB J, 2008. **22**(2): p. 500-9.
130. Westlin, W.F., *Deferoxamine as a chelating agent.* Clin Toxicol, 1971. **4**(4): p. 597-602.
131. Valdés, P.A., et al., *Deferoxamine iron chelation increases delta-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX in xenograft glioma model.* Photochem Photobiol, 2010. **86**(2): p. 471-5.
132. Inoue, K., et al., *Photodynamic therapy involves an antiangiogenic mechanism and is enhanced by ferrochelatase inhibitor in urothelial carcinoma.* Cancer Sci, 2013. **104**(6): p. 765-72.
133. Amo, T., et al., *Mechanism of cell death by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action and its enhancement by ferrochelatase inhibitors in human histiocytic lymphoma cell line U937.* Cell Biochem Funct, 2009. **27**(8): p. 503-15.
134. Ishiyama, M., et al., *A New Sulfonated Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye.* CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 1993. **41**(6): p. 1118-1122.
135. Peyrl, A., et al., *Protein profiles of medulloblastoma cell lines DAOY and D283: identification of tumor-related proteins and principles.* Proteomics, 2003. **3**(9): p. 1781-800.
136. Zanini, C., et al., *Medullospheres from DAOY, UW228 and ONS-76 cells: increased stem cell population and proteomic modifications.* PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63748.
137. Higdon, R., et al., *Integrated Proteomic and Transcriptomic-Based Approaches to Identifying Signature Biomarkers and Pathways for Elucidation of Daoy and UW228 Subtypes.* Proteomes, 2017. **5**(1).
138. Castano, A.P., P. Mroz, and M.R. Hamblin, *Photodynamic therapy and anti-tumour immunity.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(7): p. 535-45.
139. Robey, R.W., et al., *ABCG2-mediated transport of photosensitizers: potential impact on photodynamic therapy.* Cancer Biol Ther, 2005. **4**(2): p. 187-94.
140. Abdel Gaber, S.A., et al., *ABCG2-mediated suppression of chlorin e6 accumulation and photodynamic therapy efficiency in glioblastoma cell lines can be reversed by KO143.* J Photochem Photobiol B, 2018. **178**: p. 182-191.

141. Palasuberniam, P., et al., *ABCG2 transporter inhibitor restores the sensitivity of triple negative breast cancer cells to aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 13298.
142. Weidner, L.D., et al., *The Inhibitor Ko143 Is Not Specific for ABCG2.* J Pharmacol Exp Ther, 2015. **354**(3): p. 384-93.
143. Zhang, Y., J. Laterra, and M.G. Pomper, *Hedgehog pathway inhibitor HhAntag691 is a potent inhibitor of ABCG2/BCRP and ABCB1/Pgp.* Neoplasia, 2009. **11**(1): p. 96-101.
144. Khot, M.I., et al., *Inhibiting ABCG2 could potentially enhance the efficacy of hypericin-mediated photodynamic therapy in spheroidal cell models of colorectal cancer.* Photodiagnosis Photodyn Ther, 2018. **23**: p. 221-229.
145. Pan, L., et al., *The sensitivity of glioma cells to pyropheophorbide-alphamethyl ester-mediated photodynamic therapy is enhanced by inhibiting ABCG2.* Lasers Surg Med, 2017. **49**(7): p. 719-726.
146. Lee, M.J., et al., *Doxycycline potentiates antitumor effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in malignant peripheral nerve sheath tumor cells.* PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0178493.
147. Yu, C.H. and 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, 2014. **9**(1): p. e87129.
148. Fang, C.Y., et al., *miR-145 mediates the anti-cancer stemness effect of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (ALA) in oral cancer cells.* J Formos Med Assoc, 2018. **117**(8): p. 738-742.
149. Zhang, Z.Y., et al., *Medulloblastoma in China: clinicopathologic analyses of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups reveal different therapeutic responses to adjuvant chemotherapy.* PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99490.
150. Curran, E.K., et al., *Do children and adults differ in survival from medulloblastoma? A study from the SEER registry.* J Neurooncol, 2009. **95**(1): p. 81-85.
151. Johnston, D.L., et al., *Medulloblastoma in children under the age of three years: a retrospective Canadian review.* J Neurooncol, 2009. **94**(1): p. 51-6.
152. Huang, G.H., et al., *Medulloblastoma stem cells: Promising targets in medulloblastoma therapy.* Cancer Sci, 2016. **107**(5): p. 583-9.
153. Lin, L., et al., *Active Targeting of Nano-Photosensitizer Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer Stem Cells.* J Biomed Nanotechnol, 2015. **11**(4): p. 531-54.
154. Manoranjan, B., et al., *Medulloblastoma stem cells: modeling tumor heterogeneity.* Cancer Lett, 2013. **338**(1): p. 23-31.
155. Panosyan, E.H., et al., *Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passageable neurosphere formation.* Pediatr Blood Cancer, 2010. **55**(4): p. 644-51.
156. Ellison, D.W., *Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease.* Acta Neuropathol, 2010. **120**(3): p. 305-16.
157. Bleau, A.M., et al., *PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells.* Cell Stem Cell, 2009. **4**(3): p. 226-35.

158. Liu, J., et al., *Isolation and characterization of cancer stem cells from medulloblastoma.* Genet Mol Res, 2015. **14**(2): p. 3355-61.
159. Ingram, W.J., et al., *ABC transporter activity linked to radiation resistance and molecular subtype in pediatric medulloblastoma.* Exp Hematol Oncol, 2013. **2**(1): p. 26.
160. Kim, J.Y., et al., *Surgical duration and risk of venous thromboembolism.* JAMA Surg, 2015. **150**(2): p. 110-7.
161. Hirschberg, H., et al., *Repetitive photodynamic therapy of malignant brain tumors.* J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2006. **25**(1-2): p. 261-79.
162. Ito, S., et al., *Oedema formation in experimental photo-irradiation therapy of brain tumours using 5-ALA.* Acta Neurochir (Wien), 2005. **147**(1): p. 57-65; discussion 65.
163. Gupta, T., N. Shirsat, and R. Jalali, *Molecular Subgrouping of Medulloblastoma: Impact Upon Research and Clinical Practice.* Curr Pediatr Rev, 2015. **11**(2): p. 106-19.
164. Kieran, M.W., *Targeted treatment for sonic hedgehog-dependent medulloblastoma.* Neuro Oncol, 2014. **16**(8): p. 1037-47.
165. Robinson, G.W., et al., *Vismodegib Exerts Targeted Efficacy Against Recurrent Sonic Hedgehog-Subgroup Medulloblastoma: Results From Phase II Pediatric Brain Tumor Consortium Studies PBTC-025B and PBTC-032.* J Clin Oncol, 2015. **33**(24): p. 2646-54.
166. Samkari, A., J. White, and R. Packer, *SHH inhibitors for the treatment of medulloblastoma.* Expert Rev Neurother, 2015. **15**(7): p. 763-70.
167. Gajjar, A., et al., *Phase I study of vismodegib in children with recurrent or refractory medulloblastoma: a pediatric brain tumor consortium study.* Clin Cancer Res, 2013. **19**(22): p. 6305-12.
168. Wilson, B.C., *Photodynamic therapy for cancer: principles.* Can J Gastroenterol, 2002. **16**(6): p. 393-6.
169. Rizzo, J.M., R.J. Segal, and N.C. Zeitouni, *Combination vismodegib and photodynamic therapy for multiple basal cell carcinomas.* Photodiagnosis Photodyn Ther, 2018. **21**: p. 58-62.
170. Thompson, E.M., et al., *The role of angiogenesis in Group 3 medulloblastoma pathogenesis and survival.* Neuro Oncol, 2017. **19**(9): p. 1217-1227.
171. Slongo, M.L., et al., *Functional VEGF and VEGF receptors are expressed in human medulloblastomas.* Neuro Oncol, 2007. **9**(4): p. 384-92.
172. Aguilera, D., et al., *Response to bevacizumab, irinotecan, and temozolomide in children with relapsed medulloblastoma: a multi-institutional experience.* Childs Nerv Syst, 2013. **29**(4): p. 589-96.
173. Aguilera, D.G., S. Goldman, and J. Fangusaro, *Bevacizumab and irinotecan in the treatment of children with recurrent/refractory medulloblastoma.* Pediatr Blood Cancer, 2011. **56**(3): p. 491-4.
174. Okada, K., et al., *Phase I study of bevacizumab plus irinotecan in pediatric patients with recurrent/refractory solid tumors.* Jpn J Clin Oncol, 2013. **43**(11): p. 1073-9.
175. Zhao, M., et al., *Bevacizumab and stereotactic radiosurgery achieved complete response for pediatric recurrent medulloblastoma.* J Cancer Res Ther, 2018. **14**(Supplement): p. S789-s792.

176. Ghiaseddin, A. and K.B. Peters, *Use of bevacizumab in recurrent glioblastoma.* CNS oncology, 2015. **4**(3): p. 157-169.
177. Wang, Y., et al., *The Role of a Single Angiogenesis Inhibitor in the Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis and Systematic Review.* PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0152170.
178. Jiang, F., et al., *Angiogenesis induced by photodynamic therapy in normal rat brains.* Photochem Photobiol, 2004. **79**(6): p. 494-8.
179. Jiang, F., et al., *Combination therapy with antiangiogenic treatment and photodynamic therapy for the nude mouse bearing U87 glioblastoma.* Photochem Photobiol, 2008. **84**(1): p. 128-37.
180. Peng, C.L., et al., *Anti-angiogenic treatment (Bevacizumab) improves the responsiveness of photodynamic therapy in colorectal cancer.* Photodiagnosis Photodyn Ther, 2018. **23**: p. 111-118.
181. Craveiro, R.B., et al., *In comparative analysis of multi-kinase inhibitors for targeted medulloblastoma therapy pazopanib exhibits promising in vitro and in vivo efficacy.* Oncotarget, 2014. **5**(16): p. 7149-7161.
182. Chellappan, D.K., et al., *The role of pazopanib on tumour angiogenesis and in the management of cancers: A review.* Biomed Pharmacother, 2017. **96**: p. 768-781.
183. Guyotat, J., et al., *5-Aminolevulinic Acid-Protoporphyrin IX Fluorescence-Guided Surgery of High-Grade Gliomas: A Systematic Review.* Adv Tech Stand Neurosurg, 2016(43): p. 61-90.
184. Barron, G.A., H. Moseley, and J.A. Woods, *Differential sensitivity in cell lines to photodynamic therapy in combination with ABCG2 inhibition.* J Photochem Photobiol B, 2013. **126**: p. 87-96.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Molekulare Subgruppen des Medulloblastoms 8
Abb. 2: Die Hämsynthese und die Verstoffwechselung von 5-Aminolävulinsäure 14

7. Danksagung

Nun möchte ich mit bei all den Menschen bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet haben.

Mein erster und größter Dank geht an meinen Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. Rüdiger Sorg für seine ausgezeichnete, liebe Betreuung und Unterstützung. Auch für die Gespräche abseits der Dissertation bin ich sehr dankbar.

PD Dr. med. Thomas Beez möchte ich zudem für seine Betreuung seitens der neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf danken.

Ebenfalls möchte ich mich bei Heike Krägel für die Einarbeitung im Labor des ITZs und die Unterstützung bei den ersten Schritten bedanken. Auch lieben Dank an Dr. rer. nat. Sandra Weinhold für die Unterstützung im Rahmen der PCR.

Herzlich möchte ich auch Frau Brigitte Senger aus der neurochirurgischen Klinik für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und stets freundliche Unterstützung danken.

Ich danke Viola Kürten aus der dermatologischen Klinik der Universitätsklinik Düsseldorf für die Einweisung und Nutzung des Lumineszenzspektrometers.

Meinen Eltern möchte ich danken, dass sie mir das Medizinstudium und diese Doktorarbeit ermöglich haben und mich zu jedem Zeitpunkt unterstützt haben.
Ohne euch wäre das alles gar nicht möglich gewesen.

Lieben Dank auch an meinen Verlobten Stanislaw für seine Unterstützung.

Lieben Dank auch an andere Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des ITZ: Lara, Maren, Adrian, Mark und Tim.