

Aus der  
Urologischen Klinik und Poliklinik  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Der Einfluss von Shikonin und Berbamin auf Glioblastomstammzellen in  
Kombination mit  
photodynamischer Therapie**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Maxim Marius Ralf Werner

aus  
München

Jahr  
2026

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Priv. Doz. Dr. Heike Pohla  
Zweites Gutachten: Prof. Dr. Ronald Sroka  
Drittes Gutachten: Prof. Dr. Louisa von Baumgarten

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2026

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Zusammenfassung: .....</b>	<b>6</b>
<b>Abstract (English): .....</b>	<b>6</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>12</b>
1.1 Das Glioblastoma multiforme (GBM) .....	12
1.1.1 Klassifikation nach WHO .....	12
1.1.2 Aktuelle Therapierichtlinien.....	12
1.1.3 Prognose und Überlebenswahrscheinlichkeiten.....	13
1.2 Tumorstammzellen .....	13
1.2.1 Eigenschaften und Charakterisierung.....	13
1.2.2 Die Rolle der Mitochondrien in der Tumorerhaltung .....	15
1.3 Sekundäre Pflanzenstoffe.....	16
1.3.1 Definition .....	16
1.3.2 Ursprünge in der Traditionellen Chinesischen Medizin .....	16
1.3.3 Shikonin .....	16
1.3.4 Berbamin.....	17
1.4 Photodynamische Therapie (PDT) .....	18
1.4.1 Ursprünge und Entdeckung .....	18
1.4.2 Prinzip der 5-Aminolävulinsäure-basierten PDT (5-ALA-PDT).....	19
1.4.3 Anwendungsgebiete in der klinischen Medizin .....	21
1.5 Zielsetzung, Fragestellung und Hypothesen .....	23
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Zelllinien, Reagenzien und Software .....	25
2.2 Zellkultur.....	29
2.2.1 Zelllinien .....	29
2.2.2 Inkubationsbedingungen.....	29
2.2.3 Anreicherung von <i>Spheres</i> .....	30
2.3 Etablierung resistenter Zelllinien.....	30
2.3.1 Inkubation mit steigender Konzentration .....	31
2.3.2 Validierung der TMZ-Resistenz .....	31
2.4 Grundlegende zellbiologische Versuche .....	32
2.4.1 Zellvitalität in Abhängigkeit steigender Konzentration .....	32
2.4.2 Zellproliferation .....	32
2.4.3 Ausbildung von <i>Spheres</i> .....	32
2.4.4 Induktion von Apoptose .....	33
2.4.5 Shikonin in Kombination mit TMZ .....	33
2.5 Untersuchung der Protoporphyrin-IX-Akkumulation .....	34

2.5.1	Fluorometrie im Microplate-Reader .....	34
2.5.2	Durchflusszytometrie .....	34
2.5.3	Konfokalmikroskopie .....	34
2.6	Einfluss von Shikonin auf die PDT in vitro .....	36
2.6.1	Die Bestrahlungskammer .....	36
2.6.2	Austesten der Bestrahlungsbedingungen .....	37
2.6.3	Zellvitalität.....	37
2.6.4	Zellproliferation .....	38
2.6.5	Apoptose .....	38
2.7	Untersuchungen auf mRNA-Ebene.....	39
2.7.1	Isolation von mRNA.....	39
2.7.2	Reverse Transkription .....	39
2.7.3	Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) .....	40
2.7.4	Charakterisierung der Stammzellen .....	40
2.7.5	Einfluss der PDT auf die Expressionsmuster .....	41
2.8	Auswertung und Statistische Analysen .....	42
2.9	Zitierweise .....	42
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
3.1	Validierung der Temozolomid-resistenten Zelllinien .....	43
3.2	Shikonin und Berbamin besitzen anti-Tumor Effekte .....	45
3.2.1	Konzentrationsabhängige Reduktion der Zellvitalität, Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration (IC50) .....	45
3.2.2	Hemmung der Proliferation .....	47
3.2.3	Unterdrückung der Sphere-Bildung durch Shikonin und Berbamin .....	49
3.2.4	Induktion von Apoptose .....	53
3.2.5	Shikonin beeinflusst die TMZ-Resistenz kaum .....	55
3.3	Shikonin moduliert die PpIX-Fluoreszenz .....	56
3.3.1	Ergebnisse der Fluorometrie .....	56
3.3.2	Ergebnisse der Durchflusszytometrie .....	56
3.3.3	Ergebnisse der Konfokalmikroskopie .....	58
3.4	Beeinflussung der PDT durch sekundäre Pflanzenstoffe .....	60
3.4.1	Bestrahlungsbedingungen.....	60
3.4.2	Einfluss auf die Zellvitalität .....	61
3.4.3	Einfluss auf die Zellproliferation .....	62
3.4.4	Einfluss auf die Induktion von Apoptose .....	63
3.5	Einfluss von Shikonin und PDT auf die mRNA-Expression .....	65
3.5.1	Charakterisierung von U87, GB14 und sU87 .....	65
3.5.2	Erhöhung von <i>NF-1</i> durch Shikonin und PDT .....	65
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
4.1	Sekundäre Pflanzenstoffe zeigen zytotoxische Effekte .....	67
4.1.1	Shikonin.....	67
4.1.2	Berbamin .....	67
4.2	Phytochemikalien in Kombination mit Temozolomid .....	68
4.3	Shikonin in Kombination mit 5-ALA und PDT .....	68
4.4	Konklusion .....	69

<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>77</b>
<b>Affidavit .....</b>	<b>78</b>
<b>Erklärung der Übereinstimmung .....</b>	<b>79</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>80</b>

## Zusammenfassung:

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist die häufigste maligne Neoplasie des menschlichen Nervensystems und erfordert durch seine oftmals infauste Prognose dringend neue therapeutische Optionen. Die interstitielle photodynamische Therapie (iPDT) erbringt als neue Behandlungsoption vielversprechende Ergebnisse in klinischen Studien. Ebenso scheinen einige aus der traditionellen chinesischen Medizin bekannte Phytochemikalien diverse anti-Tumor Effekte zu besitzen und sind *in vitro* sehr wirksam u.a. beim GBM.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss der beiden Phytochemikalien Shikonin und Berbamin auf Glioblastomstammzellen und untersucht den kombinierten Effekt von Shikonin mit photodynamischer Therapie *in vitro*. Die Hypothese ist, dass die Kombination von Shikonin oder Berbamin mit photodynamischer Therapie zu einer Wirkungsverstärkung führt und sich insbesondere Glioblastomstammzellen effektiver behandeln lassen.

Es kann gezeigt werden, dass sowohl Shikonin als auch Berbamin fähig sind, Zellvitalität und Proliferation verschiedener GBM-Zelllinien zu reduzieren, Apoptose zu induzieren und die Ausbildung sog. Tumorspheres (Tumorstammzellen) zu stören. Darüber hinaus wurde die Erkenntnis gewonnen, dass Shikonin die intrazelluläre Akkumulation von Protoporphyrin IX (PpIX) moduliert und dass die Kombination von Shikonin und PDT zu einer erhöhten Expression des Stammzellmarkers und Tumorsuppressors *Neurofibromin-1 (NF-1)* führt.

## Abstract (English):

Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (5-ALA-PDT) is a promising new approach in the therapy of malignant gliomas, such as Glioblastoma multiforme (GBM). This highly malignant tumor grows very invasively and shows a high resistance to conventional radio- and chemotherapy, due to the so-called glioblastoma stem cells (GSC). Phytochemicals originally known from traditional chinese medicine (TCM), such as Shikonin and Berbamine showed many different anti-tumor effects in recent studies, especially in the treatment of GSC. The assumption is that the combination of Shikonin or Berbamine with photodynamic therapy is more efficient than either therapy alone and that especially glioblastoma stem cells are treated more effectively.

In this thesis, it is shown that Shikonin and Berbamine exhibit various anti-tumor effects *in vitro* such as decreasing cell viability, inhibiting tumor cell proliferation and inducing apoptosis. A combined treatment with the chemotherapeutic Temozolomide (TMZ) was often more effective than either treatment alone. An inhibition of the development of tumor spheres (tumor stem cells) from adherent cells could be detected, especially using Shikonin. Shikonin was also able to modulate the intracellular PpIX accumulation after incubation together with 5-ALA and could increase the mRNA expression of the tumor suppressor *Neurofibromin 1 (NF-1)* after treating the cells with Shikonin and PDT.

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Modell zur Entstehung von Tumorstammzellen. Aus dem regulären Differenzierungsweg der Zellen von Stammzelle über Progenitorzelle zur differenzierten Zelle können durch epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und De-Differenzierung Tumorstammzellen entstehen. Auch aus bereits bestehenden Tumorzellen können durch epithelial-mesenchymale Transition Tumorstammzellen hervorgehen. (aus Keyvani-Ghamsari et al. 2021 [17], modifiziert; Abbildung erstellt mit BioRender.com).....14
- Abbildung 2: Mitochondriale Dysfunktion führt zu gestörter Kalziumhomöostase, Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) und Zellzyklus-Kontrollverlust. Stammzellen, die in G0 (Quiescence) übergehen, sind außerhalb der Teilungsaktivität und nicht mehr für konventionelle Chemotherapien anfällig, können aus diesem Zustand jedoch reaktiviert werden. (Iranmanesh et al. 2021 [18], modifiziert; Abbildung erstellt mit BioRender.com).....15
- Abbildung 3: A: Hellfeldmikroskopie einer Wurzel von *E. plantagineum*, Lokalisation von Shikonin (rot) hauptsächlich im Periderm (Balken: 1 mm, Zhu et al. 2016 [34], modifiziert); B: Shikoninfluoreszenz in der Konfokalmikroskopie eines Wurzelhaars von *E. plantagineum* (Balken: 10 µm, Zhu et al. 2016 [34], modifiziert); C: Strukturformel von Shikonin (Andújar et al, 2012 [37]). .....17
- Abbildung 4: Links: Blätter und Früchte von *Berberis vulgaris* (Zarei et al. 2015 [44]) Rechts: Strukturformel von Berbamin ([https://en.wikipedia.org/wiki/Berberamine#/media/File:Berbamine\\_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Berberamine#/media/File:Berbamine_structure.svg), Stand 02.09.2022) .....18
- Abbildung 5: Schematische Darstellung des photodynamischen Effektes. Der Photosensibilisator wird im Singulett-Grundzustand durch einfallendes Licht hvabs angeregt. Den angeregten Singulett-Zustand kann er über Fluoreszenz hvem oder Internal Conversion wieder verlassen oder wechselt über Spintumkehr in den angeregten Triplett-Zustand (Intersystem Crossing). Dieser kann über die Typ 1 – Reaktion (Bildung von Hydroxyradikalen), die Typ 2 Reaktion (Bildung von Singulett-Sauerstoff) oder Phosphoreszenz hvem verlassen werden (Silva et al. 2015 [60], modifiziert; Abbildung erstellt mit BioRender.com). .....19
- Abbildung 6: Oben: Vereinfachte schematische Darstellung der Hämbiosynthese und der PpIX-Entstehung (Stepp et al. 2018 [10], modifiziert; Abbildung erstellt mit BioRender.com). Unten links: Strukturformel von 5-ALA ([https://de.wikipedia.org/wiki/5-Aminol%C3%A4vulins%C3%A4ure#/media/Datei:5-amino-4-oxopentanoic\\_acid\\_200.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/5-Aminol%C3%A4vulins%C3%A4ure#/media/Datei:5-amino-4-oxopentanoic_acid_200.svg), Stand 05.09.2022). Unten rechts: Strukturformel von PpIX ([https://en.wikipedia.org/wiki/Protoporphyrin\\_IX#/media/File:PpIXtransH.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Protoporphyrin_IX#/media/File:PpIXtransH.png), Stand 05.09.2022).....20
- Abbildung 7: Absorptionsspektrum von PpIX (schwarze Kurve), Soret Bande (a, 405 nm) und Q-Banden von blauem (b, 505 nm), grünem (c, 540 nm), gelbem (d, 575 nm) und rotem Licht (e, 630 nm). (Valentine 2011 [62]).....21
- Abbildung 8: Klinische Umsetzung der 5-ALA basierten photodynamischen Therapie. Drei bis vier Stunden vor Operation werden dem Patienten 20 mg/kgKG 5-ALA (Gliolan®, ALAGLIO®, medac, Wedel) oral verabreicht. Es kommt zu einer tumorselektiven Anreicherung von PpIX. Entsprechend der vorangegangenen Bestrahlungsplanung werden die Laserfasern stereotaktisch operativ in das Tumervolumen eingebracht. Nach korrekter Platzierung wird für eine Stunde der Laser aktiviert und der Tumor mit 200 mW/cm Faserlänge ausgeleuchtet (nach Stepp et al. 2018 [10]; Abbildung erstellt mit BioRender.com).....23
- Abbildung 9: Zeitliche Entwicklung einer U87 *Sphere*. Zum Zeitpunkt d0 direkt nach dem Ausbringen (d0) in 75 cm<sup>2</sup> *ultra-low-attachment* Flasche, sowie nach zwei (d2) bzw. sieben (d7) Tagen Inkubation im Brutschrank. ....30
- Abbildung 10: Inkubationsschema vor Konfokalmikroskopie. Nach Ausbringen auf 18-well µ-slides wurden die Zellen für 12 bzw. 24 Stunden in Zellkulturmedium ohne Zusätze vorinkubiert. Zu den Zeitpunkten -16 h und -4 h wurde das Zellkulturmedium ausgetauscht gegen Medium mit Shikonin (1 bzw. 2 µM) +/- 5-ALA (100 µg/ml) oder Ko143 (1 µM) +/- 5-ALA. Diese werden bis zum Zeitpunkt 0 h, d.h. für weitere 16 bzw.

- 4 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 h werden die Zellen mit Rhodamin 123 gefärbt und 30 min später mikroskopiert. .... 35
- Abbildung 11: Temperaturkontrollierte Zellkultur-Laserkammer für die Bestrahlung von bis zu zwei Platten gleichzeitig. Der Strahlengang verläuft im Bild von unten nach oben (direkt rechts des weißen Pfeils). Ein Motor bewegt die Platten entsprechend der Programmierung, der Deckel zum Schutz vor Umgebungslicht ist zu Demonstrationszwecken geöffnet (linkes Bild). Über eine Blende direkt hinter der Linse kann der bestrahlte Bereich in Abhängigkeit der gewählten Platte eingegrenzt werden, so können sog. „Sixpacks“ auf 96-well-Platten (Bild oben rechts, Sixpacks rot markiert) oder jede Vertiefung der 6-well-Platten (Bild unten rechts) einzeln bestrahlt werden. .... 36
- Abbildung 12: Inkubationsschema vor Messung der Zellvitalität. Dargestellt sind jeweils nur die kombinierten Inkubationen Shikonin/TMZ/5-ALA, die Kontrollgruppen (keine Behandlung, nur PDT, nur TMZ, nur Shikonin, Shikonin + PDT, TMZ + PDT, Shikonin + TMZ) sind der Übersicht wegen nicht gezeigt. .... 38
- Abbildung 13: Oben: Die resistenten Zelllinien zeigen eine geringere TMZ-Sensibilität. Anteil der Annexin-V-positiven Zellen nach fünftägiger Inkubation mit TMZ in verschiedenen Konzentrationen (U87: 0,3 mM; GB14: 0,7 mM; U251: 1,25 mM). Verglichen werden die parentalen adhären Zellen (schwarze Punkte) mit den dazugehörigen resistent gezüchteten Zelllinien (weiße Punkte). Dargestellt als Einzelwerte einer Messreihe (n = 3). Unten: Exemplarische Darstellung der Auswertung für U87 und rU87. Dargestellt als Histogramm in Abhängigkeit der Annexin-APC Fluoreszenz. .... 44
- Abbildung 14: Dosisabhängige Reduktion des Zellüberlebens. Shikonin (Spalte links), Berbamin (Mitte) und TMZ (Spalte rechts) senken die Vitalität in U251, sU251, U373, sU373, U87, sU87 und GB14 (von o. nach u.). Konzentrationsabhängige Darstellung der 24h- und 48h-Werte als Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 9; Daten teilweise aus Werner et al. 2022 [96], modifiziert). .... 46
- Abbildung 15 (zwei Seiten): Shikonin und Berbamin hemmen die Zellproliferation. Shikonin und Berbamin sind in  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> und 2x IC<sub>50</sub> jeweils allein und in Kombination mit TMZ dargestellt als Einzelwerte (n = 9) und Median (roter Balken; Daten teilweise aus Werner et al. 2022 [96], modifiziert). .... 49
- Abbildung 16: Oben: Fotografische Dokumentation der Spherebildung direkt nach Kulturstart (d0), an Tag 2 (d2) und Tag 3 (d3) der Zelllinien U87, U251, U373 und GB14. Behandlung mit Shikonin, Berbamin, TMZ und Kombinationen jeweils in IC<sub>50</sub>. Unten: Quantitative Darstellung der Spherebildung, gezählt wurden jeweils 10 Gesichtsfelder ( $\varnothing$  2,0 mm, 3,1 mm<sup>2</sup>), dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 9; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; Signifikanzangaben in Bezug zur Kontrollgruppe, „nicht-signifikant“ ist der Übersicht halber nicht dargestellt; Daten teilweise aus Werner et al. 2022 [96], modifiziert). .... 53
- Abbildung 17: Oben: Anteil von Annexin-V-positiven Zellen an der gesamten Zellzahl nach fünftägiger Inkubation mit Shikonin, Berbamin, TMZ und Kombination in IC<sub>50</sub> (U87, GB14, U251 und U373) und  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> (U87, GB14) dargestellt als Mittelwert + SEM (n = 9; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) Unten: Beispielhafte Darstellung der Auswertungsergebnisse von U87 (IC<sub>50</sub>), hier jeweils eine Messung (n = 1, entspricht 10.000 Zellen; Daten teilweise aus Werner et al. 2022 [96], modifiziert). .... 54
- Abbildung 18: Relatives Zellüberleben von U87, rU87 und sU87 in Abhängigkeit steigender TMZ-Konzentration und 24-stündiger Koinkubation mit Shikonin (0,8; 1,6 und 3,2  $\mu$ M). Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 9). .... 55
- Abbildung 19: Shikonin erhöht die PpIX-Fluoreszenz in U87. Untersuchung der zellulären Fluoreszenz von parentalen U87 und GB14 nach 24-stündiger Inkubation mit 5-ALA. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz in Abhängigkeit steigender Konzentrationen von 5-ALA bei gleichzeitiger Inkubation mit oder ohne Shikonin (U87: 1,25  $\mu$ M; GB14: 1,75  $\mu$ M) als Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 9, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01). .... 56
- Abbildung 20: Modulierung der PpIX-Fluoreszenz durch Ko143 und Shikonin. Untersuchung der zellulären Fluoreszenz im FL3-Kanal (670 nm LP) mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen (obere Reihe: parentale U87; mittlere Reihe: GB14; untere Reihe: U87 Spheres) wurden jeweils mit oder ohne 5-ALA (100  $\mu$ g/ml) behandelt und mit Shikonin oder Ko143 koinkubiert (U87/sU87: 1  $\mu$ M; GB14: 0,3  $\mu$ M). Die Daten sind dargestellt als Histogramme (links) und als Balkendiagramme mit Mittelwert + SEM (Mitte),



Mittelwerte abzüglich der Kontrollgruppen + SEM (rechts), n = 9 (** p < 0,001; Werner et al. 2022 [96], modifiziert) .....	57
Abbildung 21: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Transmission (links), der Fluoreszenz von Rhodamin 123 (Mitte links), PpIX (Mitte rechts) sowie der Kombination (rechts) in U251 nach 16-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Kombinationen aus 5-ALA (50 µg/ml), Ko143 (1 µM) und Shikonin (1 µM bzw. 2 µM). Die Zellen wurden 30 min vor der Aufnahme mit Rhodamin 123 (0,02 µM) angefärbt und anschließend zweimal gewaschen. Der Balken entspricht 50 µm.....	59
Abbildung 22: 5-ALA Inkubation für 24 Stunden und anschließende Bestrahlung führen zu verringertem Zellüberleben. U87 (links), GB14 (Mitte) und U251 (rechts) wurden jeweils einen Tag mit vier verschiedenen Konzentrationen an 5-ALA (0, 25, 50 und 100 µg/ml) inkubiert und anschließend mit unterschiedlicher Intensität bestrahlt (635 nm). Gezeigt ist jeweils das mittlere Zellüberleben relativ zur Kontrollgruppe 24 Stunden nach Bestrahlung ausgewertet mittels CellTiter® Blue Assay (Mittelwert +/- SEM, n = 18). Die Markierungen zeigen die jeweils ausgewählten Kombinationen aus Inkubation und Bestrahlung für die darauffolgenden Experimente. ....	61
Abbildung 23: Shikonin und TMZ haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellvitalität nach <i>in vitro</i> PDT in U87 (links) und GB14 (rechts) Zellen. Vierundzwanzig Stunden nach Start der Zellkultur wurden die Zellen mit Shikonin (U87: 0,3 und 0,6 µM; GB14: 0,45 und 0,9 µM) und/oder TMZ (U87: 37,5 und 75 µM; GB14: 87,5 und 175 µM) für einen Tag inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FCS-freiem Medium und 100 µg/ml 5-ALA für weitere 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurde das Medium wieder gegen FCS-haltiges Medium gewechselt und die Zellen mit der vorab ermittelten Strahlungsintensität (s. Abbildung 22) bestrahlt. Am darauffolgenden Tag wurde dann ein CellTiterBlue®-Assay durchgeführt, um die Zellvitalität zu bestimmen. Kontrollgruppen wurden eingerichtet, die Daten sind relativ zur Kontrolle dargestellt als Mittelwert ± SEM (n = 18). ....	62
Abbildung 24: Shikonin und TMZ haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellproliferation nach <i>in vitro</i> PDT in U87 (links) und GB14 (rechts) Zellen. Vierundzwanzig Stunden nach Start der Zellkultur wurden die Zellen mit Shikonin (U87: 0,3 und 0,6 µM; GB14: 0,45 und 0,9 µM) und/oder TMZ (U87: 37,5 und 75 µM; GB14: 87,5 und 175 µM) für einen Tag inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FCS-freiem Medium und 100 µg/ml 5-ALA für weitere 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurde das Medium wieder gegen FCS-haltiges Medium gewechselt und die Zellen mit der vorab ermittelten Strahlungsintensität (s. Abbildung 22) bestrahlt. Am darauffolgenden Tag wurde dann ein CellTiter96® AqueousOneSolution-Assay durchgeführt, um die Zellproliferation zu bestimmen. Kontrollgruppen wurden eingerichtet, die Daten sind relativ zur Kontrollgruppe dargestellt als Mittelwert ± SEM (n = 18). ....	63
Abbildung 25: Shikonin und Ko143 zeigen uneindeutige Effekte auf die Induktion von Apoptose nach PDT. U87 (links), GB14 (Mitte) und U87 Spheres (rechts) wurden vier Stunden mit 5-ALA (100 µg/ml), Shikonin oder Ko143 (je 1 µM bzw. 0,3 µM) inkubiert und anschließend bestrahlt. Gezeigt ist der Anteil an apoptotischen Zellen (1 = 100%) in der Gesamtzahl an behandelten Zellen 24 Stunden nach der Bestrahlung, gemessen mittels Durchflusszytometrie und aufgetragen als Mittelwert +/- SEM (n = 9). Zur besseren Übersicht sind nur die signifikanten Unterschiede dargestellt (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001), alle nicht-signifikanten Unterschiede sind nicht dargestellt. ....	64
Abbildung 26: PDT und Shikonin führen zu einer Erhöhung der NF-1 mRNA-Expression. Dargestellt ist jeweils die mittlere mRNA-Expression relativ zur Kontrollgruppe gemessen mit RT-qPCR (Mittelwert +/- SEM, n = 6; Werner et al. 2022 [96], modifiziert) .....	66

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die für die PCR genutzten Primerpaare. hPARK7-f2 und hPARK7-r2: aus Chen et al. 2012 [94]. ....	41
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

---

Tabelle 2: Übersicht über die halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC <sub>50</sub> ), die aus den Zellvitalitätskurven (vgl. Abbildung 14) ermittelt wurden. Dargestellt sind für vier Zelllinien und die Spheres von U87, U251 und U373 jeweils der 24 und 48 Stunden-Wert für Shikonin, Berbamin und TMZ. ....	45
Tabelle 3: mRNA-Expression relativ zur Menge an TBP. Aufgeführt sind die Werte von U87, sU87 und GB14 als Mittelwert und Standardabweichung (SD, n = 2).....	65

## Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-aminolevulinic acid (5-Aminolävulinsäure)
CSC	Cancer stem cells (Tumorstammzellen)
ECACC	European Collection of Authentic Cell Cultures
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FGR	Fluoreszenzgestützte Resektion
GBM	Glioblastoma multiforme
GSC	Glioblastoma stem cells (Glioblastomstammzellen)
IC50	Half maximal inhibitory concentration (halbmaximale Hemmkonzentration)
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
LTI	Labor für Tumorummunologie (München)
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PDT	Photodynamische Therapie
PpIX	Protoporphyrin IX
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	real time quantitative polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion)
TBP	TATA-bindendes Protein
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TMZ	Temozolomid
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Glioblastoma multiforme (GBM)

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist mit 57% der zentralnervösen Neoplasien der häufigste Hirntumor des Menschen und zugleich einer der tödlichsten Krebserkrankungen überhaupt. Die Inzidenz beträgt jährlich 3,21 pro 100.000 Einwohner (USA 2011-2015), Männer sind 1,58-mal häufiger betroffen als Frauen. [1]

Die initiale Symptomatik der Erkrankung wird meist bestimmt von der intrakraniellen Druckerhöhung, bedingt durch die raumfordernde Wirkung des Tumors. Im Vordergrund stehen dabei häufig Kopfschmerz, fokalneurologische Ausfälle und in ca. 25% der Fälle demaskiert sich das GBM durch einen epileptischen Anfall. Zur initialen Diagnostik wird in der Regel ein bildgebendes Verfahren in Form von Computer- oder Magnetresonanztomografie gewählt. Unter Gadoliniumgabe zeichnet sich darin oftmals eine periphere Kontrastmittelaufnahme mit einer zentralen Nekrose ab. Einblutungen, Ödeme und verkleinerte Ventrikel sind weitere radiologische Hinweise. [2]

Zur sicheren Diagnosestellung wird entweder eine Gewebeprobe stereotaktisch entnommen oder Gewebestücke bei der mikrochirurgischen Resektion gewonnen, welche dann jeweils durch die Histopathologie beurteilt werden [3].

### 1.1.1 Klassifikation nach WHO

Entsprechend der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems von 2021 gehört das Glioblastom zu den astrozytären Tumoren und damit zu den neuroepithelialen Neoplasien innerhalb der Gruppe der Gliome [4, 5]. Während in der vierten Auflage dieser Klassifikation von 2016 noch zwischen Glioblastom, IDH-mutiert und Glioblastom, IDH-Wildtyp unterschieden wurde [6], werden in der neuen Auflage nur noch die Tumore vom IDH-Wildtyp als Glioblastom bezeichnet [4]. Das bis 2021 sog. IDH-mutierte GBM wird nun als Astrozytom, IDH-mutiert, WHO-Grad IV bezeichnet [5, 6]. Jedes GBM wird als besonders bösartiger Tumor dem WHO Grad IV zugerechnet und geht damit mit einer deutlichen Reduktion der Lebenszeit einher, solange es weiterhin keine effektive Therapie gibt [4].

### 1.1.2 Aktuelle Therapierichtlinien

Die aktuelle Therapie des Glioblastoms beinhaltet im Wesentlichen die möglichst vollständige chirurgische Resektion [7, 8] und eine adjuvante Radiochemotherapie nach dem sog. Stupp-Protokoll [9]. Dieses Schema sieht eine fraktionierte Bestrahlung über einen Zeitraum von sechs Wochen vor, mit zusätzlicher Gabe der DNA-alkylierenden Substanz Temozolomid (TMZ), welche parallel zur Bestrahlung erfolgt und im Anschluss für sechs Monate fortgeführt wird [9]. Vollständige Resektion bedeutet, dass der makroskopisch sichtbare Tumor chirurgisch komplett entfernt wurde und in der postoperativen MRT keine kontrastmittelaufnehmenden Areale mehr nachweisbar sind [7, 8].

Eine Resektion aller Tumorzellen ist aber in den meisten Fällen nicht möglich, da das Glioblastom ein sehr infiltratives Wachstum zeigt, welches oft weit über die intraoperativ sichtbaren Ränder hinausreicht. Zudem befinden sich häufig neurologisch relevante Areale, die bei der Operation nicht geschädigt werden sollen, in unmittelbarer Nähe der Neoplasie, so z.B. sprachliche und motorische Regionen der Großhirnrinde. [2]

Eine Verbesserung der Vollständigkeit der Tumorentfernung bietet die sog. fluoreszenzgestützte Resektion (FGR). Dabei wird dem Patienten drei bis vier Stunden vor Operations- und Narkosebeginn 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), eine Vorstufe des Hämoglobins, oral verabreicht, das zu dem fluoreszierenden und photoaktiven Porphobilinogen (PBG) umgebaut wird, welches tumorselektiv akkumuliert (s. auch 1.4.2). Mittels in das OP-Mikroskop integrierter Fluoreszenzmikroskopie kann der Operateur gezielt nach fluoreszierenden Arealen suchen und sie entfernen. Es konnte gezeigt werden, dass dies in 65% der Fälle zur vollständigen Resektion führte (vgl. 36% bei Weißlicht) und das 6-monatige progressionsfreie Intervall von 21% auf 41% der Patienten erhöht werden konnte. [10]

### 1.1.3 Prognose und Überlebenswahrscheinlichkeiten

Die Prognose eines Patienten mit Glioblastom ist nach wie vor schlecht. Lediglich 30% der Patienten bleiben innerhalb des ersten Jahres nach Diagnose progressionsfrei [11], das Fünfjahresüberleben liegt bei unter 5% [2], bzw. 5,5% [12]. In neueren Studien wird das mittlere Überleben innerhalb der ersten fünf Jahre mit 13,8% beschrieben und die mittlere Überlebenszeit mit 12 Monaten angegeben, bzw. 23 Monate unter bestmöglicher Therapie, sprich vollständige chirurgische Resektion plus perioperative Radiochemotherapie [13]. Geringes Alter, guter Allgemeinzustand und MGMT Methylierung sind die wichtigsten Faktoren für eine bessere Prognose des Patienten [14].

## 1.2 Tumorstammzellen

Einen Erklärungsansatz für die hohen Rezidivraten, das schlechte Ansprechen auf die etablierten Therapien und die weiterhin infauste Prognose der Glioblastompatienten bietet das Modell der sog. Tumorstammzellen (CSC).

### 1.2.1 Eigenschaften und Charakterisierung

Nach diesem Konzept sind viele maligne Tumore, insbesondere das Glioblastom eine sehr heterogene Ansammlung von Zellen [15, 16]. Die Hauptmasse des Tumors wird gebildet durch teilungsunfähige, differenzierte Zellen [17]. Diese Zellen können durch epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zu Glioblastomstammzellen (GSC) mutieren, welche in ihren zellulären Eigenschaften den physiologisch vorkommenden Gewebestammzellen des menschlichen Körpers ähneln [17]. GSC können ebenso aus normalen Gewebestammzellen, Progenitorzellen und differenzierten Zellen durch Mutationen und De-Differenzierung entstehen (s. Abbildung 1) [17]. Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können durch Teilung weitere Stammzellen oder teilungsfähige Progenitorzellen hervorbringen [18]. Diese können wiederum ausdifferenzieren und eine Größenzunahme des Tumors bewirken [18]. Die Stammzellen sind aufgrund guter DNA-Reparaturmechanismen re-

sistenter gegenüber Radio- und Chemotherapie (Maintenance), können in die G0-Phase des Zellzyklus wechseln (Quiescence) und können so den zellteilungsinhibierenden Chemotherapien entkommen [18, 19]. Sie sind mitunter verantwortlich für invasives Tumorwachstum und Metastasierung [20].

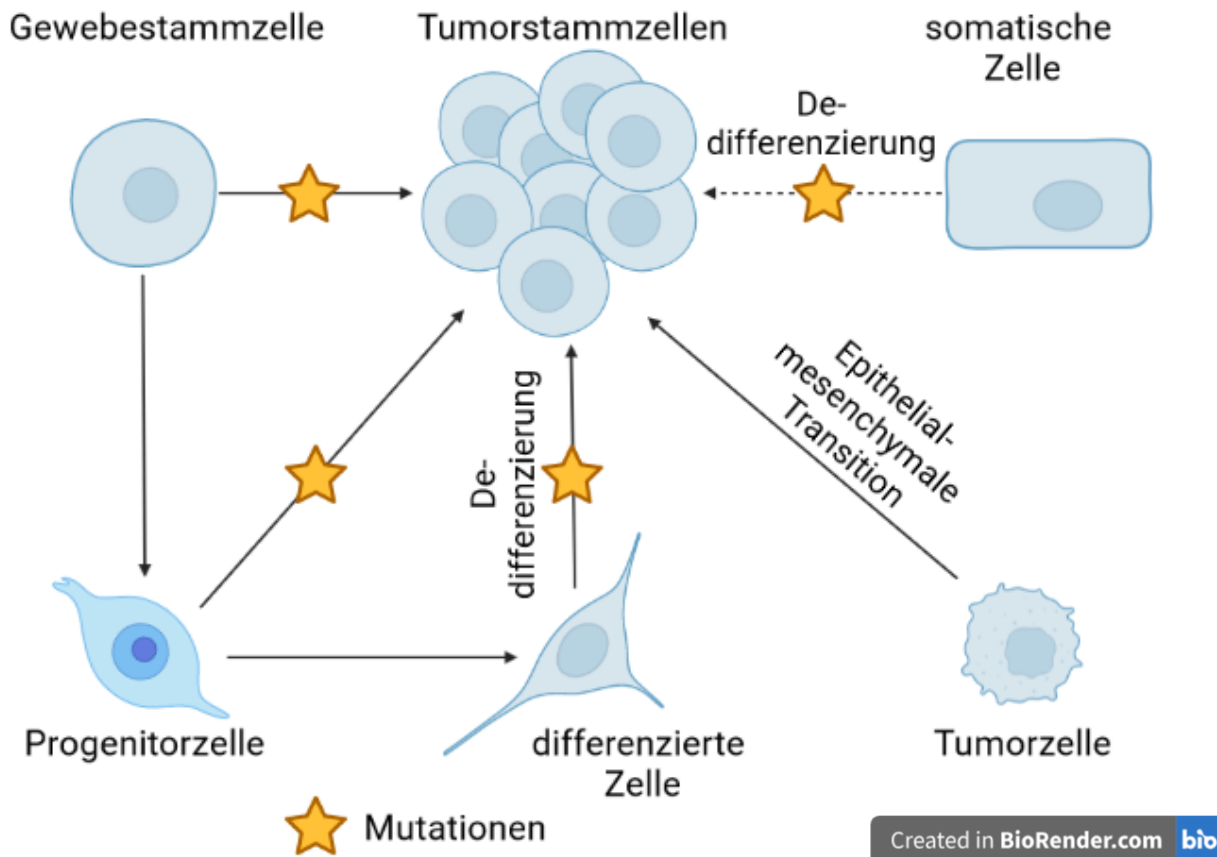


Abbildung 1: Modell zur Entstehung von Tumorstammzellen. Aus dem regulären Differenzierungsweg der Zellen von Stammzelle über Progenitorzelle zur differenzierten Zelle können durch epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und De-Differenzierung Tumorstammzellen entstehen. Auch aus bereits bestehenden Tumorzellen können durch epithelial-mesenchymale Transition Tumorstammzellen hervorgehen. (aus Keyvani-Ghamsari et al. 2021 [17], modifiziert; Abbildung erstellt mit BioRender.com)

GSC exprimieren wie die meisten Stammzellen spezifische Oberflächenmarker und intrazelluläre Proteine. *CD133* ist ein transmembranes Glykoprotein und ein bekannter Stammzellmarker, dessen Expression mit erhöhter Tumorgenese und Metastasierung assoziiert ist [21]. *CD44* ist als Oberflächenprotein ein weiterer bekannter Stammzellmarker und ist u.a. verantwortlich für Tumorprogression und Metastasierung [22]. Auch wurden viele neue Marker gefunden, die entscheidende Rollen im Glioblastom spielen könnten. Der Marker *ATG4C* scheint durch Autophagozytose das Wachstum voranzutreiben, wobei ein Knock-Down zur Inhibition von Tumorprogress und zur Erhöhung der TMZ-Sensitivität führt [23]. Das Transkriptionsprodukt von *DJ-1* (alias *PARK-7*) reduziert die Konzentration an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und trägt zur Selbsterneuerung der Stammzellen bei [24]. Das Protein *ABCG2* als membranständiger Transporter bedingt durch Ausschleusungsprozesse wesentlich die Chemotherapieresistenz [25]. Das Protein *ABCB6* gehört ebenfalls zur Familie der ATP-binding cassette (ABC) Transportern und ist ein Porphyrintransporter und

zum Ein- und Ausschleusen von Häm und seinen Vorstufen in und aus der Zelle fähig [26]. *Neurofibromatosis Typ 1 (NF-1)* loss-of-function Mutationen gehen mit höherer Aggressivität des Glioblastoms einher [27]. *Nestin* ist ein Intermediärfilament und besonders in teilungsfähigen Progenitor- und Stammzellen zu finden [28, 29].

### 1.2.2 Die Rolle der Mitochondrien in der Tumorerhaltung

Auch die Mitochondrien spielen in vielen zellulären Prozessen des Glioblastoms eine entscheidende Rolle. Nicht nur, dass sie für die Stammzellen einen erheblichen Anteil zur Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung beitragen, sie sind auch für Kalziumhomöostase wichtig und sind beteiligt an der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Mitochondriale Dysfunktion führt zu einem Ungleichgewicht im intrazellulären Kalziumhaushalt, verringerter Zykluskontrolle, stärkerer Proliferation und trägt so zur Tumorentstehung bei. Zudem gehen mehr Stammzellen in das Quiescence-Stadium über und fördern so das langfristige Tumorüberleben. [18]

Mitochondriale Dysfunktion und Aufspaltung der Mitochondrien als Folge einer Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase- (MAPK-) Kaskade und des Myelocytomatose-Onkogens (MYC) führt zur epithelial-mesenchymalen Transition, die ein wichtiger Baustein in der Migrationsfähigkeit von malignen Neoplasien ist [30].

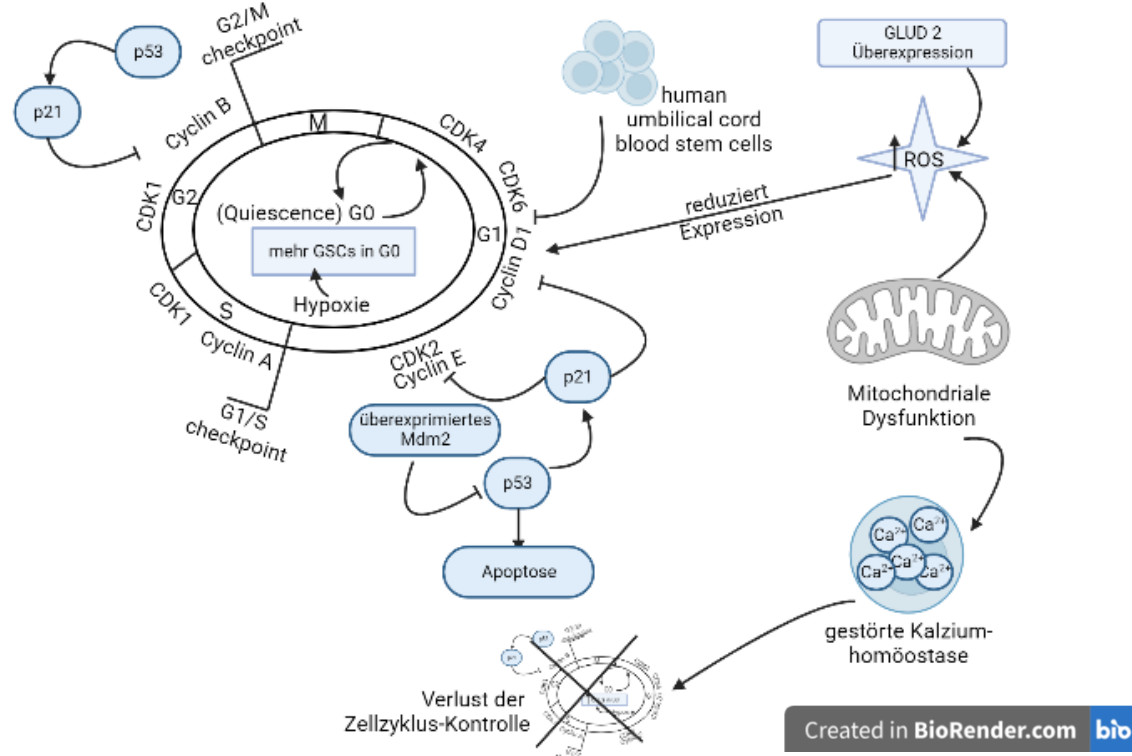


Abbildung 2: Mitochondriale Dysfunktion führt zu gestörter Kalziumhomöostase, Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) und Zellzyklus-Kontrollverlust. Stammzellen, die in G0 (Quiescence) übergehen, sind außerhalb der Teilungsaktivität und nicht mehr für konventionelle Chemotherapien anfällig, können aus diesem Zustand jedoch reaktiviert werden. (Iranmanesh et al. 2021 [18], modifiziert; Abbildung erstellt mit BioRender.com)

## 1.3 Sekundäre Pflanzenstoffe

Neue Therapien gegen das Glioblastom müssen zielgerichtet sein und insbesondere die oben beschriebenen Tumorstammzellen mitefassen. Eine Möglichkeit dazu könnten die sog. sekundären Pflanzenstoffe bieten, von denen einige in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung geraten sind.

### 1.3.1 Definition

Als sekundäre Pflanzenstoffe (auch Phytochemikalien oder Phytamine genannt) werden Substanzen beschrieben, die von verschiedensten Pflanzenarten produziert werden, aber für diese nicht zwingend lebensnotwendig sind. Sie nutzen den Pflanzen z.B. in der Abwehr von Pathogenen und Herbivoren, bei der Anlockung von Insekten und beim Schutz vor UV-Strahlung. Darunter fallen diverse chemische Verbindungen wie u.a. Phenole, Terpene, Betalaine, Chinone, etc. [31]

### 1.3.2 Ursprünge in der Traditionellen Chinesischen Medizin

Die traditionelle chinesische Medizin greift in der Behandlung von Tumoren bereits seit Jahrhunderten auf sekundäre Pflanzenstoffe zurück, die in verschiedensten Darreichungsformen angeboten werden - die erste Beschreibung geht bis in die Qin-Dynastie im dritten Jahrhundert vor Christus zurück. Die Phytochemikalien konnten Symptome der Tumorerkrankung lindern und zur Verbesserung der Lebensqualität beitragen. [32]

In den letzten Jahrzehnten haben sich diese Stoffe nicht nur in der adjuvanten Therapie der Tumorbildung etabliert, immer mehr Forschungsergebnisse zeigen, dass viele traditionell chinesischen Medikamente auch diverse therapeutische Effekte auf Tumorstammzellen (CSC) haben. *In vitro* und *in vivo* konnte gezeigt werden, dass sekundäre Pflanzenstoffe Apoptose induzieren und Autophagozytose inhibieren, dass es zu einer Reduktion von Zellvitalität, -proliferation und -invasion kommt, Stammzellmarker herunterreguliert werden und eine Sensibilisierung gegen Chemotherapien stattfindet. [33]

### 1.3.3 Shikonin

Shikonin ist chemisch den Naphthochinonen zuzuordnen und kann u.a. aus der Wurzel von *Lithospermum erythrorhizon* oder *E. plantagineum* isoliert werden [34]. Dort liegt der Wirkstoff überwiegend in kleinen Vesikeln im Periderm der Wurzeln vor (s. Abbildung 3A+B) [34]. Es ist der Hauptwirkstoff des in der TCM als *Zicao* beschriebenen Medikamentes und ist dort für seine antiinflammatorischen, antimikrobiellen und wundheilenden Effekte bekannt [35, 36]. Die Strukturformel ist in Abbildung 3C dargestellt [37].



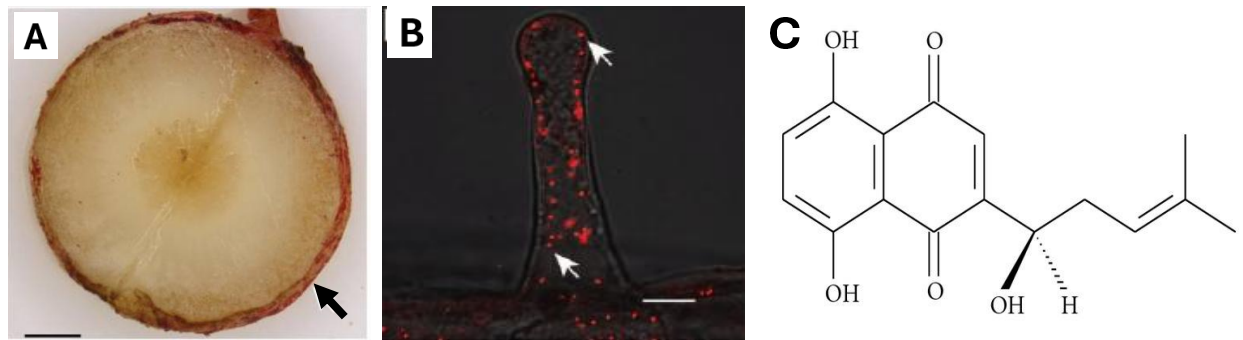


Abbildung 3: A: Hellfeldmikroskopie einer Wurzel von *E. plantagineum*, Lokalisation von Shikonin (rot) hauptsächlich im Periderm (Balken: 1 mm, Zhu et al. 2016 [34], modifiziert); B: Shikoninfluoreszenz in der Konfokalmikroskopie eines Wurzelhaars von *E. plantagineum* (Balken: 10 µm, Zhu et al. 2016 [34], modifiziert); C: Strukturformel von Shikonin (Andújar et al, 2012 [37]).

Neuere Forschungsergebnisse implizieren, dass Shikonin sehr wirksam in der Behandlung maligner Neoplasien, insbesondere des Glioblastoms sein könnte. Über DNA-Alkylierung und radikale Sauerstoffspezies (ROS) werden direkte und indirekte Zellschäden verursacht, die eine Immunreaktion auslösen und in Tumorzellen zu Apoptose und Nekroptose führen [38]. Shikonin blockiert die Zellproliferation, die Invasions- und Migrationsfähigkeit über die Beeinflussung verschiedener Signalwege z. B. über PI3K/AKT, miR-17-5p/PTEN/Akt und EGF [39-41]. Es kann die Wirkung von konventionell verwendeten Chemotherapeutika über die Blockade von Membrantransportern wie ABCG2 verstärken, gezeigt wurde das u. a. am Prostata- [25] und am Lungenkarzinom [42].

### 1.3.4 Berbamin

Berbamin zählt zu den Isochinolinalkaloiden und kann aus Berberitzen gewonnen werden, z.B. *Berberis amurensis* [43] oder *Berberis vulgaris* [44]. In *Berberis vulgaris* (s. Abbildung 4 links) kommt Berbamin in allen Teilen der Pflanze vor, und insbesondere in Wurzel und Rinde [44]. Chemisch wird es den Isochinolinalkaloiden zugeordnet, die Strukturformel ist in Abbildung 4 rechts zu sehen [44]. Wie auch bei anderen Phytochemikalien wurde bei Berbamin eine Vielzahl an anti-Tumor Eigenschaften festgestellt. Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass Berbamin zur Inhibition von Proliferation, Migration und Invasion bei Brust- [45], Lungen- [46], Prostata- [47] oder Leberzellkarzinomen [48] führt. Ebenso kommt es zur Induktion von Apoptose und zur Reduktion von Zellüberleben und -proliferation in verschiedenen Tumorzelllinien [49, 50]. Auch hier scheinen mehrere Signalwege eine entscheidende Rolle zu spielen, u. a. über PI3K/Akt, MDM2-p53, c-Maf [45] und ROS/NF-kappaB [51].

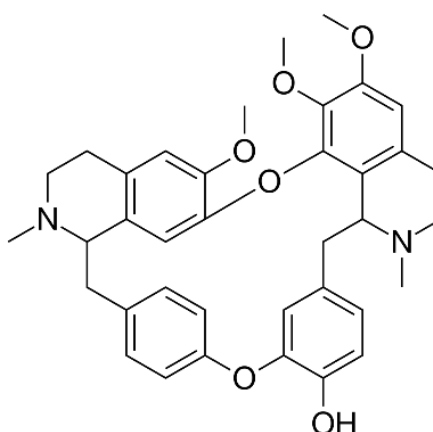


Abbildung 4: Links: Blätter und Früchte von *Berberis vulgaris* (Zarei et al. 2015 [44]) Rechts: Strukturformel von Berbamin ([https://en.wikipedia.org/wiki/Berbamine#/media/File:Berbamine\\_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Berbamine#/media/File:Berbamine_structure.svg), Stand 02.09.2022)

## 1.4 Photodynamische Therapie (PDT)

Die photodynamische Therapie (PDT) ist ein neuartiges Behandlungskonzept in der Medizin, das auf der Sensibilisierung der kranken Zellen gegenüber sichtbarem Licht beruht [52]. Das klinische Anwendungsspektrum ist sehr weit gefächert und das Interesse in der internationalen Forschergemeinschaft ist sehr hoch.

### 1.4.1 Ursprünge und Entdeckung

Erstmalig beschrieben wurde der photodynamische Effekt 1900 und 1904 durch den in München wirkenden Arzt und Pharmakologen Herrmann von Tappeiner und seinem Doktoranden Oscar Raab. Bei dessen Forschungsarbeiten wurde entdeckt, dass bestimmte Farbstoffe den Zelltod induzieren können, wenn die verwendeten Mikroorganismen nach Inkubation mit der Substanz dem Sonnenlicht exponiert wurden. [52]

Von Tappeiner prägte bereits damals den Begriff der Photodynamik und beschrieb die drei wesentlichen Komponenten der PDT: Photosensibilisator, Sauerstoff und Licht [53]. In der Mitte des 20. Jahrhunderts trug F.H.J. Figge einige Forschungsarbeiten zusammen, die zeigten, dass sich exogen zugeführte Porphyrinmoleküle selektiv in murinen Tumoren akkumulieren können [52, 54]. Wenig später konnte auch am Menschen gezeigt werden, dass Porphyringabe zu einer Fluoreszenz bestimmter Tumoren führt [52]. Da zunächst die apparative Ausstattung für den klinischen Einsatz der PDT fehlte [53], kam es erst in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts zu den ersten erfolgreichen Therapien am Patienten durch die Gruppe um Dougherty im Roswell Park Cancer Institute, USA [52, 55, 56]. Zu Beginn noch auf gut zugängliche und oberflächliche Karzinome wie Haut- und Schleimhauttumoren begrenzt, weiteten sich die Experimente und Forschungsarbeiten zur PDT auch auf schwierig zu erreichenden Tumoren aus, bis hin zur Therapie der intrakraniell gelegenen malignen Gliome [57, 58].

### 1.4.2 Prinzip der 5-Aminolävulinsäure-basierten PDT (5-ALA-PDT)

Die photodynamische Therapie basiert prinzipiell auf den drei o.g. Komponenten Licht, Sauerstoff und Photosensibilisator. Grundlegend wird den Zellen eine Substanz zugeführt, die entweder selbst oder deren Metabolite photoaktive Eigenschaften besitzen. [59]

Befinden sich diese Photosensibilisatoren innerhalb der Zelle, können sie mit Licht einer definierten Wellenlänge beleuchtet und vom Grundzustand in einen angeregten Singulett-Zustand gebracht werden. Sie können diesen Zustand auf mehreren Wegen verlassen. Zum einen zurück in den Singulett-Grundzustand, was über die Emission von Licht (Fluoreszenz) oder strahlungslos (internal conversion) funktioniert. Zum anderen können sie durch Spinumkehr der angeregten Elektronen in den angeregten Triplet-Zustand wechseln (Intersystem-Crossing). Von dort aus können sie entweder per Phosphoreszenz oder über Energieabgabe an in unmittelbarer Nähe befindliche Moleküle (wie bspw. molekularem Sauerstoff) und Bildung von Radikalen (Singulett-Sauerstoff, Hydroxyradikale) in den Grundzustand zurückkehren (s. Abbildung 5). [60]

Diese Sauerstoffradikale schädigen dann in unmittelbarer Umgebung ihrer Entstehung die Zellstrukturen auf unspezifische Weise, was bei ausreichend hoher Schädigung der Zelle zu Apoptose, Nekrose und Autophagie führen kann [59].

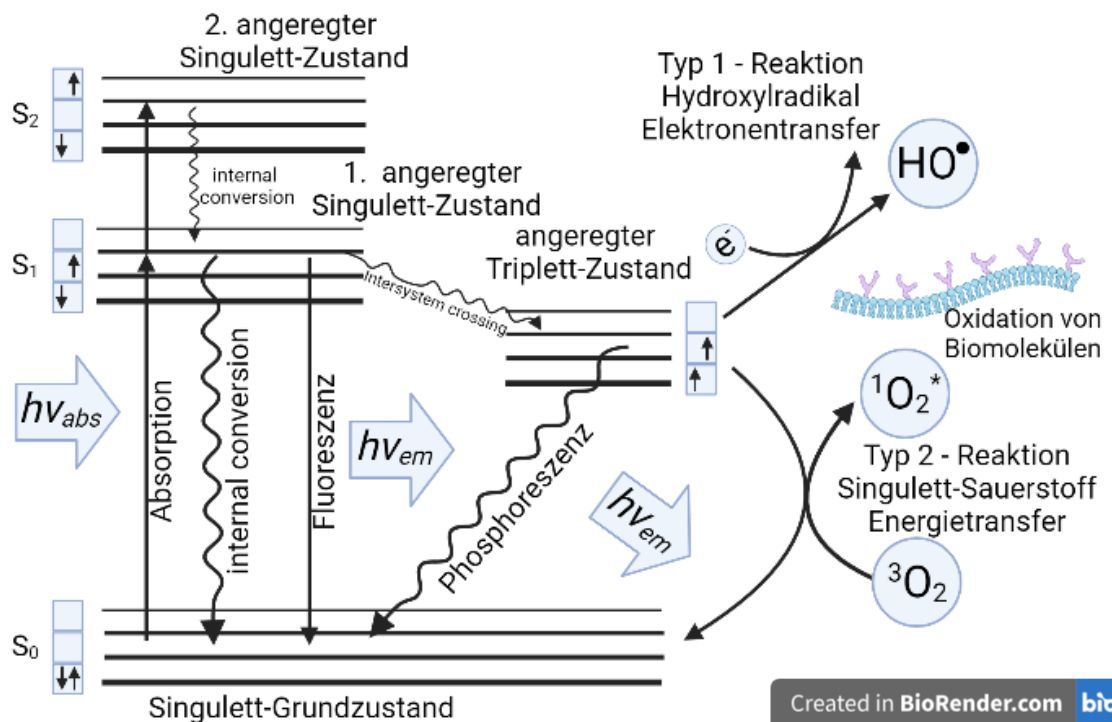


Abbildung 5: Schematische Darstellung des photodynamischen Effektes. Der Photosensibilisator wird im Singulett-Grundzustand durch einfallendes Licht  $h\nu_{abs}$  angeregt. Den angeregten Singulett-Zustand kann er über Fluoreszenz  $h\nu_{em}$  oder Internal Conversion wieder verlassen oder wechselt über Spinumkehr in den angeregten Triplet-Zustand (Intersystem Crossing). Dieser kann über die Typ 1 – Reaktion (Bildung von Hydroxyradikalen), die Typ 2 Reaktion (Bildung von Singulett-Sauerstoff) oder Phosphoreszenz  $h\nu_{em}$  verlassen werden (Silva et al. 2015 [60], modifiziert; Abbildung erstellt mit BioRender.com).

Die Besonderheit der 5-ALA basierten PDT besteht im Wesentlichen darin, dass der Photosensibilisator nicht in seiner photoaktiven Form den Zellen zugeführt wird. 5-ALA ist selbst kein Photosensibilisator, sondern muss erst über mehrere Synthesestufen (s. Abbildung 6) im Zytosol und in den Mitochondrien der Tumorzellen zu Protoporphyrin IX (PpIX), einer Vorstufe des Häms metabolisiert werden. [61]

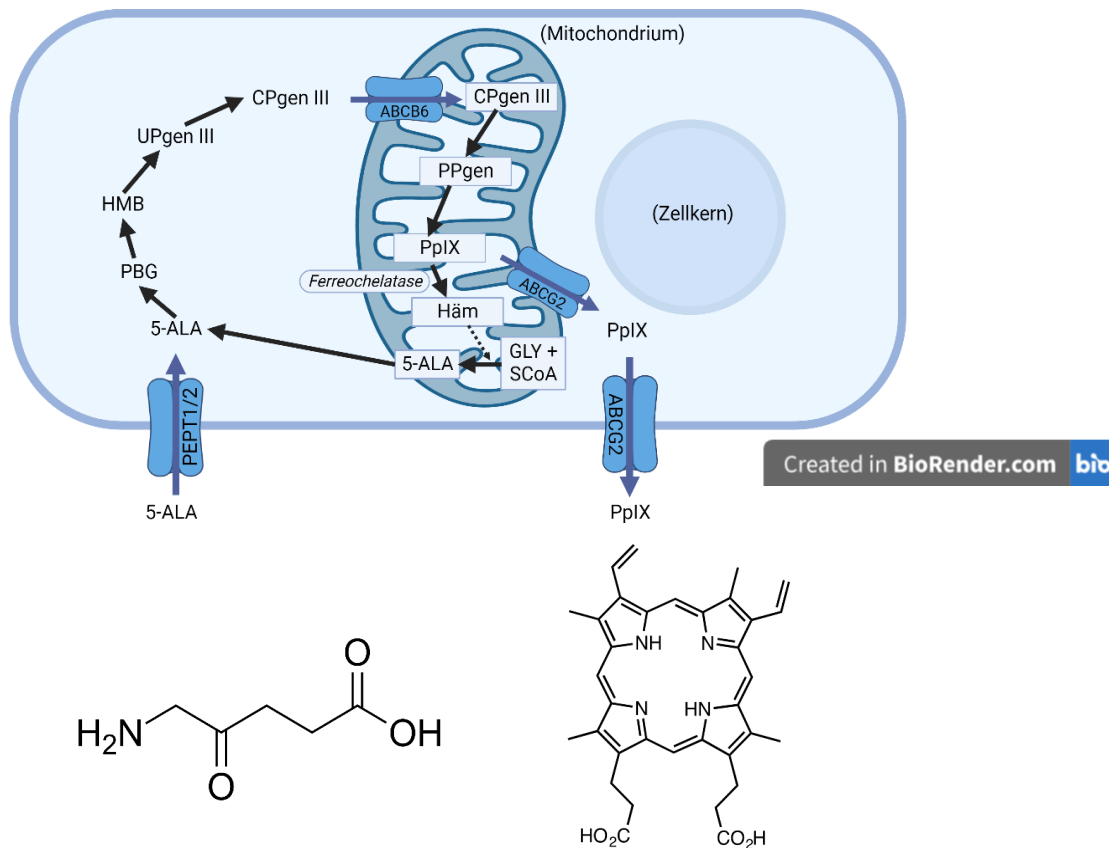


Abbildung 6: Oben: Vereinfachte schematische Darstellung der Hämbiosynthese und der PpIX-Entstehung (Stepp et al. 2018 [10], modifiziert; Abbildung erstellt mit BioRender.com). Unten links: Strukturformel von 5-ALA ([https://de.wikipedia.org/wiki/5-Aminol%C3%A4vulins%C3%A4ure#/media/Datei:5-amino-4-oxopentanoic\\_acid\\_200.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/5-Aminol%C3%A4vulins%C3%A4ure#/media/Datei:5-amino-4-oxopentanoic_acid_200.svg), Stand 05.09.2022). Unten rechts: Strukturformel von PpIX ([https://en.wikipedia.org/wiki/Protoporphyrin\\_IX#/media/File:PpIXtransH.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Protoporphyrin_IX#/media/File:PpIXtransH.png), Stand 05.09.2022)

Erst das PpIX ist photoaktiv und kann nach o.g. Prinzip zur PDT genutzt werden [10]. Dafür können verschiedene Wellenlängen genutzt werden, da PpIX mehrere Absorptionsbanden besitzt (s. Abbildung 7, [62]). Porphyrine wie auch das PpIX absorbieren am stärksten an der Grenze vom sichtbaren zum ultravioletten Licht, je nach Lösungsmittel etwa bei 406 nm, die sog. „Soret-Bande“ [63, 64]. PpIX besitzt zudem weitere Absorptionsmaxima im sichtbaren Wellenlängenbereich, die sog. Q-Banden (s. Abbildung 7) [62]. Experimentelle Messungen an Hirngewebe von Mäusen zeigte, dass die Eindringtiefe des Lichts ist im Bereich von 405 nm geringer ausgeprägt ist, als bei 635 nm (405 nm: ca. 0,4 mm, 635 nm: ca. 1,7 mm) [65]. Für die PDT am Glioblastom hat sich die Nutzung von rotem Licht bei ca. 635 nm Wellenlänge etabliert [10, 66].

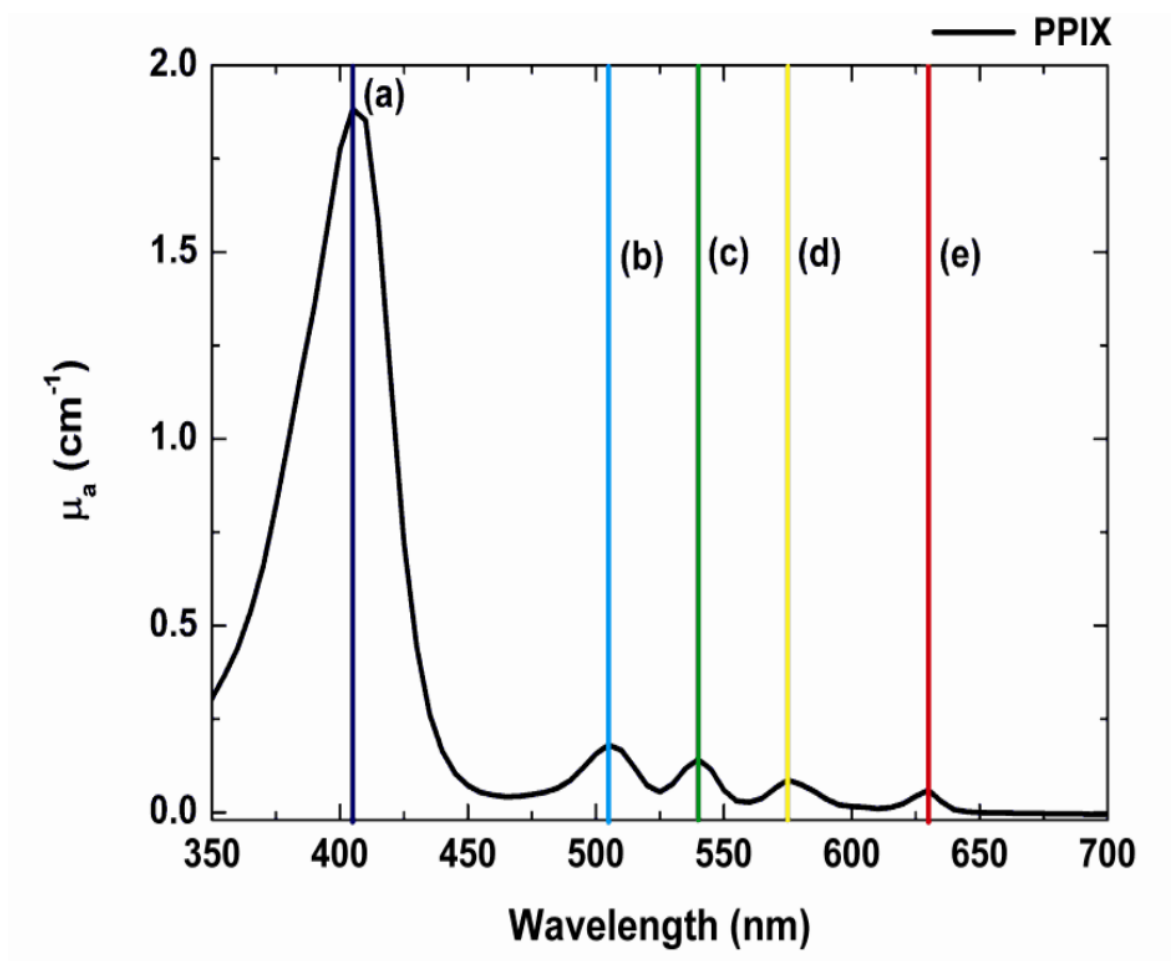


Abbildung 7: Absorptionsspektrum von PpIX (schwarze Kurve), Soret Bande (a, 405 nm) und Q-Banden von blauem (b, 505 nm), grünem (c, 540 nm), gelbem (d, 575 nm) und rotem Licht (e, 630 nm). (Valentine 2011 [62])

Die Akkumulation von PpIX gestaltet sich äußerst tumorselektiv, d.h. dass das umliegende Gewebe im Gegensatz zum Tumor so gut wie kein oder nur geringfügig photoaktives PpIX anreichert [61]. Das bringt den Vorteil, dass die PDT dadurch eine für gesundes Gewebe sehr schonende Therapie darstellt, was insbesondere im Gehirn eine entscheidende Rolle spielt, da sich häufig funktionell bedeutsame Areale in unmittelbarer Nachbarschaft zum Tumor befinden [10]. Potenzielle Gründe für diese tumorselektive Akkumulation sind u.a. eine durchlässigere Blut-Hirn-Schranke im Tumorgewebe, erhöhte Aktivität von Membrantransportern und Enzymen in der PpIX-Synthese, sowie der Mangel an Eisen und die reduzierte Aktivität der Ferrochelatase, welche für die Weiterverarbeitung des PpIX zu Häm nötig wäre [10, 61].

### 1.4.3 Anwendungsgebiete in der klinischen Medizin

Die fluoreszierenden und photoaktiven Eigenschaften von PpIX haben seit ihrer Entdeckung im 20. Jahrhundert zur Entwicklung vielfältigster Anwendungen in Diagnostik und Therapie geführt. Wie bereits in 1.1.2 beschrieben, macht man sich die Eigenschaften des PpIX in der fluoreszenzgestützten Resektion (FGR) zunutze, die bei einer Vielzahl an Tumoren als Unterstützung für den Operateur angewandt wird [10]. Diese Technik wird nicht nur beim Glioblastom genutzt [10], sondern findet auch in der transurethralen Resektion des Blasenkarzinoms Anwendung und erzielt in der

klinischen Anwendung deutliche Erfolge gegenüber der herkömmlichen Methode ohne Fluoreszenz-gestützte Kontrast-Bildgebung [67].

Neben der FGR hat auch die PDT Einzug in viele Bereiche der klinischen Medizin gehalten. Sie findet Anwendung in der Therapie maligner Neoplasien der Gallenwege oder deren Invasion durch z.B. hepatozelluläre Karzinome [68, 69]. Ebenfalls etabliert in sie der Behandlung vielfältigster Hautkrankheiten und -tumore: Aktinische Keratosen, Melanome, Basalzellkarzinome, u.v.m. können durch topische oder systemische Applikation von 5-ALA und anderen Photosensibilisatoren lichtempfindlich gemacht und anschließend mit Laser- oder durch Sonnenlichtexposition behandelt werden [70-73].

Neben der Behandlung von malignen Neoplasien wurde auch die anti-mikrobielle Wirkung der PDT wissenschaftlich untersucht. Einige Studien konnten bereits eine gute Wirksamkeit der PDT u.a. gegen den Vancomycin- bzw. Methicillin- resistenten *Staphylococcus aureus* (VRSA [74, 75], MRSA [76]) zeigen. Dies bildet die Grundlage für die Entwicklung einer guten Alternative zur klassischen antibiotischen Chemotherapie, insbesondere in Zeiten, in denen zunehmende Resistenzentwicklungen eine Herausforderung darstellen [75].

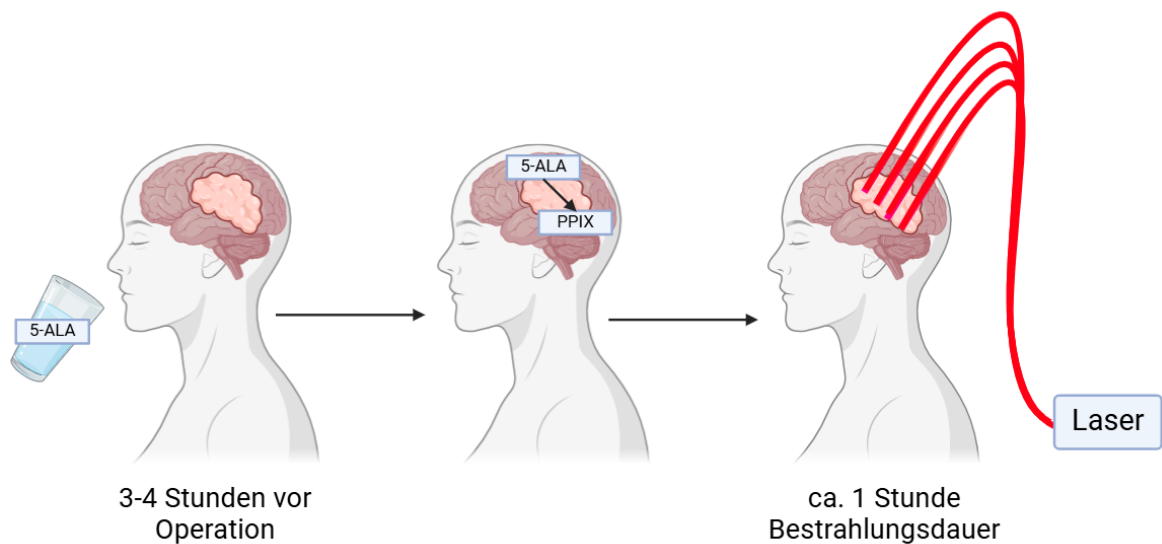
Für die vorliegende Dissertationsschrift ist die neuartige interstitielle PDT (iPDT) beim Glioblastom von Interesse, die sich seit einigen Jahren auf dem Vormarsch in der klinischen Medizin befindet. Dabei werden dem Patienten ein bis vier Stunden vor Operation 20 mg/kgKG 5-ALA (z.B. Gliolan®, ALAGLIO®, medac, Wedel) oral appliziert, welches dann in den Folgestunden von den Tumorzellen aufgenommen und dort zu PpIX metabolisiert wird [10, 77]. Nach erfolgter Anästhesie werden dem Patienten entsprechend der vorangegangenen Bestrahlungsplanung stereotaktisch Lichtleitfasern mit zylindrisch abstrahlenden Lichtdiffusoren ins Tumorgewebe implantiert – der Abstand der Fasern beträgt etwa 10 mm zueinander und etwa 4 mm zum kontrastmittelaufnehmenden Tumorrund [10]. Mit Laserlicht einer Wellenlänge von 635 nm und einer Leistung von 200 mW/cm-Diffusorlänge wird anschließend das gesamte Tumervolumen inklusive der Infiltrationszone für eine Stunde bestrahlt (s. Abbildung 8) [10, 77]. Durch die geringe Leistung wird gewährleistet, dass sich das Gewebe nicht stärker als um 4°C erhitzt und dadurch thermische Gewebeschäden ausgelöst werden – die Therapie erfolgt somit athermisch [10, 78].

Der erste Heilversuch in München wurde 2002 durchgeführt, bei einer damals 31-jährigen Patientin mit Glioblastomrezidiv links insulär bei Z.n. Tumoresektion und adjuvanter Radiochemotherapie 04/2001 (Erstdiagnose 04/2001). Bei einem Tumervolumen von 7,9 cm<sup>3</sup> erfolgte eine iPDT im Klinikum Großhadern nach o.g. Prinzip. Vierundzwanzig Stunden nach der Behandlung wurde eine MRT veranlasst, die ein nahezu vollständiges Verschwinden der kontrastmittelaufnehmenden Tumorebereiche zeigte. Die Patientin konnte fünf Tage nach Operation entlassen werden, das Dexamethason wurde ausgeschlichen. Die Kontrollaufnahmen nach 7, 15 und 27 Tagen zeigten einen weiteren Rückgang der Kontrastmittelaufnahmen und des peritumoralen Ödems. Sechs Monate später erhielt die Patientin in einem anderen Klinikum weitere Zyklen an Chemotherapie, die aber aufgrund von Knochenmarksdepression immer wieder unterbrochen werden mussten. 2007 war die Patientin weiterhin rezidivfrei. [79]

Aus einem Gespräch mit meinem promovierten Mitbetreuer ging hervor, dass die Patientin schließlich 2013 an einer Lungenfibrose gestorben sei [80].

Ein 2023 veröffentlichter Bericht über die iPDT-Behandlung von 16 Patienten mit *de novo* Glioblastom zeigte einen signifikanten Vorteil von iPDT vs. konventioneller Therapie auf. So war das mediane progressionsfreie Intervall mit 16,4 gegenüber 9,9 Monaten ( $p < 0,01$ ) und das mediane Gesamtüberleben mit 28,0 (6,0 – 50,0) gegenüber 20,4 Monaten (17,9 – 22,9;  $p = 0,01$ ) in der iPDT-Gruppe deutlich erhöht. In der iPDT-Gruppe hatten 43,8% der Patienten (7/16) ein progressionsfreies Intervall von über 24 Monaten, in der Referenzgruppe waren es lediglich 8,9% (11/110;  $p < 0,01$ ). [81]

2021 wurde in einer weiteren Studie gezeigt, dass die iPDT auch bei Rezidiven maligner Gliome eine sehr gute Therapieoption darstellt: Das mediane progressionsfreie Intervall lag hier bei 13,0 (95% KI: 9,2 – 16,8) Monaten, das Zwei- bzw. Fünfjahresüberleben bei 25,0% und 4,5% [82]. Zum Vergleich dient eine Publikation von 2016, laut der die meisten Therapieoptionen bei GBM-Rezidiv ein medianes progressionsfreies Intervall von sieben bis neun Monaten erreichen [83].



Created in BioRender.com bio

Abbildung 8: Klinische Umsetzung der 5-ALA-basierten photodynamischen Therapie. Drei bis vier Stunden vor Operation werden dem Patienten 20 mg/kgKG 5-ALA (Gliolan®, ALAGLIO®, medac, Wedel) oral verabreicht. Es kommt zu einer tumorselektiven Anreicherung von PpIX. Entsprechend der vorangegangenen Bestrahlungsplanung werden die Laserfasern stereotaktisch operativ in das Tumervolumen eingebracht. Nach korrekter Platzierung wird für eine Stunde der Laser aktiviert und der Tumor mit 200 mW/cm Faserlänge ausgeleuchtet (nach Stepp et al. 2018 [10]; Abbildung erstellt mit BioRender.com).

## 1.5 Zielsetzung, Fragestellung und Hypothesen

Diese Dissertationsschrift befasst sich mit dem Einfluss von Berbamin und Shikonin auf Tumorstammzellen des Glioblastoms und insbesondere mit der Kombination von Shikonin und photodynamischer Therapie *in vitro*. Als Modell zur Untersuchung von Glioblastomstammzellen (GSC) wird deren Anreicherung in sog. „Spheres“ genutzt.

Zu Beginn wurden die Einflüsse von Shikonin und Berbamin auf Glioblastomzellen und -stammzellen in Kombination mit Temozolomid (TMZ) in grundlegenden Experimenten untersucht. Dazu wurden

die Einflüsse auf die Zellvitalität, die Zellproliferation, die Bildung von Spheres und die Induktion von Apoptose gemessen. Es stand hierbei die Fragestellung im Vordergrund, ob die Kombination von TMZ mit Shikonin und Berbamin zu einer Wirkungsverstärkung führen kann und ob es zu einer Wachstumseinschränkung der Stammzellen kommt. Zur Beurteilung, ob mithilfe der Phytochemikalien auch eine Durchbrechung der TMZ-Resistenz erzielt werden kann, wurden drei TMZ-resistente Zelllinien gezüchtet und in vergleichenden Experimenten untersucht.

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob und wie sekundäre Pflanzenstoffe die Akkumulation von photoaktivem PpIX in Glioblastomzellen beeinflussen können, wurden Quantität und intrazelluläre Verteilungsmuster von PPIX mittels Fluorometrie, Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie bestimmt. Für die Beurteilung des Effektes auf die photodynamische Therapie wurden zunächst unterschiedliche Bestrahlungsbedingungen ausgetestet. Ziel war es, für jede Zelllinie eine geeignete Kombination aus 5-ALA-Konzentration, Leistungsdichte und Bestrahlungsdauer zu finden, bei der ein mittleres Zellüberleben von ca. 80% reproduzierbar zu erwarten war. Dieser Wert wurde gewählt, um anschließend sowohl wirkungsverstärkende als auch wirkungsmindernde Einflussgrößen beurteilen zu können. Danach wurden Zellvitalität, Zellproliferation und Apoptoserate nach Inkubation mit 5-ALA und anschließender Bestrahlung untersucht. Für ein detaillierteres Verständnis, insbesondere der intrazellulären Signalwege, wurden die Stammzellen abschließend anhand ausgewählter Marker charakterisiert und die Veränderungen der Marker nach PDT auf mRNA-Ebene untersucht.

Die Hypothesen dieser Arbeit sind, dass Shikonin bzw. Berbamin Anti-Tumor-Effekte auf Glioblastomzellen besitzen, dass mittels Shikonin eine Durchbrechung der TMZ-Resistenz der Stammzellen erreicht werden kann und dass Shikonin zu einer Wirkungsverstärkung der photodynamischen Therapie führt und sich dieser Effekt insbesondere an den Glioblastomstammzellen zeigt.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Zelllinien, Reagenzien und Software

Gerät	Hersteller
Axiovert 35 Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, München, DE
Bestrahlungskammer	LIFE-Zentrum LMU, München, DE
Biofuge Pico, Tischzentrifuge	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, DE
Captair® Bio Werkbank	Erlab, Inc., Rowley, MA, US
Centrifuge 5425 R Zentrifuge	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Easypet 3 Pipette	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Emax precision microplate reader	MWG Biotech, Ebersberg, DE
FACSCalibur™	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, DE
HeraSafe Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, DE
Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
Kühlschrank	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, DE
Lightcycler	Roche Holding AG, Basel, CH
MC1 – Research RC2108, Waage	Sartorius AG, Göttingen, DE
MikrOkular Full HD Okkularkamera	Bresser GmbH, Rhede, DE
Mikropipetten	Gilson S.A.S., Villiers le Bel, FR
MrFrosty Freezing Container	Thermo Scientific Inc., US
Multikanalpipetten (8-, 12-Kanal)	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Multipette® Plus	Eppendorf SE, Hamburg, DE
NanoDrop	Thermo Scientific Inc., US
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim, DE
Objektiv HC PL APO CS2 40x/1.30 OIL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
PTC-200 Thermocycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Stickstofftank	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen (Sieg), DE
TCS SP8 Weißlichtlaser-Konfokalmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE

Tischzentrifuge	Unity Lab Services, Thermo Fisher Inc., US
Vortex	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, DE
Vortex (klein)	Bender & hobein GmbH, München, DE
Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, DE

**Verbrauchsmaterial****Hersteller**

μ-slide 18-well	ibidi GmbH, Gräfelfing, DE
1,2 ml Microtubes (FACS)	Alpha laboratories Ltd., Eastleigh, UK
12 ml Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
15 ml / 50 ml Röhrchen	Falcon, Corning Inc., Durham, NC, US
25 ml Röhrchen	Eppendorf SE, Hamburg, DE
6-well Platten	Falcon, Corning Inc., Durham, NC, US
6-well Platten (ultra-low attachment)	Corning Inc., Kennebunk, ME, US
96-well Platten	TPP AG, Trasadingen, CH
Cell strainer 40μm	Corning Inc., Corning, NY, US
Combi tips plus für Multipette®	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Conical tubes, Plain Skirted tubes	Starlab International GmbH, Hamburg, DE
Filterspitzen 0,1 – 2,5 μl	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Filterspitzen 10 μl, 20 μl, 100 μl, 200 μl, 1000 μl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Kryoröhrchen	Thermo scientific, Roskilde, DK
M ColorpHast™ pH-Streifen 5,0 – 10,0	Merk KGaA, Darmstadt, DE
Millex® - GP Tilter Unit	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, IE
PCR-Gefäße	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Pipettenspitzen 200 μl / 1000 μl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
QuiaShredder Säulchen	Quiagen GmbH, Hilden, DE
Safe-Lock-Tubes	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Falcon, Corning Inc., Durham, NC, US
Spritzen steril 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml	BD Biosciences, Fraga, ES

Zellkulturflaschen 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> und 175 cm<sup>2</sup> Falcon, Corning Inc., Durham, NC, US

Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup> (ultra-low attachment) Corning Inc., Kennebunk, ME, US

**Zelllinie****Katalognummer**

U-87 MG

ECACC: 89081402

U251 MG

ECACC: 09063001

U-373 MG (Uppsala)

ECACC: 08061901

GB14

primäre Zelllinie LTI München

**Reagenzien****Hersteller**

5-ALA

Fagron GmbH, Glinde, DE

7-Aminoactinomycin D (7-AAD)

Pharmingen™ BD Biosciences, Heidelberg, DE

Annexin V – binding buffer

Pharmingen™ BD Biosciences, Heidelberg, DE

APC-konjugiertes Annexin V

Pharmingen™ BD Biosciences, Heidelberg, DE

Aqua iniectionis

Deltamedia GmbH, Reutlingen, DE

B27 supplement

Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US

Basic fibroblast growth factor (bFGF)

Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, DE

Berbamin

Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, US

CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagenz

Promega GmbH, Mannheim, DE

CellTiter-Blue® Reagenz

Promega GmbH, Mannheim, DE

CryoSure-DMSO

WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach/Ts, DE

DMEM/F-12 Zellkulturmedium

Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US

Epidermal growth factor (EGF)

Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE

FastStart Essential DNA Green Master

Roche Holding AG, Basel, CH

Fetal Calf Serum (FCS) „Gold Plus“

Bio & Sell GmbH, Feucht, DE

Ko143

Tocris Biosciences, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, DE

L-Glutamin	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Minimal essential medium (MEM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Natriumpyruvat	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
PBS (pH = 7,4; Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 144,0 mg/l; Natriumchlorid (NaCl) 9,0 g/l; Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) 795,0 mg/l)	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Rhodamin 123	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
RNA Isolation Kit	Qiagen N.V., Hilden, DE
RNAse free DNAse	Qiagen N.V., Hilden, DE
RNAse free water	Qiagen N.V., Hilden, DE
RNeasy Mini Kit	Qiagen N.V., Hilden, DE
Shikonin	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, US
StemPro® Accutase®	Life Technologies, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, US
TMZ	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, US
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific Inc., US
Trypsin	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US

#### Software:

CamLabLite™, Version Win X86, 1.0	Bresser GmbH, Rhede, DE
OPTIMA software version 2.0.	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, DE
BD CellQuest™ software, version 4.0.2	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, US
FlowJo™, version 9.9.5	Tree Star Inc., Ashland, OR, US
Bestrahlungskammer-Software	Laser Forschungslabor, München, DE
SigmaPlot Version 11.0	Systat Software Inc., San José, CA, US

Lightcycler® 96 software, version 1.1	Roche Holding AG, Basel, CH
EndNote™ v. 20.4	Clarivate Plc., Philadelphia, PA, US
LAS X v. 3.5.7.23225	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
BioRender.com	Science Suite Inc., Toronto, ON, CA
Microsoft® Word, Excel®, PowerPoint® für Microsoft 365 MSO (Version 2409 Build 16.0.18025.20214) 64 Bit	Microsoft Corporation, Redmond, WA, US

## 2.2 Zellkultur

Die Ergebnisse dieser Arbeit beruhen ausschließlich auf *in vitro* durchgeführten Experimenten.

### 2.2.1 Zelllinien

Es wurden insgesamt vier Glioblastomzelllinien untersucht, wobei zu beachten ist, dass nicht jedes Experiment mit allen Linien durchgeführt wurde. Drei der Zelllinien – U-87 MG, U-373 MG (Uppsala) und U-251 MG – sind international etablierte Glioblastomzellen, die in etlichen Forschungsarbeiten Verwendung finden. Die verwendeten Zellen stammen von der European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, Porton Down, Salisbury, England). Im weiteren Textverlauf werden die Kurzformen U87, U373 und U251 benutzt. Die vierte Zelllinie GB14 ist eine primäre Zelllinie und stammt von einer Patientin mit Glioblastomrezidiv. Das Tumorgewebe wurde entnommen zum Zeitpunkt der interstitiellen PDT. Aus dem Probenmaterial wurde in unserem Labor die primäre Zelllinie GB14 etabliert und u.a. für diese Forschungsarbeit verwendet.

### 2.2.2 Inkubationsbedingungen

Die adhärenenten Zelllinien U87, U251, U373 und GB14 wurden in DMEM/F-12 Zellkulturmedium inkubiert, welches zusätzlich mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) „Gold Plus, 1% Natriumpyruvat (1 mM), 1% minimal essential medium (MEM), 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin (2 mM) versetzt wurde.

Zur Inkubation mit 5-ALA wurde FCS-freies Medium genutzt (DMEM/F-12, 1% Natriumpyruvat (1 mM), 1% minimal essential medium (MEM), 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin (2 mM)).

Das Medium zur Generierung von Tumorstammzellen (GSC-Medium für sog. *Spheres*) (s. 2.2.3) enthielt kein FCS, aber neben DMEM/F-12 noch 2% B27 supplement, 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) und 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF). Außerdem wurden hier *ultra-low-attachment*-Zellkulturflaschen verwendet.

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> und erhöhter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.3 Anreicherung von *Spheres*

Adhärenente Zellen aus unter 2.2.2 genannten Inkubationsbedingungen wurden durch 10-minütige Inkubation mit StemProAccutase® (im Folgenden nur „Accutase®“) schonend von der Oberfläche der normalen 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen abgelöst und 10<sup>6</sup> Zellen nach der Zentrifugation in 10 ml GSC-Medium (s. 2.2.2) in Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup> (ultra-low-attachment) ausgebracht.

Unter den Bedingungen des serum-freien Mediums und der aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Adhäsion der Zellen am Boden der Zellkulturflasche bilden die Stammzell-ähnlichen Zellen in der Kultur, die sog. *Spheres* aus. Dies sind meist kugelförmige Ansammlungen von Zellen, die sich bereits nach ein- bis zweitägiger Inkubation durch Zellteilung aus einer einzelnen Vorläuferzelle ausbilden. Sieben Tage nach Ausbringen der Zellen schwimmen im Medium makroskopisch sichtbare kugelige Zellansammlungen, die *Spheres* genannt werden (s. Abbildung 9). Das Medium wird aus den Flaschen in Röhrchen überführt und vier Minuten bei 72 rcf zentrifugiert. Nach Waschen mit PBS und einer zweiten Zentrifugation bei 72 rcf für vier Minuten werden die *Spheres* mit 2 ml Accutase® zehn Minuten bei 37°C inkubiert, um ein Dissoziieren der Zellen zu erreichen. Im Anschluss werden die Zellen nach Zugabe von PBS ein weiteres Mal vier Minuten bei 72 rcf zentrifugiert und resuspendiert. Durch die Anwendung eines 40 µm Zellfilters (Cell strainer) können nicht-dissoziierte *Spheres* entfernt werden. Die dissoziierten *Spheres* können nun für Assays verwendet oder wieder in *ultra-low-attachment*-Flaschen ausgebracht werden, um weitere *Spheres* zu generieren.

Dissoziierte *Spheres*, welche für Experimente verwendet werden, sind in dieser Arbeit mit dem Präfix „s“ versehen (bspw. sU87).

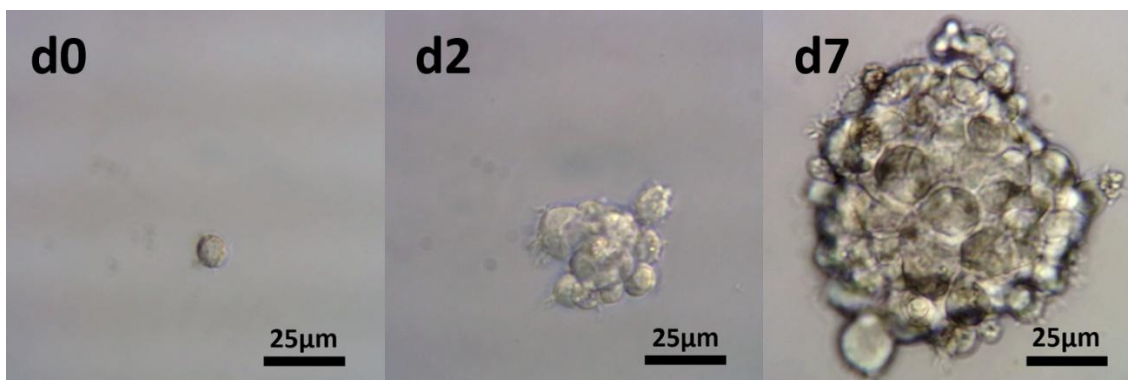


Abbildung 9: Zeitliche Entwicklung einer U87 *Sphere*. Zum Zeitpunkt d0 direkt nach dem Ausbringen (d0) in 75 cm<sup>2</sup> *ultra-low-attachment* Flasche, sowie nach zwei (d2) bzw. sieben (d7) Tagen Inkubation im Brutschrank.

## 2.3 Etablierung resistenter Zelllinien

U87, GB14 und U251 wurden mit steigender Konzentration von TMZ über mehrere Wochen inkubiert und anschließend per Annexin-V-Assay [84] auf ihre Resistenz untersucht. Die herangezuchteten Zelllinien werden in dieser Arbeit mit dem Präfix „r“ versehen (rU87, rGB14, rU251).

### 2.3.1 Inkubation mit steigender Konzentration

Zur Heranzüchtung der resistenten Zellen wurde das Zellkulturmedium mit TMZ versetzt. Als Orientierungswert diente die für jede Zelllinie jeweils ermittelte halbmaximale Hemmkonzentration (IC<sub>50</sub>) für TMZ. Die halbmaximale Hemmkonzentration beschreibt die Konzentration einer Substanz, bei der in Inkubation mit ihr nur die Hälfte der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe vital bleibt. Die Experimente zur Ermittlung der IC<sub>50</sub> sind in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, die IC<sub>50</sub>-Werte sind in Tabelle 2 gezeigt. Genutzt wurde der 48-Stunden-Wert.

Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 10 ml Kulturmedium inkubiert, welches zu Beginn mit 1/8 IC<sub>50</sub> TMZ (s. Tabelle 2) versetzt war. Sobald die Zellen lichtmikroskopisch keine Beeinträchtigungen im Wachstum mehr zeigten, wurde die TMZ-Konzentration über Wochen schrittweise erhöht (1/6 IC<sub>50</sub>, 1/5 IC<sub>50</sub>, 1/4 IC<sub>50</sub>, 1/3 IC<sub>50</sub>, 1/2 IC<sub>50</sub>) bis die Zelllinien bei IC<sub>50</sub> bzw. 1/2 IC<sub>50</sub> Konzentration keine Wachstumseinschränkungen mehr zeigten. An diesem Punkt wurde dann die Resistenz gegenüber TMZ mittels Annexin-V-Assays überprüft (s. 2.3.2).

### 2.3.2 Validierung der TMZ-Resistenz

Zur Messung der TMZ-Resistenz, welche bereits lichtmikroskopisch in der Zellkultur zu beobachten war, wurde die Expression von Annexin V als Apoptosemarker nach Inkubation mit TMZ gemessen. Dafür wurden jeweils 400.000 Zellen der resistenten (rU87, rGB14 und rU251) und der jeweiligen parentalen adhärenenten Linie (U87, GB14, U251) in 4 ml Kulturmedium in zwei Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) ausgebracht. Nach 24 Stunden wurde TMZ hinzugefügt, die zweite Flasche wurde als Kontrolle ohne TMZ weiter inkubiert. Für U87, GB14, rU87 und rGB14 wurde TMZ in IC<sub>50</sub> der Ursprungszelllinie genutzt (48-Stunden Wert TMZ für U87: 0,3 mM und GB14: 0,7 mM, s. Tabelle 2). U251 und rU251 wurden mit 1,25 mM TMZ inkubiert, was mehr als der doppelten IC<sub>50</sub> von U251 entspricht. Diese höhere Konzentration wurde gewählt, da U251 in einem ersten Validierungsversuch mit IC<sub>50</sub> kaum Apoptose in der Durchflusszytometrie erkennen ließ, wodurch auch kein Unterschied zu rU251 nachgewiesen werden konnte. Nach fünf Tagen Inkubation wurden die abgestorbenen Zellreste und die mit Trypsin abgelösten Zellen zentrifugiert (453 rcf, 4 min), gewaschen, in Annexin-Bindpuffer (100 µl) resuspendiert und 5 µl Annexin-V APC-konjugiert hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Anteil der apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer (FACS Calibur) bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Laserlicht von 488 nm und 635 nm Wellenlänge angeregt und die APC-Fluoreszenz im FL3-Kanal (670 nm LP) im FACS gemessen. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mittels FlowJo Software. Der Anteil der APC-positiven Zellen entspricht dem Anteil der apoptotischen Zellen.

## 2.4 Grundlegende zellbiologische Versuche

### 2.4.1 Zellvitalität in Abhängigkeit steigender Konzentration

Diese Experimente wurden mit dem CellTiter-Blue® Cell Viability Assay durchgeführt [85]. Mit Trypsin abgelöste Zellen oder dissoziierte Spheres (s. 2.2.3) aller Zelllinien wurden in Triplikaten mit jeweils 3.000 Zellen in 150 µl Kulturmedium auf zwei 96-well Mikrotiterplatten pro Versuch ausgebracht und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand durch frisches Medium ersetzt, das mit Shikonin, Berbamin oder TMZ in aufsteigender Konzentration versetzt war. Nach Inkubation für weitere 24 bzw. 48 Stunden wurden die Platten aus dem Brutschrank genommen und 20 µl Farbreagenz wurde in jedes Well pipettiert. Das Reagenz enthält den Farbstoff Resazurin, welcher von lebenden Zellen zum fluoreszierenden Resorufin umgesetzt wird. Nicht mehr lebende Zellen verlieren schnell die Stoffwechselkapazität und generieren kein fluoreszierendes Signal. Nach einstündiger Inkubation in Dunkelheit wurde die Platte herausgenommen und die Fluoreszenz des umgesetzten Farbstoffs im Mikroplatten-Reader bei 590 nm Anregungs- und 560 nm Emissionswellenlänge gemessen.

Die Rohdaten wurden mit der Software OPTIMA (Version 2.0) ausgewertet und für die Berechnung der halbmaximalen Hemmkonzentration (IC<sub>50</sub>) verwendet.

### 2.4.2 Zellproliferation

Diese Experimente wurden mit dem CellTiter 96® AqueousOneSolution Cell Proliferation Assay von Promega durchgeführt [86]. Es wurden je 2.000 Zellen in 100 µl Kulturmedium in Triplikaten auf 96-well Mikrotiterplatten ausgebracht. Nach 24 Stunden wurden 50 µl Medium hinzugefügt, welches mit Shikonin, Berbamin, TMZ, Shikonin +TMZ oder Berbamin +TMZ versetzt war. Die Konzentrationen der Substanzen waren so gewählt, dass nach Zugabe die Zellen mit ½ IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> und 2x IC<sub>50</sub> Konzentration der jeweiligen Stoffe inkubiert wurden.

Nach 72-stündiger Inkubation wurden die Platten aus dem Brutschrank genommen und 20 µl Farbreagenz (CellTiter 96® AqueousOneSolution) in jedes Well hinzugegeben. Das Reagenz enthält Phenazin-Ethosulfat (PES) und eine Tetrazoliumverbindung (3-(4-5-Dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-Tetrazolium, MTS), welche in metabolisch aktiven Zellen über NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen zum violettfarbenen Formazan reduziert wird. Die Platten wurden drei Stunden in Dunkelheit inkubiert und anschließend wurde das entstandene Formazan im ELISA-Reader bei 490 nm Absorptionswellenlänge quantifiziert. Die Höhe der Absorption ist direkt proportional zur Menge an stoffwechselaktiven Zellen. [86]

### 2.4.3 Ausbildung von Spheres

Wie bereits in 2.2.3 beschrieben, wurden die parentalen adhärenenten Zellen mit Accutase® abgelöst, gewaschen und mit 2 ml FCS-freies GSC-Medium in 6-well *ultra-low-attachment* Platten ausgebracht. Das Medium enthielt entweder Shikonin, Berbamin, TMZ oder deren Kombinationen in jeweils IC<sub>50</sub> Konzentration, pro Experimentgruppe wurden Triplikate mit jeweils 10<sup>4</sup> Zellen angesetzt.



Direkt nach Ausbringung der Zellen wurden Fotos der heranwachsenden Spheres mit der Okularkamera (MikrOkular Full HD) gemacht, ebenso nach zwei bzw. drei Tagen Inkubation.

Zusätzlich zu den Bildern wurde die Anzahl der Spheres in zehn Sichtfeldern ( $\varnothing$  2,0 mm, 3,1 mm<sup>2</sup>) pro Vertiefung gezählt, um auch eine quantitative Einschätzung geben zu können. Spheres stellen mehr oder weniger rundliche klonale Zellverbände dar.

Im ersten Versuchsansatz wurden die Zellen noch an Tag 0, Tag 1, Tag 2, Tag 3 und Tag 7 nach Ansetzen fotografiert (siehe Abbildung 9). Da sich die GSC-Spheres sehr schnell entwickelten, wurden sie zumeist am Tag 3 verwendet. An Tag 7 zeigten sich im Innern der Spheres bereits nekrotische Zellen. Deswegen wurde in weiteren Versuchen nur noch an den Tagen 0, 2 und 3 gemessen und fotografiert.

#### 2.4.4 Induktion von Apoptose

Von allen vier parentalen adhärennten Linien wurden 400.000 Zellen in jeweils 4 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Diese wurde in kleine Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) ausgebracht und für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde 1 ml eines Shikonin-, Berbamin- oder TMZ-haltigen Mediums hinzugegeben und die Flaschen vorsichtig geschwenkt. Die Konzentrationen von Shikonin, Berbamin und TMZ entsprachen den jeweiligen IC<sub>50</sub> (48-Stunden Wert) der untersuchten Zelllinien. Im Falle von U87 und GB14 wurde zusätzlich die  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> Konzentration von Shikonin untersucht. Bei der Kombination von Shikonin mit TMZ bzw. Berbamin mit TMZ wurden die Stoffe in jeweils IC<sub>50</sub> oder  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> gemeinsam verwendet.

Nach fünftägiger Inkubation mit den zugegebenen Substanzen wurden der Überstand und die durch Trypsin abgelösten Zellen in Röhrchen überführt und zentrifugiert. Die Zellen wurden analog zu 2.3.2 zentrifugiert, gewaschen und mit APC-konjugiertem Annexin V inkubiert. Für die Messung im Durchflusszytometer (FACS Calibur) wurden die Zellen mit 488 nm und 633 nm Laserlicht parallel angeregt. Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde aus dem Anteil der APC-positiven Zellen im FL4-Kanal (661 +/- 16 nm) ermittelt.

#### 2.4.5 Shikonin in Kombination mit TMZ

Untersucht wurden die Zelllinien U87, TMZ-resistente U87 (rU87) und dissoziierte U87 Spheres (sU87). Auf vier 96-well Platten pro Zelllinie wurden Triplikate mit jeweils 5.000 Zellen in 150 µl Zellkulturmedium ausgebracht und über Nacht (ca. 18-24 Stunden) inkubiert. Am Tag darauf wurde das Medium gewechselt gegen Medium, welches TMZ und Shikonin in verschiedenen Kombinationen enthielt. TMZ wurde in jeder Platte in aufsteigender Konzentration zugegeben (0,0156 mM, 0,0313 mM, 0,0625 mM, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, + Kontrolle 0 mM), die Shikoninkonzentration war innerhalb einer Platte konstant und wurde auf den vier Platten in den Konzentrationen 0; 0,8; 1,6 und 3,2 µM zugefügt. Die Zellen wurden über Nacht (ca. 18-24 Stunden) inkubiert und das Zellüberleben nach 24 Stunden mittels CellTiterBlue® Viability Assay (vgl. 2.4.1) bestimmt.

## 2.5 Untersuchung der Protoporphyrin-IX-Akkumulation

### 2.5.1 Fluorometrie im Microplate-Reader

Auf zwei 96-well Platten wurden in Triplikaten jeweils 15.000 Zellen von U87 und GB14 in 150 µl Medium ausgebracht und über Nacht (ca. 18-24 Stunden) inkubiert. Am Folgetag wurden 50 µl Medium hinzugegeben, welches neben den Kontrollgruppen auch Shikonin in IC50 und ½ IC50 Konzentration (siehe Tabelle 2, Abschnitt 3.2.1) enthielt. Nach vorsichtigem Schwenken und 24-stündiger Inkubation wurde das Medium gewechselt gegen 200 µl eines FCS-freien Zellkulturmediums, versetzt mit Shikonin (IC50 bzw. ½ IC50) sowie in aufsteigender Konzentration mit 5-ALA (12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml + Kontrolle 0 µg/ml). Nach einem weiteren Tag Inkubation in Dunkelheit, wurden die Platten herausgenommen und das Medium noch einmal gegen frisches ersetzt, um ausgeschleustes PpIX aus der Messung auszuschließen. Auf einer Platte wurde im Mikroplattenreader (FLUOstar Optima) die PpIX-Fluoreszenz direkt gemessen, bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Detektion bei 630 nm. Auf der zweiten Platte wurde analog zu 2.4.1 die Zellvitalität gemessen. Dieses diente dazu, um die relative PpIX-Fluoreszenz pro vitale Zelle abschätzen zu können, da sich zytotoxische Effekte von Shikonin in diesen Konzentrationen nicht vermeiden ließen. Die Rohdaten wurden ausgewertet (OPTIMA Version 2.0) und die relative PpIX-Fluoreszenz dann mittels des Quotienten aus gemessener Emission und dem Zellüberleben relativ zur Kontrollgruppe ermittelt (mittlere Fluoreszenzintensität = Fluoreszenz Testgruppe / (Zellvitalität Testgruppe / Zellvitalität Kontrollgruppe)).

### 2.5.2 Durchflusszytometrie

In 6-well Platten wurden jeweils 300.000 Zellen in 3 ml Medium ausgebracht und 24 Stunden inkubiert. Es wurden U87, GB14 und dissoziierte U87 Spheres verwendet. Nachdem die Zellen adhäriert waren, wurde das Medium gegen 2 ml FCS-freies Zellkulturmedium gewechselt, welches mit 5-ALA (100 µg/ml) und Shikonin (1 µM) versetzt war. Als Vergleich wurde zudem die ABCG2-blockierende Substanz Ko143 (1 µM) genutzt, entsprechende Kontrollgruppen wurden eingerichtet (keine Behandlung, nur 5-ALA, nur KO143, KO143 + 5-ALA, nur Shikonin, Shikonin + 5-ALA). Nach vierstündiger Inkubation in Dunkelheit wurden die Platten aus dem Inkubator geholt, die Zellen wurden gewaschen, abgelöst und zentrifugiert (453 rcf, 4 min). Nach Resuspension in PBS wurden die Zellen ohne weitere Färbung im Durchflusszytometer (FACS Calibur) bei 488 und 633 nm angeregt und die Fluoreszenz im FL3-Kanal (670 nm LP) quantifiziert. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit entsprechender Software (FlowJo, v.9.9.5).

### 2.5.3 Konfokalmikroskopie

Zur Beurteilung, ob Shikonin neben einer quantitativen Steigerung von intrazellulärem PpIX auch zu einer Veränderung der räumlichen Verteilung innerhalb der Zellkompartimente führen kann, wurden konfokalmikroskopische Bilder nach Inkubation mit 5-ALA und Shikonin (bzw. Ko143) angefertigt.

Dafür wurden in 18-well  $\mu$ -slides jeweils 10.000 Zellen von U251 in 100  $\mu$ l Kulturmedium angesetzt und 12 bzw. 24 Stunden ohne Zusätze vorinkubiert. Zu den Zeitpunkten -16 h und -4 h vor Mikroskopie (s. Abbildung 10) wurde jeweils eine Hälfte der Platten aus dem Brutschrank entnommen und einem Mediumwechsel unterzogen. Die Zellen wurden in FCS-freiem Medium mit Shikonin (1 bzw. 2  $\mu$ M) oder Ko143 (1  $\mu$ M) und +/- 5-ALA (100  $\mu$ g/ml) behandelt und im Dunkeln inkubiert, Kontrollgruppen wurden mitangesetzt (keine Behandlung, nur 5-ALA). Das gesamte Schema ist Abbildung 10 zu entnehmen. Nach erfolgter Inkubation wurde zum Zeitpunkt 0 h der Überstand durch ein mit Rhodamin 123 versetztes normales Zellkulturmedium ersetzt (1  $\mu$ M) und 30 min im Dunkeln weiter inkubiert, um eine Färbung der mitochondrialen Kompartimente zu erzielen. Nach einer weiteren halben Stunde wurde das Medium komplett entfernt und nach zweimaligem Waschen mit PBS ein frisches FCS-freies Medium dazugegeben.

Die Bilder wurden aufgenommen mit dem Weißlichtlaser Konfokal-Mikroskop TCS SP8 und dem Objektiv HC PL APO CS2 40x/1.30 OIL. Rhodamin 123 wurde unter Anregung mit 488 nm bei 507-543 nm Wellenlänge detektiert, während PpIX mit 405 nm Anregung bei 660-740 nm Wellenlänge in Abgrenzung dazu gemessen wurde. Die Auswertung der Messung erfolgte mit LAS X (v. 3.5.7.23225).

Dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt, da der Versuchsaufbau aufwändig war und die ersten Messungen keine vielversprechenden Ergebnisse lieferten.

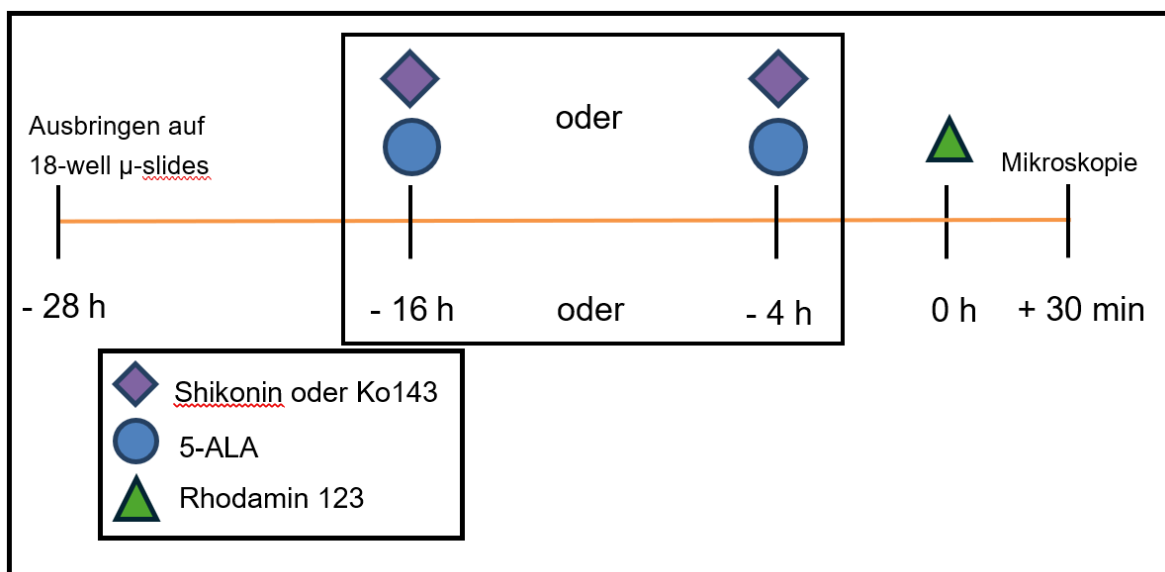


Abbildung 10: Inkubationsschema vor Konfokalmikroskopie. Nach Ausbringen auf 18-well  $\mu$ -slides wurden die Zellen für 12 bzw. 24 Stunden in Zellkulturmedium ohne Zusätze vorinkubiert. Zu den Zeitpunkten -16 h und -4 h wurde das Zellkulturmedium ausgetauscht gegen Medium mit Shikonin (1 bzw. 2  $\mu$ M) +/- 5-ALA (100  $\mu$ g/ml) oder Ko143 (1  $\mu$ M) +/- 5-ALA. Diese werden bis zum Zeitpunkt 0 h, d.h. für weitere 16 bzw. 4 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 h werden die Zellen mit Rhodamin 123 gefärbt und 30 min später mikroskopiert.

## 2.6 Einfluss von Shikonin auf die PDT in vitro

### 2.6.1 Die Bestrahlungskammer

Die nachfolgenden Experimente nutzen alle die von Andreas Knappe entwickelte temperaturkontrollierte Bestrahlungskammer (Abbildung 11, links).

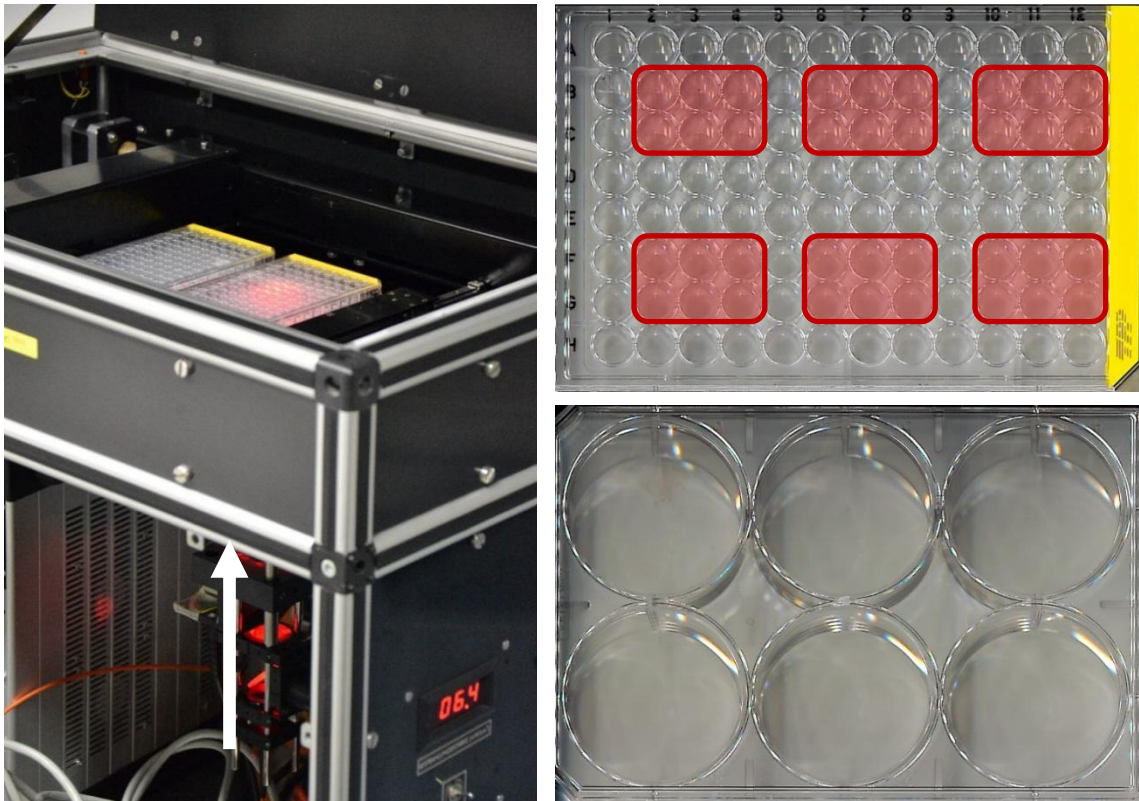


Abbildung 11: Temperaturkontrollierte Zellkultur-Laserkammer für die Bestrahlung von bis zu zwei Platten gleichzeitig. Der Strahlengang verläuft im Bild von unten nach oben (direkt rechts des weißen Pfeils). Ein Motor bewegt die Platten entsprechend der Programmierung, der Deckel zum Schutz vor Umgebungslicht ist zu Demonstrationszwecken geöffnet (linkes Bild). Über eine Blende direkt hinter der Linse kann der bestrahlte Bereich in Abhängigkeit der gewählten Platte eingegrenzt werden, so können sog. „Sixpacks“ auf 96-well-Platten (Bild oben rechts, Sixpacks rot markiert) oder jede Vertiefung der 6-well-Platten (Bild unten rechts) einzeln bestrahlt werden.

Die Kammer wurde entwickelt, um Zellkulturexperimente mit PDT reproduzierbarer und automatisierbarer gestalten zu können. Die Zellen werden mit einer vorher definierten Lichtdosis (steuerbar durch Änderung der Bestrahlungsintensität und -dauer) mit 635 nm Wellenlänge von unten beleuchtet, was zu einer Reduktion an Streu- und Störeffekten führt. Ein an der Leuchtfaser verbauter Vibrator führt zu einer homogenen Bestrahlung der Zellen. [87]

In der Kammer werden im Nachfolgenden 96- und 6-well Platten bestrahlt, was durch die Nutzung unterschiedlich großer Blenden möglich wird. Die Vertiefungen der 6-well Platte können einzeln angestrahlt werden, auf den 96-well Platten ist das nur in definierten Bereichen sog. „Sixpacks“ möglich (Abbildung 11, oben rechts). [87]

### 2.6.2 Austesten der Bestrahlungsbedingungen

In diesem ersten Schritt wurden für die Zelllinien U87, U251 und GB14 der Einfluss unterschiedlicher Strahlungsbedingungen auf die Zellvitalität getestet. Für jede Zelllinie sollte eine reproduzierbare Kombination aus 5-ALA-Konzentration, Energiedichte und Bestrahlungsdauer gefunden werden, bei welcher mit einem mittleren Zellüberleben von ca. 80% gerechnet wird. Dieser Richtwert wurde gewählt, um einerseits deutliche Verstärkungen der In vitro-PDT messen zu können und um andererseits eventuelle Abschwächungseffekte durch die sekundären Pflanzenstoffe erkennen zu können. Dafür wurden in Sechserpaketen (Sixpacks) jeweils 7.500 Zellen in 150 µl Kulturmedium pro Vertiefung auf einer 96-well Mikrotiterplatte ausgebracht. Nach Inkubation über Nacht wurden weitere 50 µl Kulturmedium hinzugefügt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium ersetzt durch FCS-freies Medium, welches mit 5-ALA versetzt war (0, 25, 50 und 100 µg/ml). Die Platten wurden weitere 24 Stunden im Inkubator in Dunkelheit inkubiert und dann aus dem Brutschrank genommen und das Medium durch frisches FCS-haltiges Medium ohne Zusätze ersetzt. Anschließend wurden die Platten in die Bestrahlungskammer eingesetzt, wo sie bei 100 mW/cm<sup>2</sup> unterschiedlichen Bestrahlungszeiten ausgesetzt wurden (0 s, 5 s, 10 s, 20 s, 40 s und 80 s). Daraus errechnen sich aufsteigende Energiedichten (0 J/cm<sup>2</sup>, 0,5 J/cm<sup>2</sup>, 1 J/cm<sup>2</sup>, 2 J/cm<sup>2</sup>, 4 J/cm<sup>2</sup> und 8 J/cm<sup>2</sup>). Die Zellen wurden danach ohne weiteren Mediumwechsel für 24 Stunden inkubiert und die Zellvitalität mittels CellTiterBlue® Assay analog zu 2.4.1 bestimmt.

### 2.6.3 Zellvitalität

Für die Messung der Zellvitalität nach PDT in Kombination mit Shikonin und TMZ wurden die Zellen analog zu 2.6.2 in 6er-Paketen auf 96-well Platten ausgebracht (7.500 Zellen in 150 µl Medium pro Well) und über Nacht inkubiert. Dann wurden jedem Well 50 µl Medium hinzugegeben, jeweils versetzt mit TMZ (U87: 37,5 und 75 µM; GB14: 87,5 und 175 µM) und/oder Shikonin (U87: 0,3 und 0,6 µM; GB14: 0,45 und 0,9 µM) bzw. Kontrollen (keine Behandlung, nur PDT). Die Platten wurden weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium gegen ein FCS-freies Tumormedium ausgetauscht, welches die entsprechenden Kombinationen aus 5-ALA, TMZ und Shikonin enthielt (5-ALA: 100 µg/ml; Konzentration von Shikonin und TMZ entsprechend dem Vortag). Auch hier wurden Kontrollgruppen ohne 5-ALA eingerichtet. Die Zellen wurden einen Tag in Dunkelheit im Inkubator gelagert und nach nochmaligem Austausch des Mediums gegen FCS-haltige Nährlösung mit der jeweils vorab ermittelten Intensität (s. Abbildung 22) bestrahlt. Vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung wurde analog zu 2.6.2 eine Fluoreszenzmessung zur Kalkulation des relativen Zellüberlebens mittels CellTiterBlue® Cell Viability Assay durchgeführt.

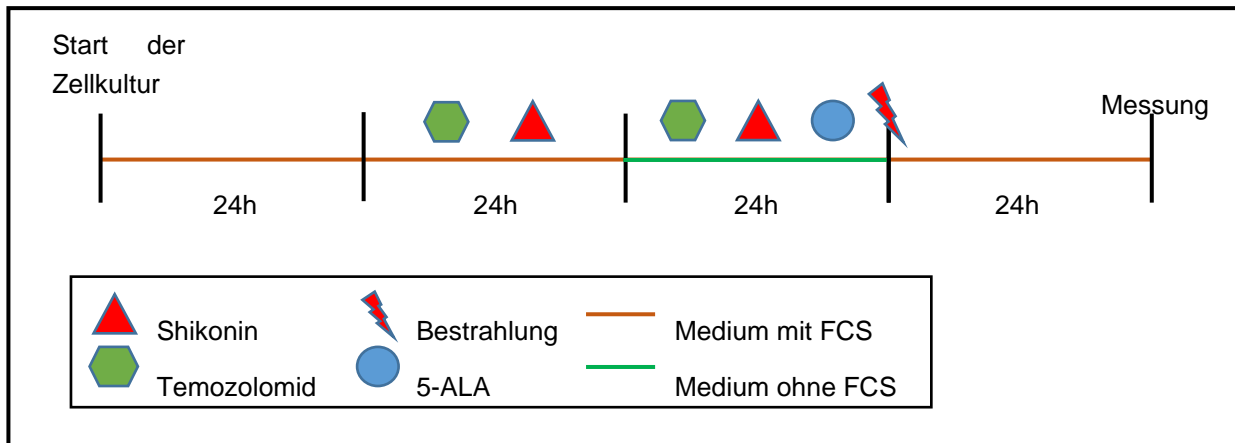


Abbildung 12: Inkubationsschema vor Messung der Zellvitalität. Dargestellt sind jeweils nur die kombinierten Inkubationen Shikonin/TMZ/5-ALA, die Kontrollgruppen (keine Behandlung, nur PDT, nur TMZ, nur Shikonin, Shikonin + PDT, TMZ + PDT, Shikonin + TMZ) sind der Übersicht wegen nicht gezeigt.

## 2.6.4 Zellproliferation

Die Ermittlung der zellproliferativen Aktivität gestaltete sich ähnlich der in 2.6.3 beschriebenen Vitalitätsbestimmung. Auch hier wurden jeweils 7.500 Zellen in 150 µl Tumormedium pro Well auf 96-well Platten ausgebracht, die dann nach dem Inkubationsschema aus Abbildung 12 inkubiert und bestrahlt wurden. Die Konzentrationen von Shikonin, TMZ und 5-ALA waren identisch. Vierundzwanzig Stunden nach erfolgter Bestrahlung wurde dann die Zellproliferation mittels CellTiter 96® AqueousOneSolution Cell Proliferation Assay (analog zu 2.4.2) durchgeführt und im ELISA-Reader bei 490 nm Absorptionswellenlänge quantifiziert.

## 2.6.5 Apoptose

Nachdem die vorangegangenen Experimente zur Messung der Zellvitalität und -proliferation aus 2.6.3 und 2.6.4 wenig aufschlussreiche Ergebnisse lieferten, wurde das Inkubationsschema für die Messung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie überarbeitet. Es wurden nun jeweils 300.000 Zellen der Linien U87, GB14 und sU87 in 3 ml auf 6-well Platten ausgebracht und über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium getauscht gegen 2 ml eines FCS-freien Mediums, welches versetzt war mit Shikonin oder Ko143 (U87 und sU87: 1 µM, GB14: 0,3 µM) und 5-ALA (100 µg/ml). Die Konzentration für Shikonin wurde im Vergleich zu den Vorexperimenten (2.6.3 und 2.6.4) bei U87 von 0,3 µM bzw. 0,6 µM auf 1 µM erhöht, bei GB14 wurde sie von 0,45 µM, bzw. 0,9 µM auf 0,3 µM reduziert. Diese Änderung wurde aufgrund der wenig aussagekräftigen Ergebnisse der Vorexperimente (2.6.3 und 2.6.4) vorgenommen. Die Konzentration für 5-ALA blieb gleich. Ko143 als vorbeschriebener ABCG2-Blocker [88] wurde in gleicher Konzentration wie Shikonin eingesetzt (U87 und sU87: 1 µM, GB14: 0,3 µM). Für alle Kombinationen wurden Kontrollgruppen eingerichtet. Die Inkubationszeit mit 5-ALA und Shikonin wurde auf vier Stunden verkürzt (zuvor: Shikonin 48 h, 5-ALA 24 h). Dies war nötig, um die direkten zytotoxischen Effekte von Shikonin zu minimieren und mehr Trennschärfe zu einem PDT-verstärkenden Effekt zu bekommen. Nach vier Stunden Inkubation im Dunkeln wurde das Medium gegen frisches, serumhaltiges Medium getauscht. Die Platten

wurden mit 2 J/cm<sup>2</sup> (U87), 1 J/cm<sup>2</sup> (GB14) bzw. 0,5 J/cm<sup>2</sup> (U251) bestrahlt (entsprechend den Ergebnissen aus Abbildung 22), und für weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden analog zu 2.4.4 der Überstand und die mit Trypsin gelösten Zellen zentrifugiert, gewaschen und in Annexin-V Bindepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden mit APC-konjugiertem Annexin-V und 7-AAD [89] für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie dann im FACS Calibur analysiert wurden. Die Zellen wurden mit Licht der Wellenlängen 488 und 633 nm angeregt und die Emission von 7-AAD im FL3 (670 nm LP) und APC im FL4-Kanal (661 +/- 16 nm) gemessen und ausgewertet. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit FlowJo Software 9.9.5. In der Auswertung wurden 7-AAD- und APC-Fluoreszenz aufgrund gleicher Aussagekraft nicht mehr getrennt ausgewertet, die Apoptoserate wurde lediglich nach APC-Level bestimmt.

## 2.7 Untersuchungen auf mRNA-Ebene

### 2.7.1 Isolation von mRNA

Die RNA wurde mithilfe des RNeasy Mini-Kits nach Herstellerangaben [90] aus Spheres und adhären Zellen isoliert. Dafür wurden bis zu 5x10<sup>6</sup> Zellen mit 350 µl RLT-Puffer lysiert und im Zellysat-Homogenisator-Säulchen (QIAshredder) bei 18407 rcf für 2 min zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 350 µl Ethanol (70%) gemischt und auf ein Siliciumdioxid-Säulchen (RNeasy) pipettiert, welches daraufhin bei 9391 rcf für 15 s zentrifugiert wurde. Das nun entstandene Eluat wurde verworfen, 350 µl Wasch-Pufferlösung (RW1-Puffer) auf die Membran gegeben und wieder bei 9391 rcf für 15 s zentrifugiert. Die DNA-Hydrolyse fand mit 80 µl Desoxyribonuclease-Mischlösung (RNase free DNase-Mix) für 15 min bei Raumtemperatur statt, anschließend wurde zunächst mit RW1-Puffer, dann mit RPE-Puffer gewaschen und jeweils mit 9391 rcf für 15 s zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschritt mit 500 µl RPE-Puffer wurde das Säulchen auf ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß gesteckt und 30 µl RNase-freies Wasser (RNase-free water) auf die Membran gegeben. Nach 1-minütiger Inkubation wurde bei 9391 rcf abzentrifugiert und der letzte Schritt mit dem Eluat wiederholt. Anschließend wurde die mRNA-Konzentration mittels Mikrovolumen-Spektralphotometer (Nanodrop) bestimmt.

### 2.7.2 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit entsprechend den Herstellerangaben [91] in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden die in 2.7.1 gewonnenen Proben entsprechend der gemessenen Konzentration mit dem im Testkit enthaltenen RNase-freiem Wasser (RNase-free water) so verdünnt, dass insgesamt 12 µl Reaktionsvolumen entstand, welches 1 µg RNA enthielt. Dieses Volumen wurde mit 2 µl gDNA Wipeout Buffer (7x) gemischt, für 2 min bei 42°C inkubiert und dann unmittelbar auf Eis gelegt. Die Proben wurden mit 1 µl Reverse Transkriptase (RT), 4 µl RT-Puffer (5x) und 1 µl Primer-Mix vermischt und für 15 min bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der RT folgte eine 3-minütige Inkubation bei 95°C. Nach erfolgter Transkription wurden die Proben entweder direkt für die PCR (siehe 2.7.3) verwendet oder bei -20°C eingelagert.

### 2.7.3 Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

Die quantitative real-time PCR (RT-qPCR) wurde mit einem PCR-Kit (DNA Green Master) angesetzt. 2 µg der in 2.7.2 gewonnenen cDNA wurden mit 5 µl FastStart Essential DNA Green Master, 1 µl Wasser, 1 µl (5 pmol) Vorwärts- und 1 µl (5 pmol) Rückwärtsprimer gemischt und im Thermocycler (Lightcycler®96) amplifiziert. Das Programm beinhaltete eine initiale Temperaturerhöhung auf 95 °C für 10 min, 40 Zyklen mit 10 s Denaturierung bei 95 °C, 10 s Annealing bei 60 °C und 10 s Elongation bei 72 °C. Das Endprodukt wurde bei kontinuierlicher Erhöhung der Temperatur bis auf 97 °C denaturiert.

### 2.7.4 Charakterisierung der Stammzellen

Zur Charakterisierung der Stammzellen, wurden Spheres und adhärenente Zellen gewonnen, gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurde nach dem in 2.7.1 - 2.7.3 beschriebenen Schema die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, sowie eine quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) durchgeführt. Getestet wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Primerpaare, spezifisch für die Stammzellmarker *CD44* und *CD133*, sowie für die Gene *ABCG2*, *ABCG6*, *NPM1*, *DJ-1*, *NF-1* und *ATG4C*. Das Housekeeping-Gen TATA-binding Protein (TBP) diente als Kontrolle und Referenz. Die Rohdaten wurden mit entsprechender Software (Lightcycler® 96 software, version 1.1) ausgewertet, zur Berechnung der relativen Expression wurde die  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode für PCR-Daten genutzt [92]. Die Primersequenzen wurden unter Verwendung des Primer-Blast Programmes generiert (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) [93].



Transkript	Primer	Sequenz (5' – 3')	Produktgröße (bp)
TBP	hTBP-E2-f	TAG TGA GAC GAG TTC CAG CG	491
	hTBP-E3-r	CCA CCT TTT CAG CCA ACA GC	
CD133	hPROM1-f1	TTG CGG TAA AAC TGG CTA AG	155
	hPROM1-r1	TGG GCT TGT CAT AAC AGG AT	
CD44	hCD44-f3	GAA GAA AGC CAG TGC GTC TC	128
	hCD44-r3	GTG CTC TGC TGA GGC TGT AA	
ABCB6	hABCB6-f2	GCC TCA TTG TGT TCC TGT GC	176
	hABCB6-f2	TTC GTA ACT CTC GGC GTT GT	
ABCG2	hABCG2-f	CAT CAA CTT TCC GGG GGT GA	266
	hABCG2-r	CAC TGG TTG GTC GTC AGG AA	
NPM1	hNPM1-f1	GCT GGT GCA AAG GAT GAG TTG	119
	hNPM1-r1	CCA AGG GAA ACC GTT GGC TG	
DJ-1	hPARK7-f2	TGA TAG CCG CCA TCT GTG CA	151
	hPARK7-r2	AGG CCG TCT TTT TCC ACA CG	
NF-1	hNF-1-f1	AGC CCT CAC AAC AAC CAA CA	234
	hNF-1-r1	CGG TGC CAT TCG TAT TGC TG	
ATG4C	hATG4C-f1	GAGACATTCCACTGCCCTTCT	140
	hATG4C-r1	GAA GAA AAT TTC AGC ATC TTG GTG	

Tabelle 1: Übersicht über die für die PCR genutzten Primerpaare. hPARK7-f2 und hPARK7-r2: aus Chen et al. 2012 [94].

### 2.7.5 Einfluss der PDT auf die Expressionsmuster

Zur Untersuchung, inwieweit die Kombination aus Shikonin und PDT die Expressionsmuster der in 2.7.4 genannten Gene beeinflussen kann, wurden jeweils 300.000 Zellen in 3 ml Kulturmedium pro Vertiefung in zwei 6-well Platten pro Versuch angesetzt und über Nacht (18 – 24 Stunden) inkubiert. Am Folgetag wurde der Überstand abgenommen und durch FCS-freies Medium ersetzt, welches mit 5-ALA (100 µg/ml), Shikonin (1 µM), der Kombination aus beidem (5-ALA 100 µg/ml + Shikonin 1 µM) oder keinen Zusätzen (Kontrollgruppe) versetzt war. Nach vierstündiger Inkubation im Dunklen wurden beide Platten aus dem Brutschrank entnommen und das Medium wurde gegen frisches, serumhaltiges Medium ersetzt. Alle Zellkulturplatten wurden in die Bestrahlungskammer eingebracht und die Testgruppen, welche mit 5-ALA inkubiert waren, wurden mit jeweils 100 mW/cm<sup>2</sup> für 20 s (entspricht 2 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden der Überstand abgenommen und die Zellen mit dem in 2.7.1 beschriebenen Verfahren in der RT-qPCR amplifiziert. Als Kontrolle und Referenz diente TBP, die relative mRNA-Expression wurde nach der 2<sup>-ΔΔCt</sup> Methode für PCR-Daten berechnet [92].

## 2.8 Auswertung und Statistische Analysen

Die Experimente wurden, wenn nicht anderes angegeben, mindestens dreimal voneinander biologisch unabhängig wiederholt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte zumeist mit der internen Software des Gerätes und ist in den jeweiligen Abschnitten des Methodenteils beschrieben. Die weitere Analyse und die Berechnung der p-Werte erfolgte mit einem Statistikprogramm (SigmaPlot Version 11.0). Die Daten sind, wenn nicht anders angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (Standard error of the mean, SEM) gezeigt. Zum Vergleich mehrerer Gruppen und zur Berechnung der p-Werte wurden zumeist einfache Varianzanalysen (one-way ANOVA, SigmaPlot Version 11.0) durchgeführt, gefolgt von einem Holm-Sidak-Test (ebenfalls mit SigmaPlot Version 11.0). Die Signifikanzangaben der Fluoreszenzmessungen im Abschnitt 3.3.1 wurden mittels Student-t-Test ermittelt. Als statistisch signifikant galt in dieser Arbeit ein p-Wert  $< 0,05$ , was in den Grafiken mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet ist. Wurde ein höheres Signifikanzniveau erreicht ( $p < 0,01$  oder  $p < 0,001$ ), ist das unter der jeweiligen Grafik angegeben.  $p < 0,01$  ist mit zwei Sternchen (\*\*) und  $p < 0,001$  mit drei Sternchen (\*\*\*) gekennzeichnet.

## 2.9 Zitierweise

In dieser Arbeit wird ausschließlich die numerische Zitierweise (Vancouver-Konvention bzw. IEEE) genutzt. Eine Quellenangabe vor dem Satzzeichen bezieht sich auf den letzten Satz bzw. Teilsatz. Eine Quellenangabe nach einem Satzzeichen bezieht sich auf den gesamten zurückliegenden Absatz. Werden mehrere Quellen gleichzeitig genutzt, so sind sie innerhalb der Klammer mit einem Komma getrennt. [95]

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Validierung der Temozolomid-resistenten Zelllinien**

Wie bereits oben beschrieben zeigten die aufgeführten Zelllinien rU87, rGB14 und rU251 bereits bei lichtmikroskopischer Beobachtung des Wachstums eine höhere TMZ-Toleranz als die Ursprungszellen. In den in Abbildung 13 dargestellten Ergebnissen ließ sich dieser lichtmikroskopisch beobachtete Effekt durchflusszytometrisch quantifizieren. Dargestellt sind die Apoptoseraten nach fünftägiger Inkubation mit TMZ (U87 und GB14: jeweils IC<sub>50</sub>). In den drei Zelllinien U87, GB14 und U251 lag die mittlere Apoptoserate der resistenten Zellen stets unter der der Ursprungslinie. Auf dreimalige Wiederholung wurde bei dieser Versuchsreihe verzichtet. Die dargestellten Messpunkte entsprechen einem Triplet an Einzelmessungen ( $n = 3$ ).

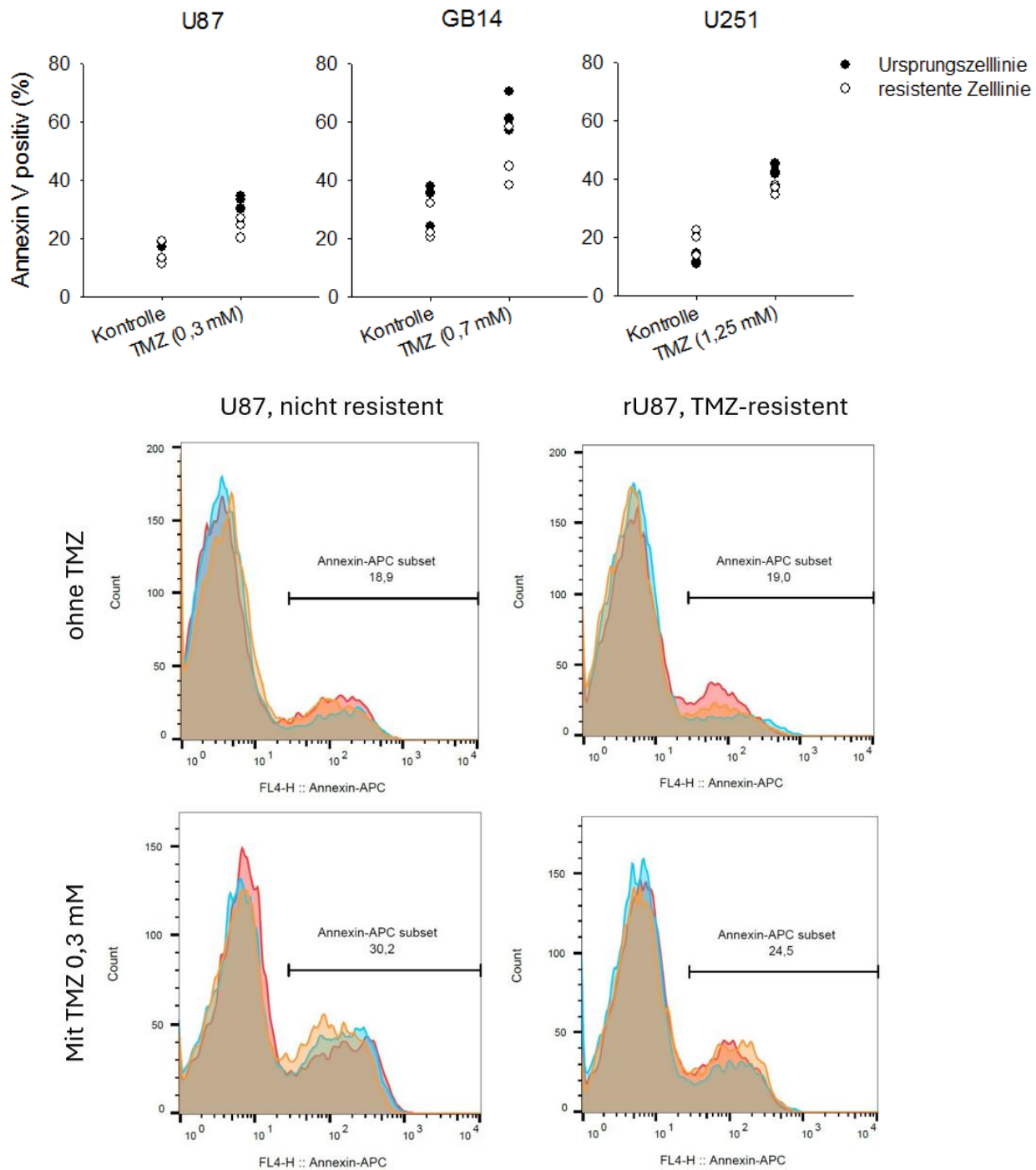


Abbildung 13: Oben: Die resistenten Zelllinien zeigen eine geringere TMZ-Sensibilität. Anteil der Annexin-V-positiven Zellen nach fünftägiger Inkubation mit TMZ in verschiedenen Konzentrationen (U87: 0,3 mM; GB14: 0,7 mM; U251: 1,25 mM). Verglichen werden die parentalen adhärenen Zellen (schwarze Punkte) mit den dazugehörigen resistent gezüchteten Zelllinien (weiße Punkte). Dargestellt als Einzelwerte einer Messreihe (n = 3). Unten: Exemplarische Darstellung der Auswertung für U87 und rU87. Dargestellt als Histogramm in Abhängigkeit der Annexin-APC Fluoreszenz.

## 3.2 Shikonin und Berbamin besitzen anti-Tumor Effekte

Mit den folgenden Ergebnissen kann gezeigt werden, dass Shikonin und Berbamin in den verwendeten Zelllinien eine Vielzahl an Tumor-hemmenden Effekten aufweisen. Neben einer dosisabhängigen Reduktion der Zellvitalität fand sich auch eine Hemmung von Proliferation und Spherebildung sowie die Induktion zur Apoptose.

### 3.2.1 Konzentrationsabhängige Reduktion der Zellvitalität, Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration (IC<sub>50</sub>)

Unter der Behandlung mit Shikonin, Berbamin und TMZ zeigte sich in allen Zelllinien eine dosisabhängige Reduktion des Zellüberlebens relativ zur Kontrollgruppe (Abbildung 14). Auf Grundlage der Kurven konnte die halbmaximale Hemmkonzentration (IC<sub>50</sub>) für die 24- und 48-stündige Inkubation mit den jeweiligen Substanzen ermittelt werden (Tabelle 2). Es zeigte sich zumeist, dass die 48-Stunden IC<sub>50</sub>-Werte geringer war als die 24-Stunden IC<sub>50</sub>-Werte, für spätere Versuche wurde aufgrund der meist längeren Inkubationszeiten der 48-Stunden Wert als Orientierung genutzt.

Auffällig war in diesem Experiment die Erkenntnis, dass Zellen aus dissoziierten Spheres in allen Fällen sensitiver gegenüber Shikonin waren als die jeweils äquivalenten adhärenenten Elternzelllinien. So lag der 48h-Wert in den adhärenenten Zellen mindestens doppelt so hoch wie in den äquivalent dazu angesetzten dissoziierten Spheres (U251: 2 µM – sU251: 1 µM; U373: 4 µM – sU373: 2 µM; U87: 2,5 µM – sU87: 1 µM, vgl. Tabelle 2).

Zelllinie	Shikonin		Berbamin		TMZ	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<b>U87</b>	4 µM	2,5 µM	18 µM	15 µM	0,3 mM	0,3 mM
<b>sU87</b>	1,5 µM	1 µM	15 µM	15 µM	1 mM	0,5 mM
<b>U251</b>	3 µM	2 µM	20 µM	20 µM	0,5 mM	0,6 mM
<b>sU251</b>	3 µM	2,5 µM	25 µM	20 µM	1 mM	0,5 mM
<b>U373</b>	5 µM	4 µM	35 µM	20 µM	1 mM	0,7 mM
<b>sU373</b>	4 µM	2 µM	40 µM	15 µM	2 mM	0,7 mM
<b>GB14</b>	4 µM	3,5 µM	25 µM	15 µM	1,5 mM	0,7 mM

Tabelle 2: Übersicht über die halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC<sub>50</sub>), die aus den Zellvitalitätskurven (vgl. Abbildung 14) ermittelt wurden. Dargestellt sind für vier Zelllinien und die Spheres von U87, U251 und U373 jeweils der 24 und 48 Stunden-Wert für Shikonin, Berbamin und TMZ.

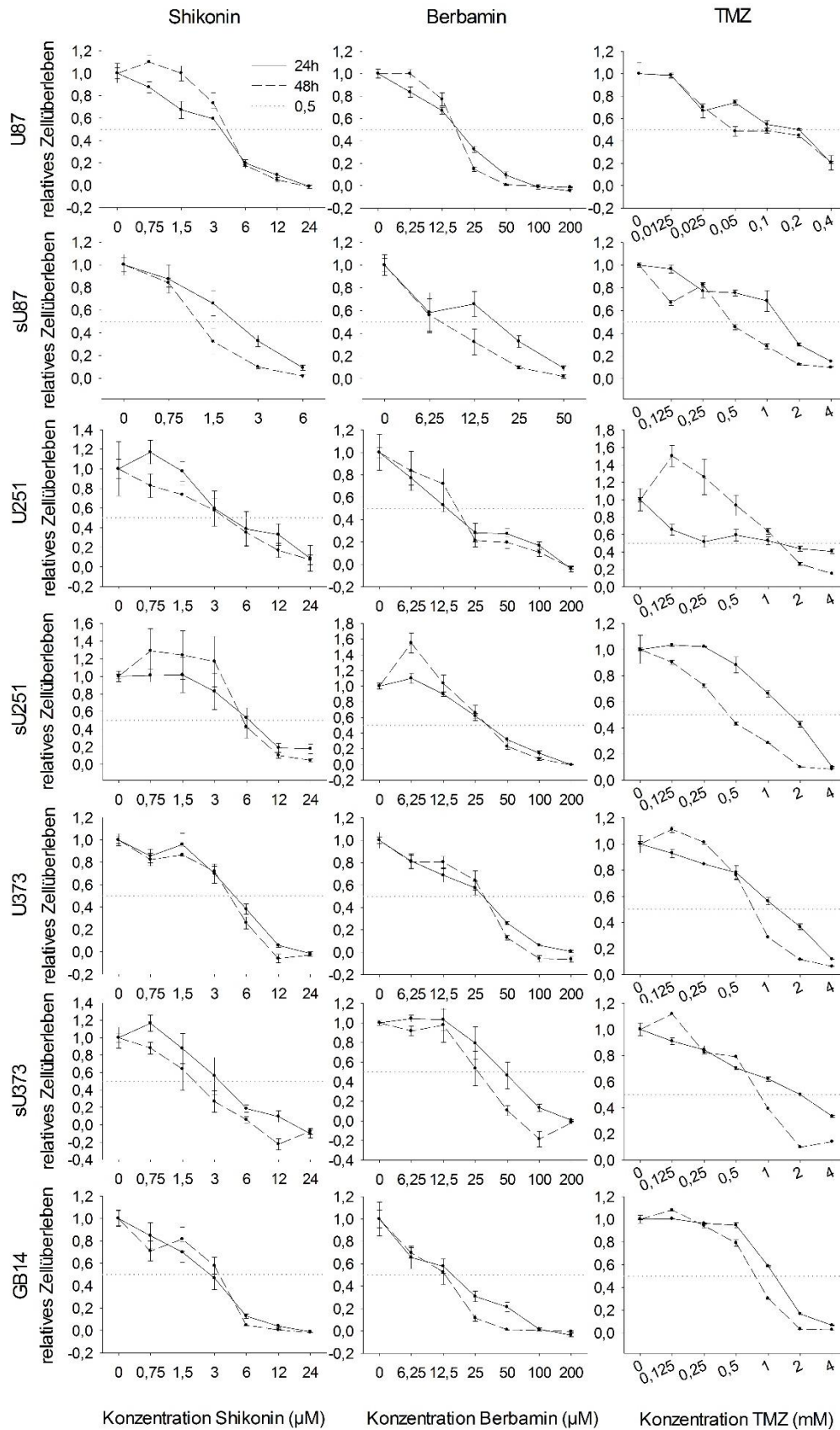
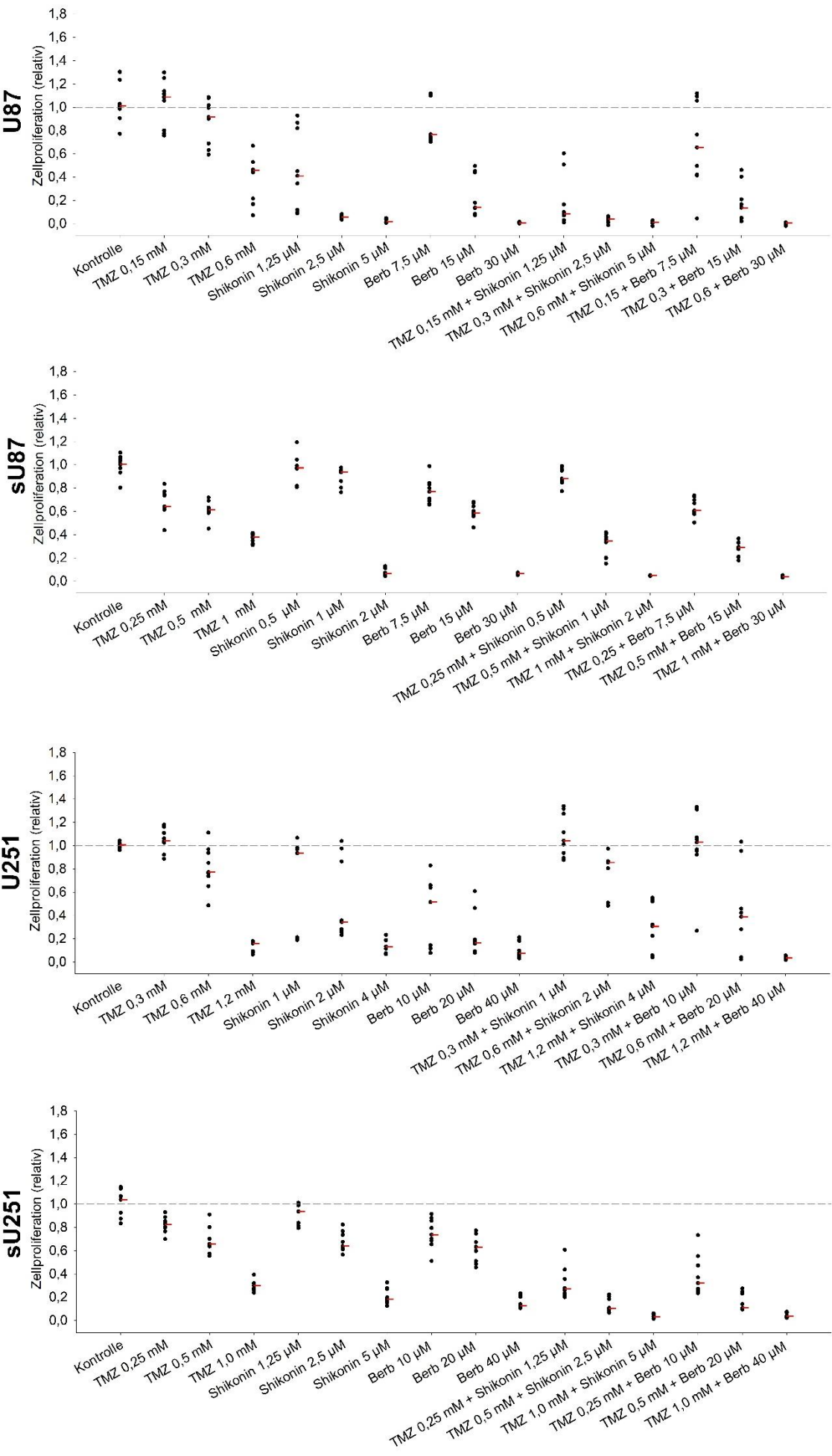


Abbildung 14: Dosisabhängige Reduktion des Zellüberlebens. Shikonin (Spalte links), Berbamin (Mitte) und TMZ (Spalte rechts) senken die Vitalität in U251, sU251, U373, sU373, U87, sU87 und GB14 (von o. nach u.). Konzentrationsabhängige Darstellung der 24h- und 48h-Werte als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ; Daten teilweise aus Werner et al. 2022 [96], modifiziert).

### 3.2.2 Hemmung der Proliferation

TMZ führte in den meisten Zelllinien zu einer Reduktion der Proliferation, deutlich zu sehen aber meist erst ab IC50 bzw. 2x IC50 (s. Abbildung 15). Shikonin hingegen bewirkte auch bei  $\frac{1}{2}$  IC50 oftmals eine deutliche Abnahme der Proliferation, bei IC50 und 2x IC50 war in fast allen Zelllinien so gut wie keine Proliferation mehr nachweisbar. Berbamin zeigte ebenfalls eine eindeutige Minderung der Proliferation bei 2x IC50, teils auch schon bei IC50 oder  $\frac{1}{2}$  IC50. In Kombination mit TMZ zeigte sich gelegentlich eine Zunahme der Proliferation, insbesondere bei Verwendung von  $\frac{1}{2}$  IC50 – sowohl bei Berbamin als auch bei Shikonin. In einigen Fällen kam es aber auch zu additiven Effekten in der antiproliferativen Wirkung (z.B. U87, sU251, GB14).





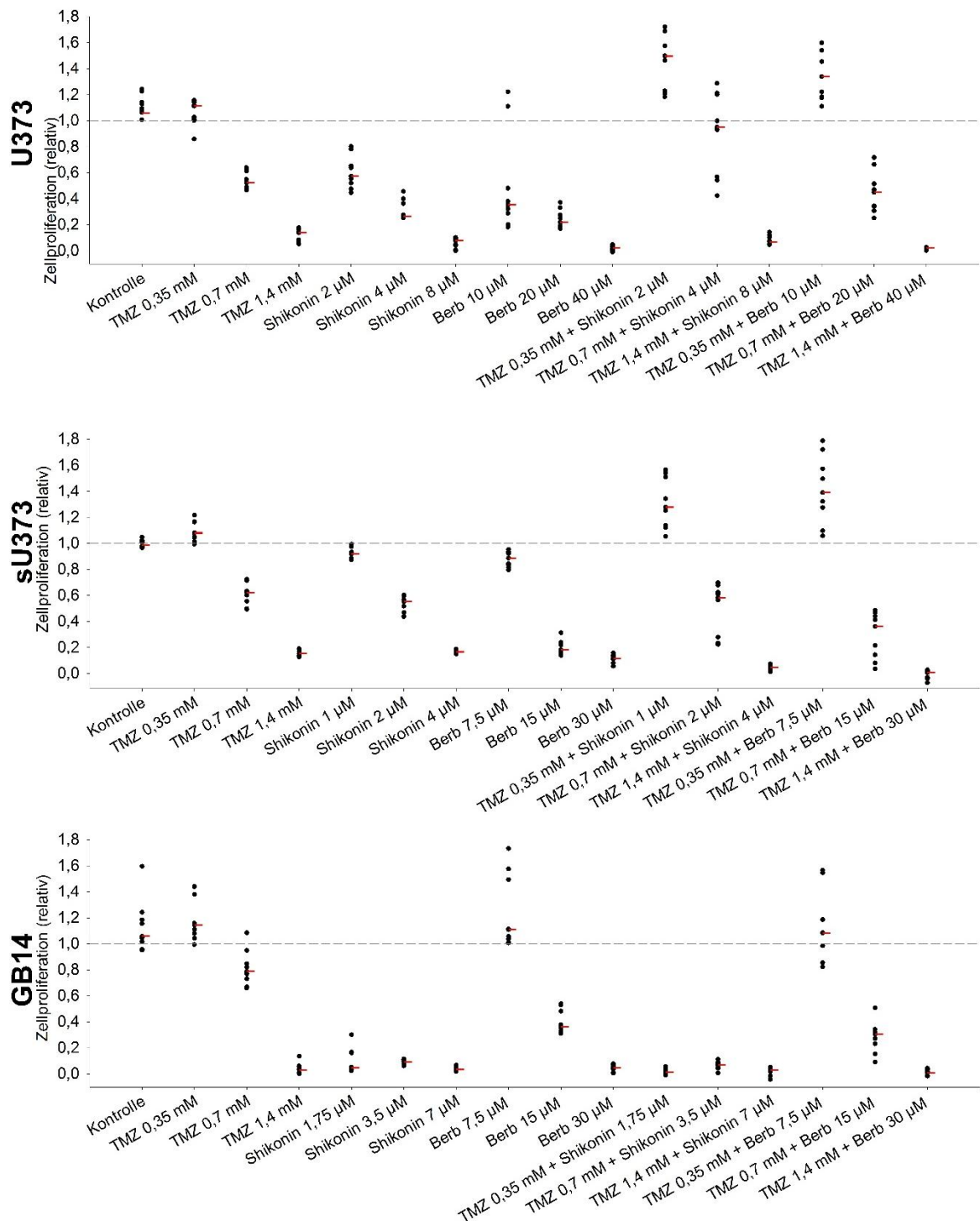


Abbildung 15 (zwei Seiten): Shikonin und Berbamin hemmen die Zellproliferation. Shikonin und Berbamin sind in  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> und 2x IC<sub>50</sub> jeweils allein und in Kombination mit TMZ dargestellt als Einzelwerte (n = 9) und Median (roter Balken; Daten teilweise aus Werner et al. 2022 [96], modifiziert).

### 3.2.3 Unterdrückung der Sphere-Bildung durch Shikonin und Berbamin

Während die Inkubation mit TMZ bei einer IC<sub>50</sub> Konzentration zu keiner Reduktion in Anzahl und Größe der Spheres führte, ließ sich die Bildung der Spheres durch Shikonin teilweise überraschend gut unterdrücken. Unter dem Einfluss von Shikonin bei der IC<sub>50</sub> Konzentration kam bei U87 und

U373 so gut wie keine suffiziente Spherebildung mehr zustande. Bei beiden Zelllinien waren sowohl die Anzahl als auch die morphologische Größe deutlich verringert gegenüber der Kontrollgruppe (s. Abbildung 16). Bei U251 zeigte sich zwar eine zur Kontrollgruppe gesteigerte Anzahl an Spheres, diese waren jedoch morphologisch deutlich verkleinert gegenüber den unbehandelten Zellen (s. Abbildung 16).

Die Behandlung mit Berbamin zeigte ihre Effekte eher in der Größenreduktion der Spheres. Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen blieb die Anzahl der gebildeten Spheres bei U87, U373 und U251 auf ähnlich hohem Niveau. Es ließ sich aber in allen drei Zelllinien ein geringerer Durchmesser der Spheres beobachten (s. Abbildung 16, oben).

Die Ergebnisse von GB14 sind hier der Vollständigkeit halber ebenfalls gezeigt, sind aber mit Vorsicht zu interpretieren, da die Spherebildung dieser Zelllinie generell sehr gering ausgeprägt war. Bei dieser Zelllinie zeigte sich wie bei U87 und U373 eine Reduktion in Größe und Anzahl der Spheres unter Shikoninbehandlung. Die Behandlung mit Berbamin führte zu einem verminderten Größenwachstum der Spheres, aber nicht zur Reduktion ihrer Anzahl (s. Abbildung 16). Unter der Annahme, dass sowohl Nährstoffangebot als auch Sauerstoffverfügbarkeit in den Testgruppen vergleichbar waren, könnte dieses Ergebnis auf eine Beeinflussung der Proliferationsrate durch Berbamin hinweisen.

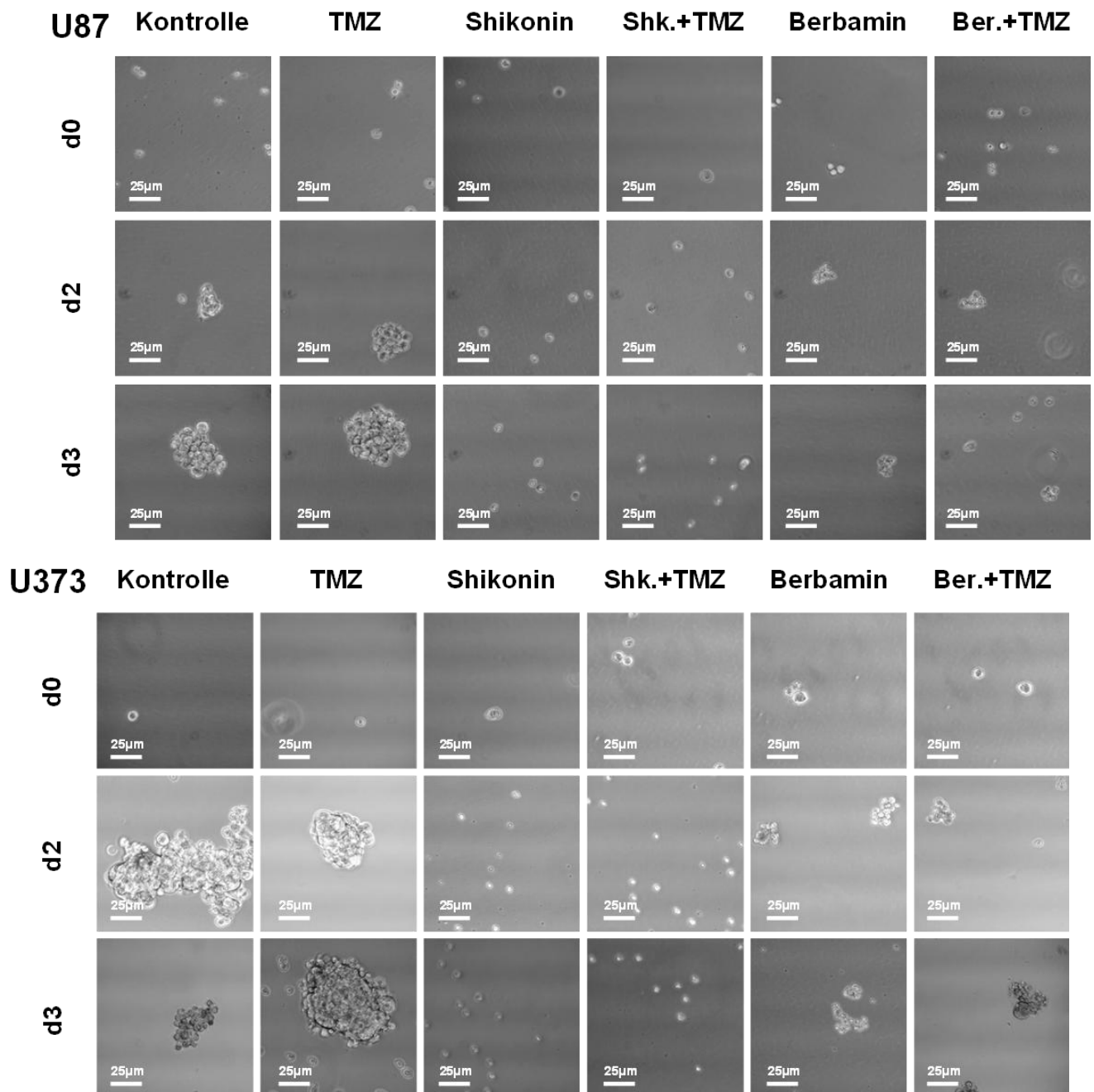


Abbildung 16, gesamte Beschriftung auf Folgeseiten

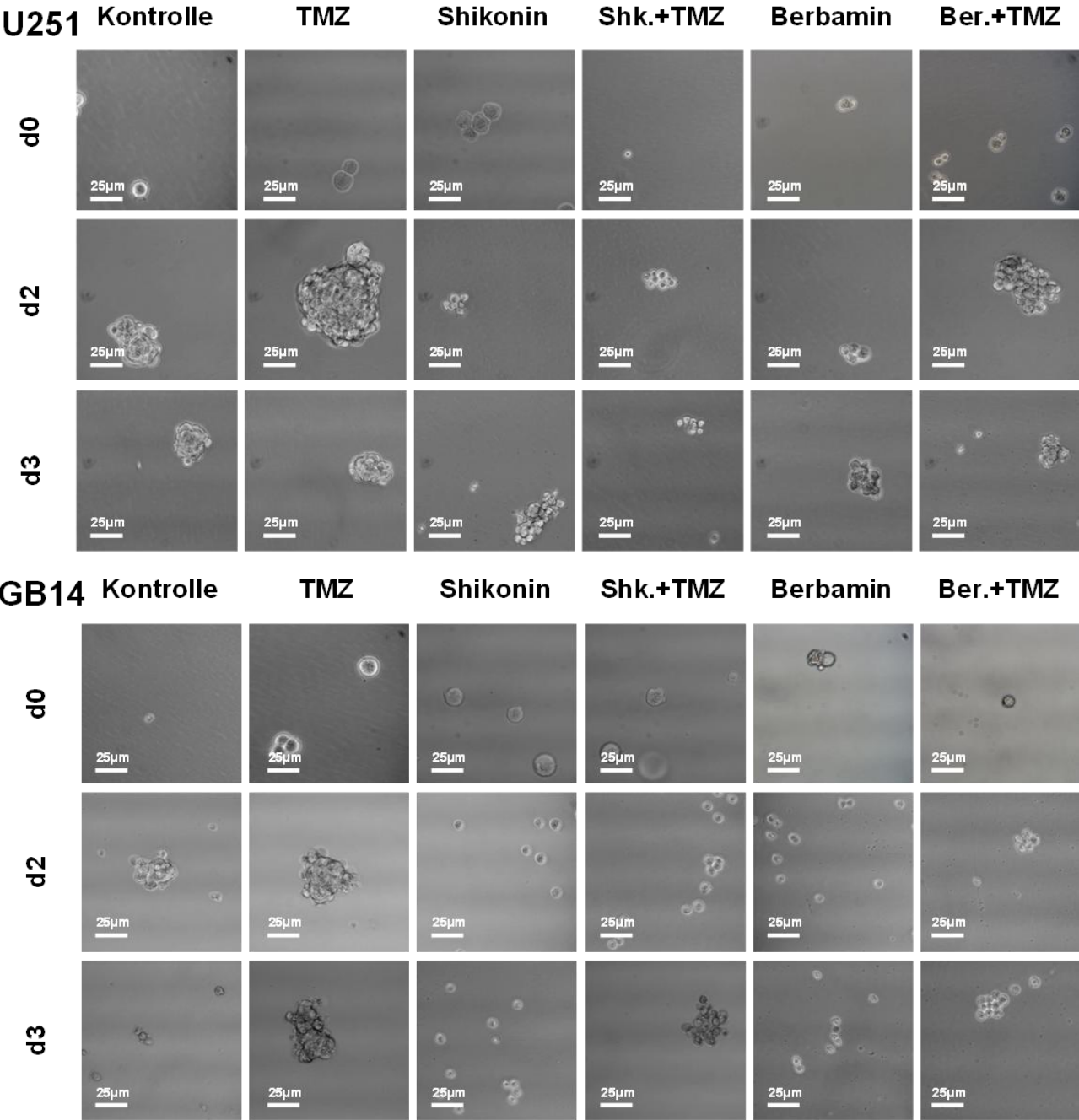


Abbildung 16, gesamte Beschriftung auf Folgeseite

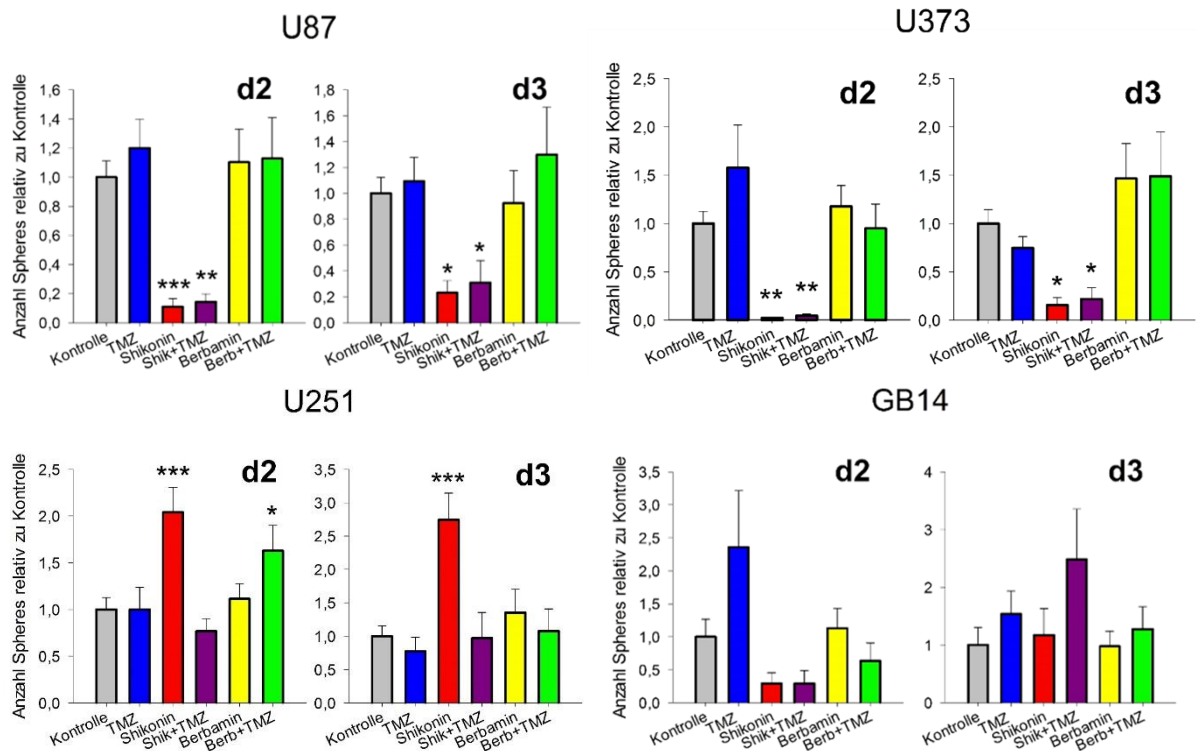


Abbildung 16: Oben (bzw. vorherige Seiten): Fotografische Dokumentation der Spherebildung direkt nach Kulturstart (d0), an Tag 2 (d2) und Tag 3 (d3) der Zelllinien U87, U251, U373 und GB14. Behandlung mit Shikonin, Berbamin, TMZ und Kombinationen jeweils in IC50. Unten (bzw. aktuelle Seite): Quantitative Darstellung der Spherebildung, gezählt wurden jeweils 10 Gesichtsfelder ( $\varnothing$  2,0 mm, 3,1 mm<sup>2</sup>), dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 9; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; Signifikanzangaben in Bezug zur Kontrollgruppe, „nicht-signifikant“ ist der Übersicht halber nicht dargestellt; Daten teilweise aus Werner et al. 2022 [96], modifiziert).

### 3.2.4 Induktion von Apoptose

Die durchflusszytometrischen Experimente mit zur Induktion von Apoptose konnten zeigen, dass sowohl Shikonin als auch Berbamin in der Lage sind, Apoptose in Glioblastomzellen zu induzieren und sich diese Effekte in Kombination mit TMZ verstärkt darstellen lassen.

Besonders wirksam zeigte sich Shikonin bei U87, wo die Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle unter Inkubation mit IC50 um +30,9% erhöht war ( $\frac{1}{2}$  IC50: +12,5%; p < 0,01). Die Behandlung mit TMZ zeigte bei IC50 einen Effekt von +8,9% ( $\frac{1}{2}$  IC50: +18,9%; p < 0,05) und die Kombination beider Substanzen erzielte einen Zuwachs an apoptotischen Zellen von +50,9% ( $\frac{1}{2}$  IC50: +32,9%; p < 0,01). In GB14 zeigten sich ähnliche Tendenzen, bei Inkubation mit IC50 Shikonin erhöhte sich die Rate an apoptotischen Zellen um +58,3% ( $\frac{1}{2}$  IC50: +19,9%; p < 0,001), unter TMZ-Behandlung um +27,0% ( $\frac{1}{2}$  IC50: +14,9; p < 0,001). In Kombination der Substanzen in jeweils IC50 ließ sich eine Zunahme um +69,2% erzielen ( $\frac{1}{2}$  IC50: +51,4%; p < 0,05).

Nach Inkubation mit Berbamin allein zeigten sich lediglich geringe Effekte (U87: -0,4%; n.s.; GB14: +9,8%; p < 0,05; U251: +12,2%; n.s.; U373: +7,3%; n.s.), in Kombination mit TMZ ließen sich aber durchaus erhöhte Raten an apoptotischen Zellen induzieren (U87: +14,4%; p < 0,01; GB14: +52,9%; p < 0,001; U251: +43,5%; p < 0,001; U373: +26,9%; p < 0,001).

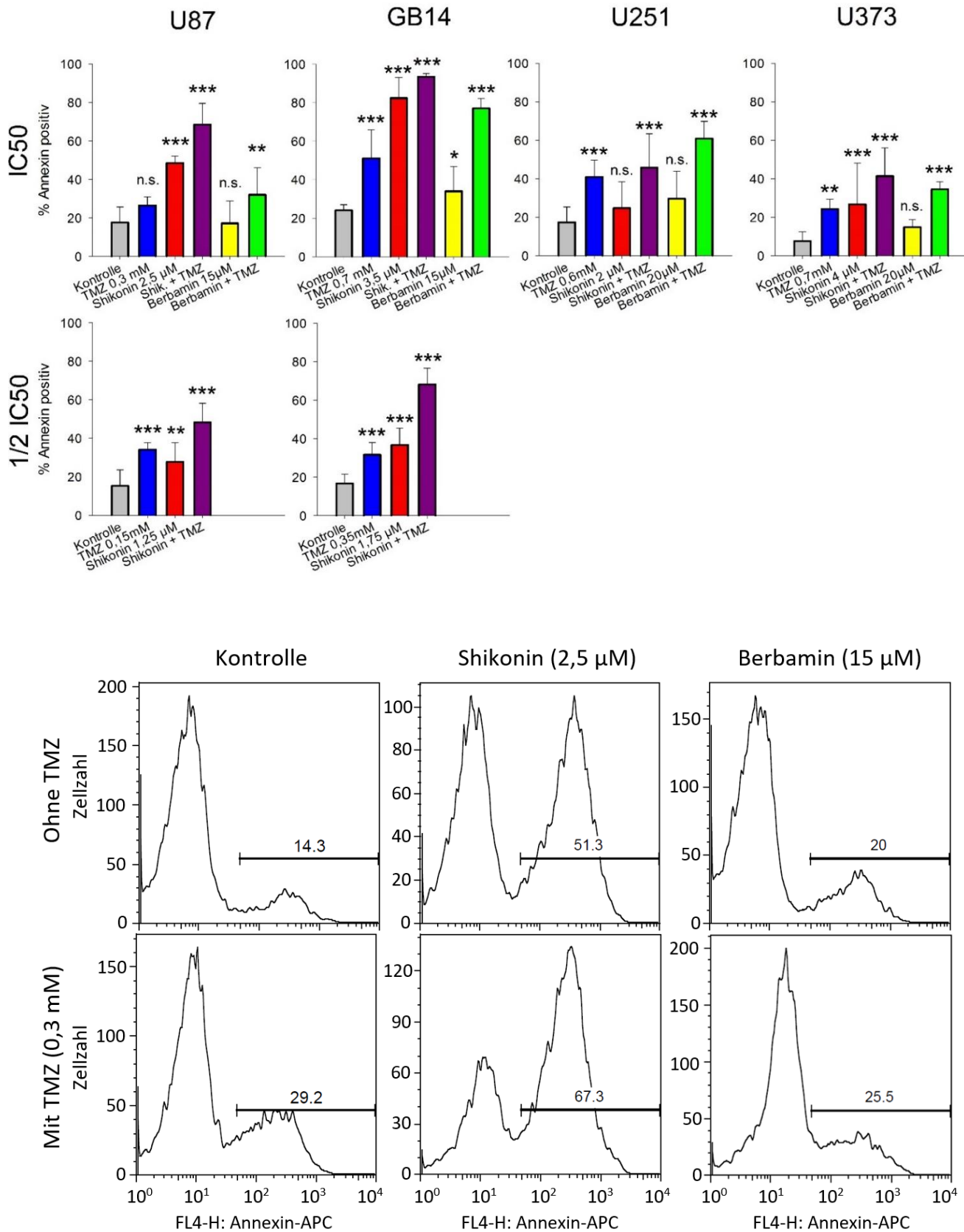


Abbildung 17: Oben: Anteil von Annexin-V-positiven Zellen an der gesamten Zellzahl nach fünftägiger Inkubation mit Shikonin, Berberamin, TMZ und Kombination in IC50 (U87, GB14, U251 und U373) und 1/2 IC50 (U87,

GB14) dargestellt als Mittelwert + SEM ( $n = 9$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) Unten: Beispielhafte Darstellung der Auswertungsergebnisse von U87 (IC50), hier jeweils eine Messung ( $n = 1$ , entspricht 10.000 Zellen; Daten teilweise aus Werner et al. 2022 [96], modifiziert).

### 3.2.5 Shikonin beeinflusst die TMZ-Resistenz kaum

Die Ergebnisse dieses Experimentes lieferten kein eindeutiges Bild. Es steht im Vordergrund, dass die Zellvitalitätskurven auch bei hohen TMZ-Konzentrationen nicht bis zur Nulllinie zurückgehen, auch nicht in Kombination mit Shikonin. Des Weiteren zeichnet sich bei den Kurven kein klarer Trend ab bezüglich der verwendeten Shikonin-Konzentration. Zwar weist die 3,2  $\mu\text{M}$  – Kurve in allen drei Zelllinien die niedrigsten Werte auf, beim Rest der Werte ist aber kein solcher Trend zu verzeichnen. Dieser fehlende Effekt sollte in weiteren Studien geklärt werden. Aus Zeitgründen wurde jedoch darauf verzichtet.

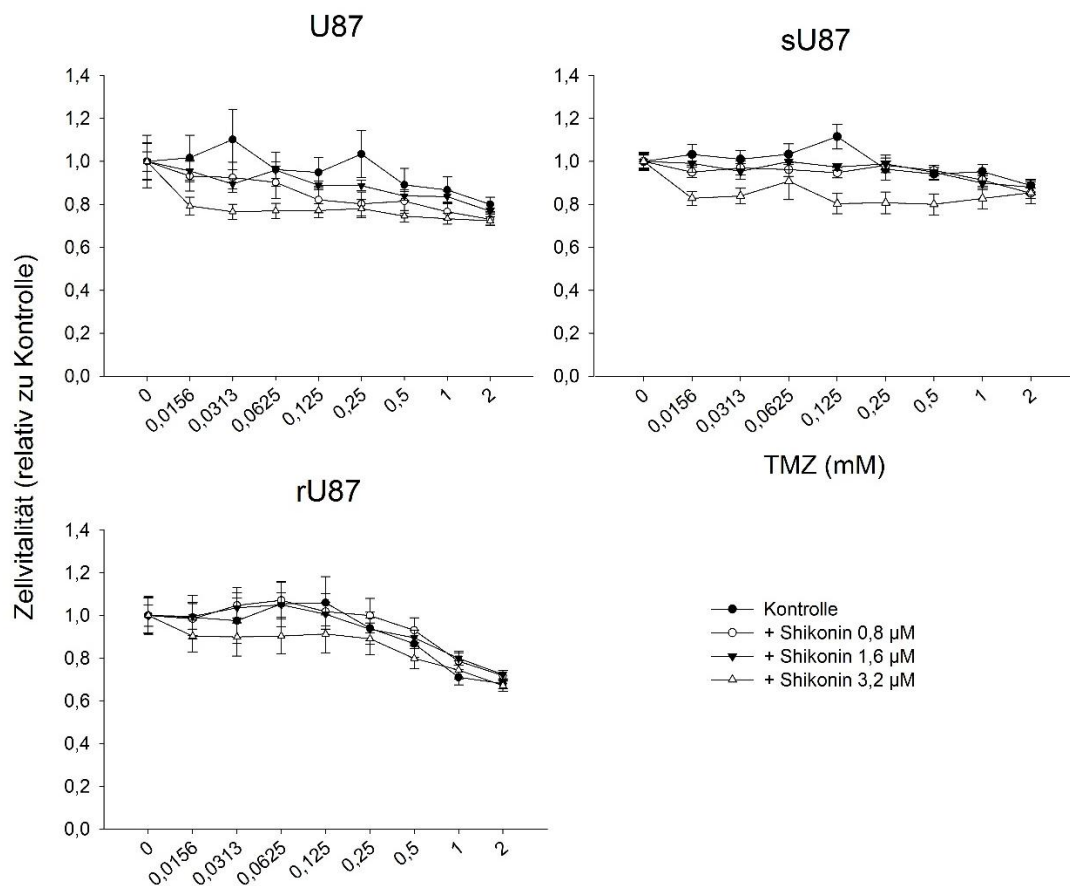


Abbildung 18: Relatives Zellüberleben von U87, rU87 und sU87 in Abhängigkeit steigender TMZ-Konzentration und 24-stündiger Koinkubation mit Shikonin (0,8; 1,6 und 3,2  $\mu\text{M}$ ). Dargestellt aus Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ).



### 3.3 Shikonin moduliert die PpIX-Fluoreszenz

Die unter diesem Punkt aufgeführten Experimente konnten zeigen, dass Shikonin eine Modulation der intrazellulären PpIX-Fluoreszenz bewirken kann.

#### 3.3.1 Ergebnisse der Fluorometrie

Die Messungen im Mikroplatten-Reader (FLUOstar OPTIMA) zeigten eine dosisabhängige Erhöhung der intrazellulären Fluoreszenz nach Inkubation mit steigender Konzentration an 5-ALA, was am ehesten auf die zelluläre PpIX-Produktion zurückzuführen ist. U87 zeigte bei einer Inkubation mit 100 µg/ml 5-ALA die größte Zunahme an PpIX-Fluoreszenz unter Shikonin-Behandlung. Bei Inkubation mit  $\frac{1}{2}$  IC50 Konzentration ließ sich dort eine dem korrespondierenden Zellüberleben relativierte Fluoreszenzerhöhung von 13.900 AU (arbitrary unit) auf 20.800 AU erzielen (+50,2%;  $p < 0,05$ ). GB14 zeigte in diesem Versuch den gegenteiligen Effekt, dort kam es bei einer 5-ALA-Konzentration von 200 µg/ml zu einer Abnahme um -26,6% der PpIX-Fluoreszenz unter Shikoninbehandlung in  $\frac{1}{2}$  IC50 Konzentration ( $p < 0,001$ ).

Sowohl bei U87 als auch bei GB14 lag das gemessene Zellüberleben nach Shikonin-Behandlung mit der IC50 Konzentration so niedrig, dass die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung nicht auswertbar waren (U87: 17,5%; GB14: 10,9%).

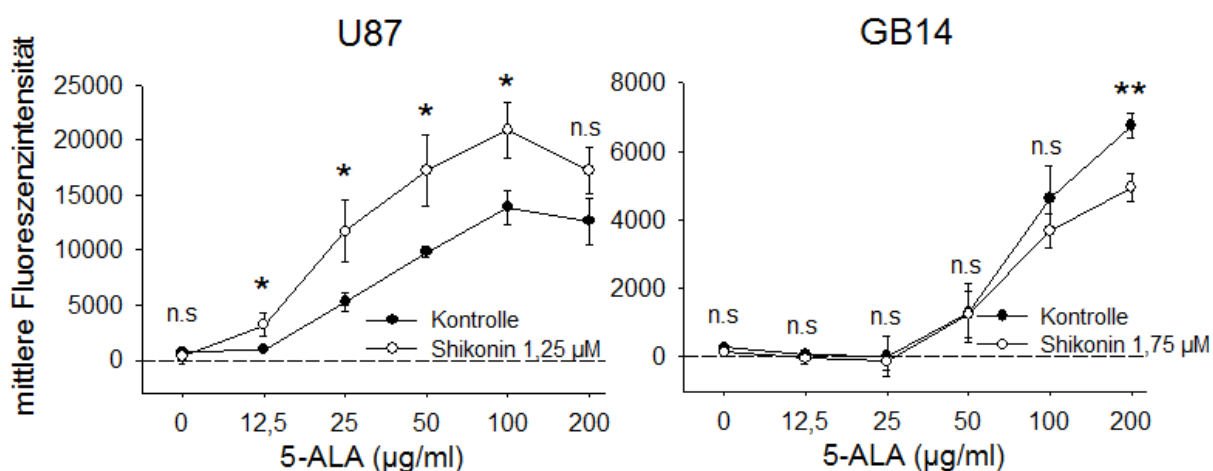


Abbildung 19: Shikonin erhöht die PpIX-Fluoreszenz in U87. Untersuchung der zellulären Fluoreszenz von parentalen U87 und GB14 nach 24-stündiger Inkubation mit 5-ALA. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz in Abhängigkeit steigender Konzentrationen von 5-ALA bei gleichzeitiger Inkubation mit oder ohne Shikonin (U87: 1,25 µM; GB14: 1,75 µM) als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 9$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 3.3.2 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

In der FACS-Analyse der zellulären PpIX-Akkumulation zeigte sich eine Erhöhung der Fluoreszenz in allen Zelllinien nach Inkubation mit 5-ALA. Diese ist am ehesten zurückzuführen auf die mitochondriale Produktion des Porphyrins. Das ABCG2-blockierende Molekül Ko143 konnte im Vergleich zu den Kontrollgruppen die Fluoreszenz in allen Zellen signifikant erhöhen. Shikonin zeigte ähnliche



Effekte, jedoch mit geringerer Deutlichkeit als Ko143. Die alleinige Inkubation mit Shikonin führte zu erhöhter intrazellulärer Fluoreszenz, da Shikonin selbst fluoreszierende Eigenschaften besitzt. Es wurde angenommen, dass sich die Gesamtfluoreszenz aus der Grundfluoreszenz der Zellen, Ko143, Shikonin und der PpIX-Fluoreszenz in additiver Weise zusammensetzt. Anhand dieser Annahme wurde die PpIX-Fluoreszenz per Subtraktion der jeweiligen Kontrollgruppen von der Gesamtfluoreszenz der mit 5-ALA inkubierten Zellen kalkuliert. Es zeigte sich eine Erhöhung des PpIXs unter Ko143 um +124,7% in U87, +172,7% in U87 Spheres und um +188,3% in GB14 ( $p < 0,001$ ). Shikonin bewirkte eine nicht-signifikante Erhöhung um +30,1% in U87, +26,9% in U87 Spheres und um +81,2% in GB14.

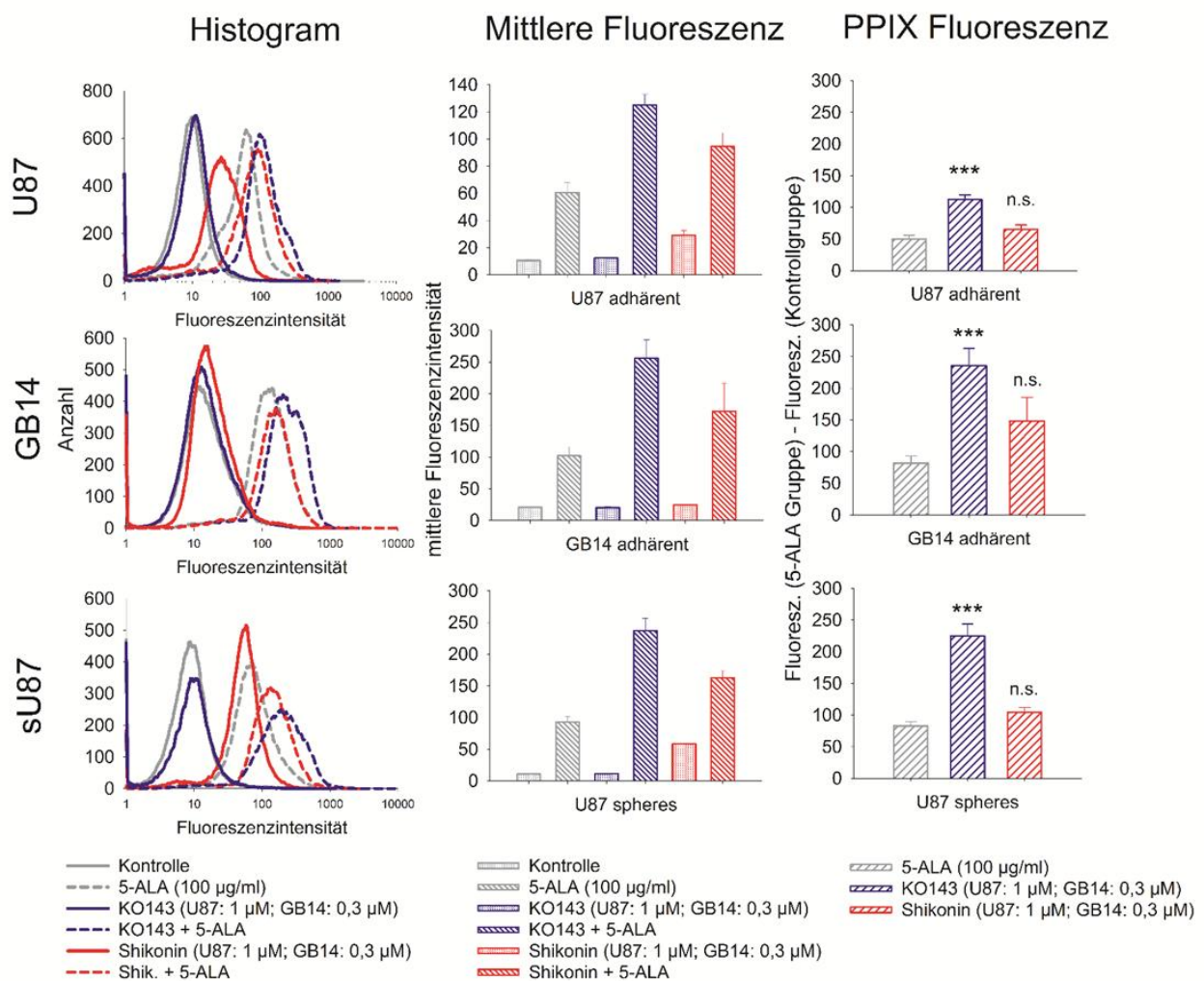


Abbildung 20: Modulierend der PpIX-Fluoreszenz durch Ko143 und Shikonin. Untersuchung der zellulären Fluoreszenz im FL3-Kanal (670 nm LP) mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen (obere Reihe: parentale U87; mittlere Reihe: GB14; untere Reihe: U87 Spheres) wurden jeweils mit oder ohne 5-ALA (100 µg/ml) behandelt und mit Shikonin oder Ko143 koinkubiert (U87/sU87: 1 µM; GB14: 0,3 µM). Die Daten sind dargestellt als Histogramme (links) und als Balkendiagramme mit Mittelwert + SEM (Mitte), Mittelwerte abzüglich der Kontrollgruppen + SEM (rechts),  $n = 9$  (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; Werner et al. 2022 [96], modifiziert)

### 3.3.3 Ergebnisse der Konfokalmikroskopie

Die Bilder, die mit dem Konfokalmikroskop aufgenommen wurden, zeigen gut, wie die Inkubation mit 5-ALA zu einer erhöhten Fluoreszenz führt (rot), was auf die mitochondriale PpIX-Produktion und den intrazellulären Transport zurückzuführen ist. Die Kontrollgruppe, die ohne 5-ALA behandelt wurde, zeigt kaum nachweisbare Fluoreszenz im untersuchten Spektrum. Die Inkubation mit Rhodamin 123 lässt in den Aufnahmen auf die Position der Mitochondrien schließen (grün), was sich auch in der kombinierten Darstellung zeigt.

Jedoch konnten die Aufnahmen keinen Hinweis darauf erbringen, dass Shikonin zu einer Akkumulation von PpIX innerhalb der Mitochondrien führt, eine Ko fluoreszenz ist nicht eindeutig erkennbar. Wie oben beschrieben wurde daher auf weitere Wiederholungen des Experiments verzichtet.

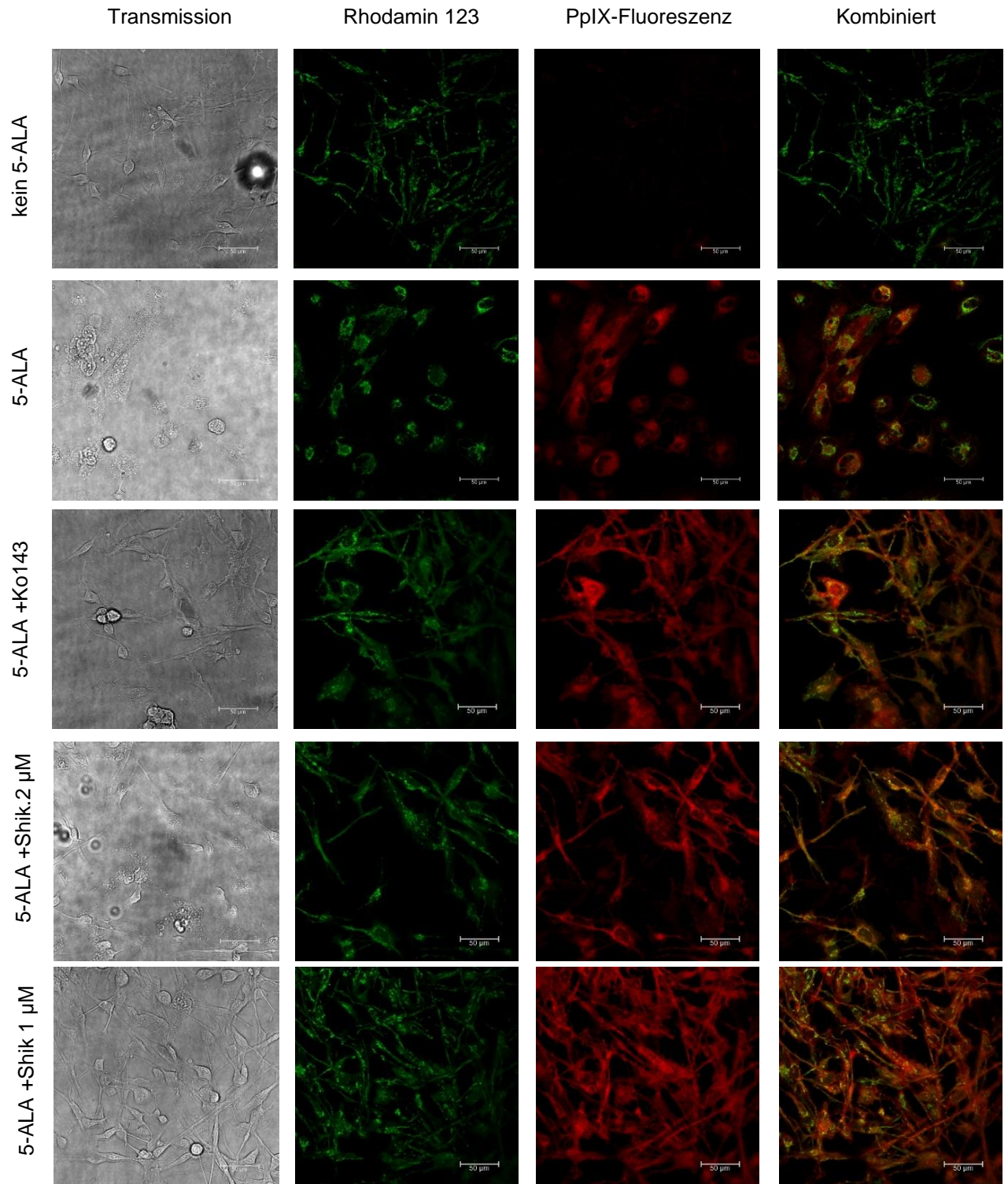


Abbildung 21: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Transmission (links), der Fluoreszenz von Rhodamin 123 (Mitte links), PpIX (Mitte rechts) sowie der Kombination (rechts) in U251 nach 16-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Kombinationen aus 5-ALA (50 µg/ml), Ko143 (1 µM) und Shikonin (1 µM bzw. 2 µM). Die Zellen wurden 30 min vor der Aufnahme mit Rhodamin 123 (0,02 µM) angefärbt und anschließend zweimal gewaschen. Der Balken entspricht 50 µm.

## 3.4 Beeinflussung der PDT durch sekundäre Pflanzenstoffe

### 3.4.1 Bestrahlungsbedingungen

Die Bestrahlung der drei Zelllinien U87, GB14 und U251 nach 24-stündiger Inkubation mit 5-ALA erzielte die erwarteten Effekte. Die Kontrollgruppen, die nicht mit 5-ALA behandelt wurden, zeigten auf die Bestrahlung durch den Laser keine Reduktion des Zellüberlebens, selbst bei hoher Lichtintensität. Bei höheren 5-ALA-Konzentrationen sind Effekte durch die photodynamische Therapie gut zu beobachten. Die deutlichste Reduktion des Zellüberlebens fand sich bei U87 und U251 bei einer 5-ALA-Konzentration von 50 µg/ml, bei GB14 bei 100 µg/ml 5-ALA. Für die weiteren Versuche wurde die Kombination aus 5-ALA-Konzentration und Lichtintensität so gewählt, dass ein mittleres Zellüberleben von ca. 80% zu erwarten ist. Das ist dadurch begründet, dass von diesem Ausgangswert noch deutliche Verbesserungen der PDT nach unten, im Sinne einer Reduktion des Zellüberlebens, zu beobachten wären, man andererseits aber auch eine eventuelle Verschlechterung der photodynamischen Effekte durch die Veränderungen der Ausgangsbedingungen sehen könnte.

U87 wurde in den weiteren Experimenten mit 100 µg/ml 5-ALA inkubiert (zunächst für 24 Stunden, im Verlauf auf 4 Stunden reduziert, s. 2.6.5) und mit 2 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt. GB14 wurde mit 100 µg/ml 5-ALA und 1 J/cm<sup>2</sup> Bestrahlung behandelt. Für U251 wurde die Kombination aus 50 µg/ml 5-ALA und 0,5 J/cm<sup>2</sup> gewählt.

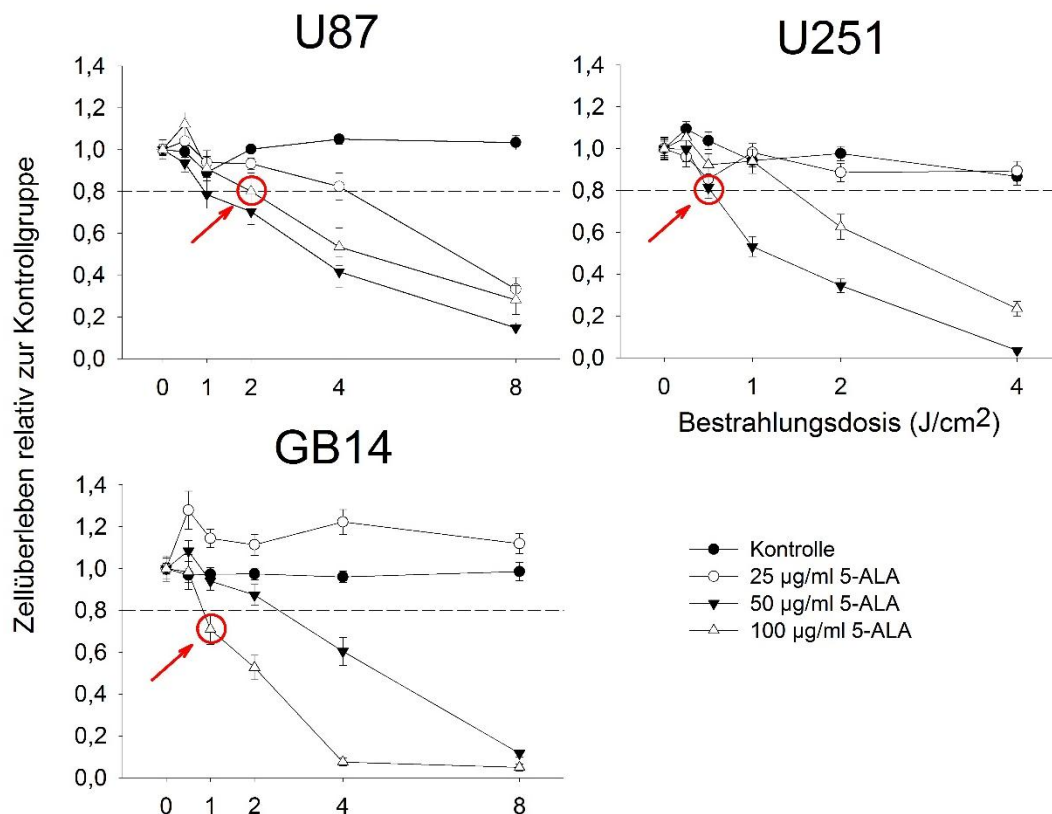


Abbildung 22: 5-ALA Inkubation für 24 Stunden und anschließende Bestrahlung führen zu verringertem Zellüberleben. U87 (links), GB14 (Mitte) und U251 (rechts) wurden jeweils einen Tag mit vier verschiedenen Konzentrationen an 5-ALA (0, 25, 50 und 100 µg/ml) inkubiert und anschließend mit unterschiedlicher Intensität bestrahlt (635 nm). Gezeigt ist jeweils das mittlere Zellüberleben relativ zur Kontrollgruppe 24 Stunden nach Bestrahlung ausgewertet mittels CellTiter® Blue Assay (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n = 18$ ). Die Markierungen zeigen die jeweils ausgewählten Kombinationen aus Inkubation und Bestrahlung für die darauffolgenden Experimente.

### 3.4.2 Einfluss auf die Zellvitalität

Die Ergebnisse dieser Untersuchung lieferten keine klar erkennbare Ab- oder Zunahme der Zellvitalität (s. Abbildung 23). Die Zellvitalität nach alleiniger PDT-Behandlung lag bei U87 knapp unter 80%, bei GB14 lag der Wert deutlich niedriger bei unter 50%. Shikonin wurde in diesem Experiment in etwas geringeren Konzentrationen benutzt und bewirkte eher einen Überlebensvorteil für beide Zelllinien. Unter TMZ-Therapie zeigt sich ein Absenken der Zellvitalität in beiden Linien, welches durch PDT verstärkt werden konnte, der Effekt ist jedoch eher als additiv zu interpretieren weniger als synergistisch, da der kombinierte Effekt die Summe beider Effekte nicht übersteigt. Die Kombination aus Shikonin, TMZ (und PDT) war wiederum weniger effektiv als die Kombinationen ohne Shikonin (s. Abbildung 23). Eine logische Schlussfolgerung ließ sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten.



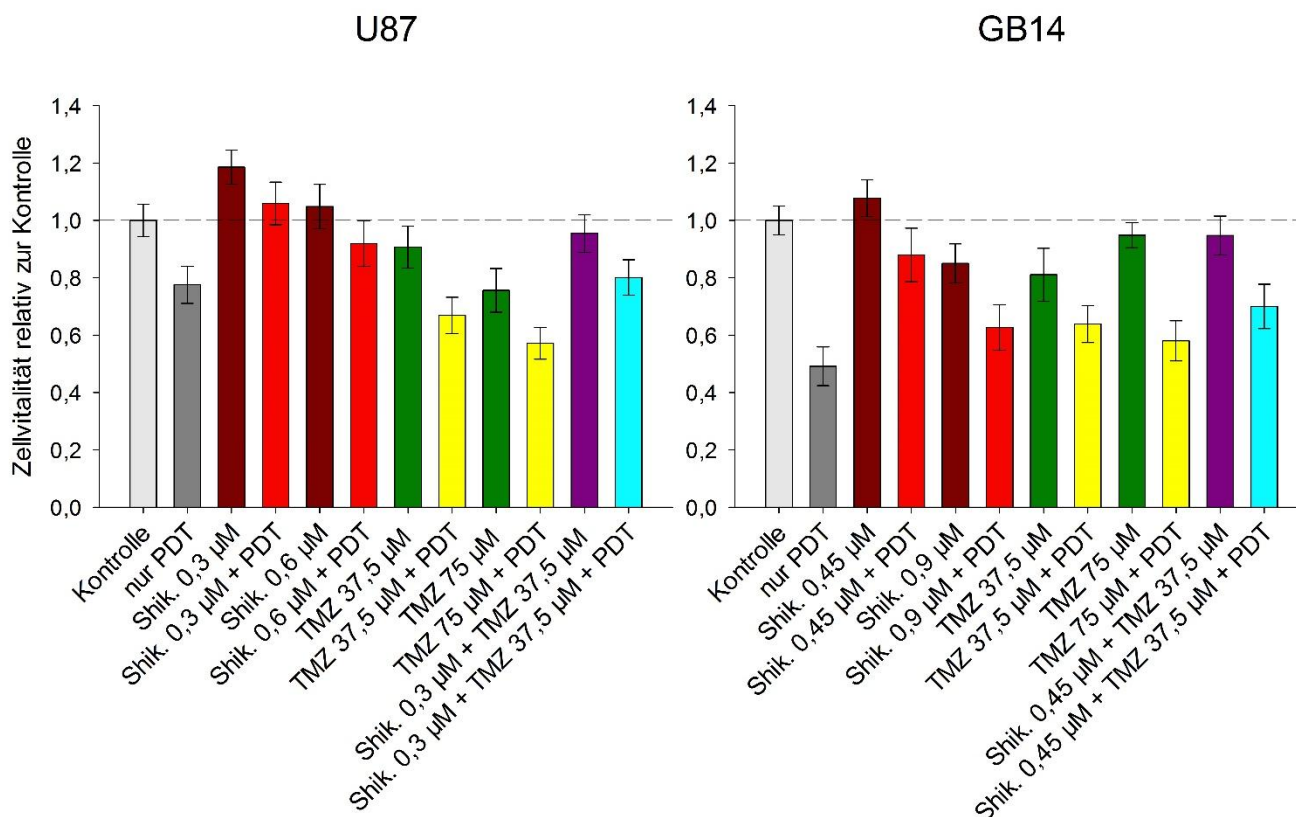


Abbildung 23: Shikonin und TMZ haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellvitalität nach *in vitro* PDT in U87 (links) und GB14 (rechts) Zellen. Vierundzwanzig Stunden nach Start der Zellkultur wurden die Zellen mit Shikonin (U87: 0,3 und 0,6 µM; GB14: 0,45 und 0,9 µM) und/oder TMZ (U87: 37,5 und 75 µM; GB14: 87,5 und 175 µM) für einen Tag inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FCS-freiem Medium und 100 µg/ml 5-ALA für weitere 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurde das Medium wieder gegen FCS-haltiges Medium gewechselt und die Zellen mit der vorab ermittelten Strahlungsintensität (s. Abbildung 22) bestrahlt. Am darauffolgenden Tag wurde dann ein CellTiterBlue®-Assay durchgeführt, um die Zellvitalität zu bestimmen. Kontrollgruppen wurden eingerichtet, die Daten sind relativ zur Kontrolle dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 18$ ).

### 3.4.3 Einfluss auf die Zellproliferation

Wie im vorherigen Abschnitt lieferte auch die Untersuchung der Zellproliferation keine eindeutig interpretierbaren Ergebnisse (Abbildung 24). Bei U87 zeigte sich kaum eine Beeinflussung der Proliferation unter den verschiedenen Kombinationen aus Shikonin, TMZ und PDT. Bei GB14 zeigt sich, dass PDT jeweils zu einer leichten Erhöhung der Proliferation führt, im Vergleich zu seinem Kontrollbalken links daneben. Auch hier führt Shikonin in der genutzten Konzentration weder zu einer verstärkten Reduktion der Zellproliferation noch zu einer Verstärkung des photodynamischen Effektes (s. Abbildung 24). Allerdings sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe nur mäßig interpretierbar, da zum einen die Gruppe mit alleiniger PDT-Behandlung nicht zur Reduktion der Zellproliferation führt und zum anderen nur geringfügige Unterschiede zwischen den einzelnen Balken zu erkennen sind.

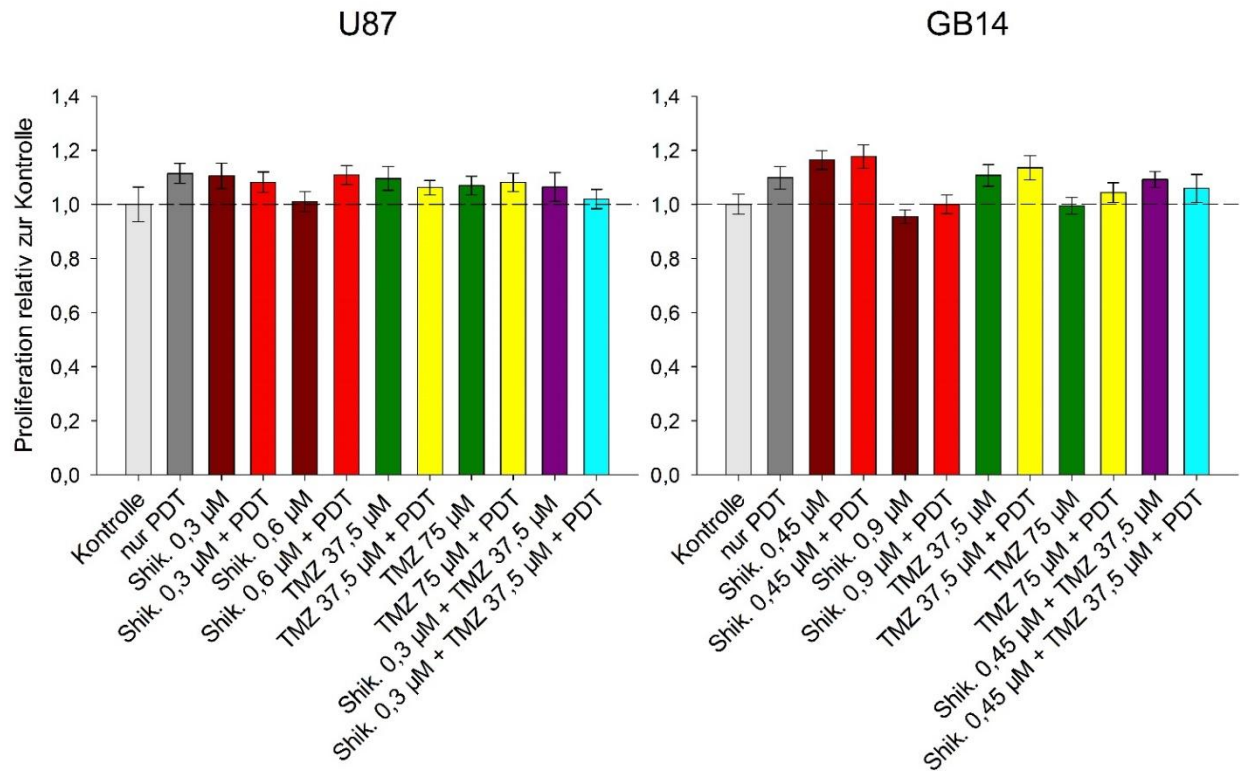


Abbildung 24: Shikonin und TMZ haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellproliferation nach *in vitro* PDT in U87 (links) und GB14 (rechts) Zellen. Vierundzwanzig Stunden nach Start der Zellkultur wurden die Zellen mit Shikonin (U87: 0,3 und 0,6 µM; GB14: 0,45 und 0,9 µM) und/oder TMZ (U87: 37,5 und 75 µM; GB14: 87,5 und 175 µM) für einen Tag inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FCS-freiem Medium und 100 µg/ml 5-ALA für weitere 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurde das Medium wieder gegen FCS-haltiges Medium gewechselt und die Zellen mit der vorab ermittelten Strahlungsintensität (s. Abbildung 22) bestrahlt. Am darauffolgenden Tag wurde dann ein CellTiter96® AqueousOneSolution-Assay durchgeführt, um die Zellproliferation zu bestimmen. Kontrollgruppen wurden eingerichtet, die Daten sind relativ zur Kontrollgruppe dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 18$ ).

### 3.4.4 Einfluss auf die Induktion von Apoptose

Die Untersuchung, inwiefern Shikonin die Induktion von Apoptose bei gleichzeitiger Bestrahlung steigern kann, erbrachte keine eindeutig interpretierbaren Ergebnisse. Es ist zu sehen, dass es unter Behandlung mit Shikonin zu einer Erhöhung der Apoptoserate kommt und dass die Kombination mit 5-ALA-PDT oftmals effektvoller ist. Jedoch zeigen die als Kontrolle gedachten Gruppen „Nur Licht“ und „Nur ALA“ auch eine Erhöhung der Apoptoserate in nahezu allen Settings. Somit ist es schwierig, eine Aussage zu treffen, welche einzelne Komponente im jeweiligen Aufbau für den erzielten Effekt verantwortlich zu machen ist.

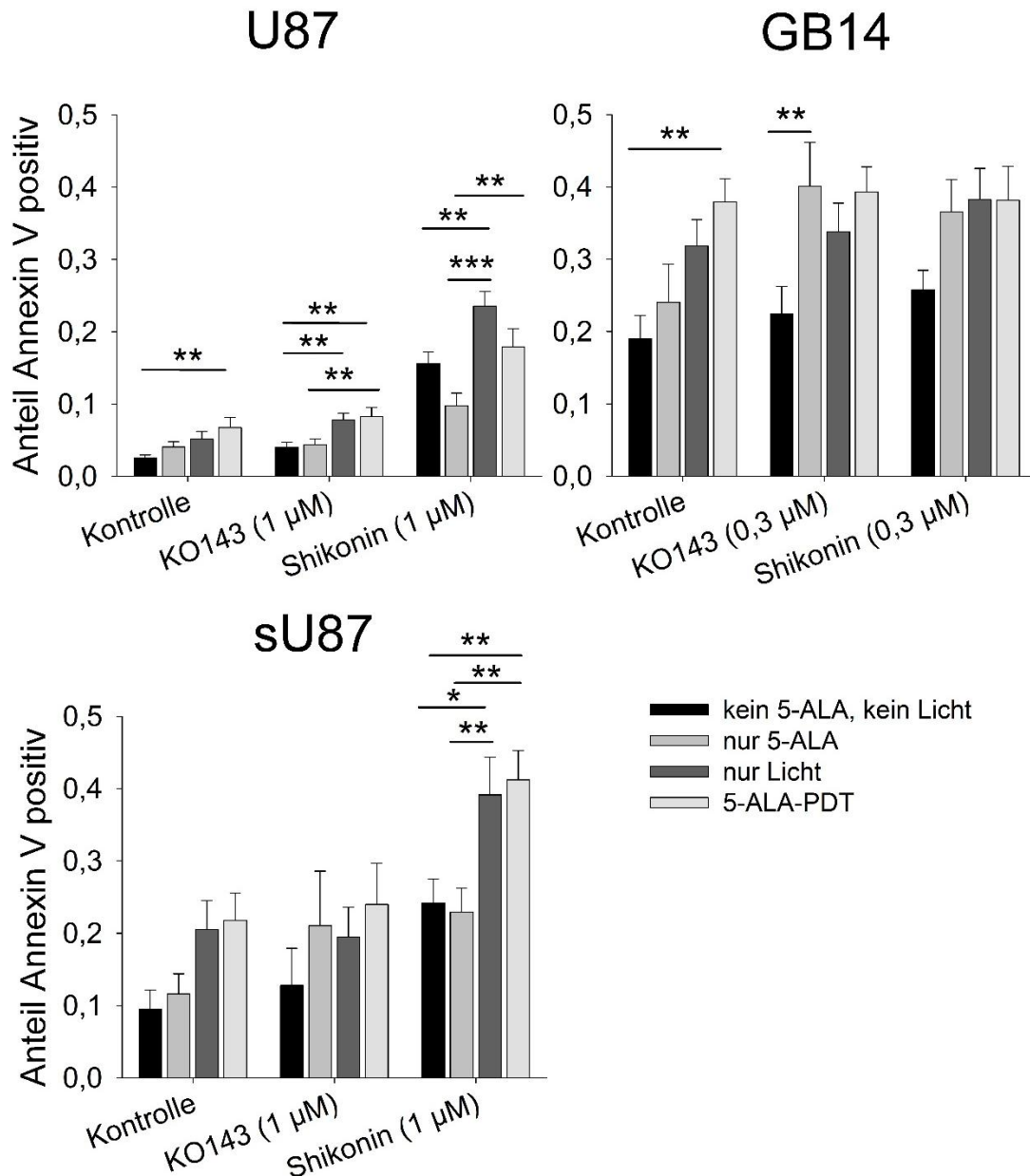


Abbildung 25: Shikonin und Ko143 zeigen uneindeutige Effekte auf die Induktion von Apoptose nach PDT. U87 (oben links), GB14 (oben rechts) und U87 Spheres (unten links) wurden vier Stunden mit 5-ALA (100 µg/ml), Shikonin oder Ko143 (je 1 µM bzw. 0,3 µM) inkubiert und anschließend bestrahlt. Gezeigt ist der Anteil an apoptotischen Zellen (1 = 100%) in der Gesamtzahl an behandelten Zellen 24 Stunden nach der Bestrahlung, gemessen mittels Durchflusszytometrie und aufgetragen als Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 9). Zur besseren Übersicht sind nur die signifikanten Unterschiede dargestellt (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001), alle nicht-signifikanten Unterschiede sind nicht dargestellt.



### 3.5 Einfluss von Shikonin und PDT auf die mRNA-Expression

#### 3.5.1 Charakterisierung von U87, GB14 und sU87

Die Untersuchung der mRNA in U87, GB14 und sU87 diente dazu, einschätzen zu können, wie stark *ABCB6* (*ATP binding cassette subfamily B member 6*), *ABCG2* (*ATP binding cassette subfamily G member 2*), *NPM1* (*Nucleophosmin 1*), *DJ-1* (*alias PARK7, Parkinson disease protein 7*), *NF-1* (*Neurofibromin 1*) und *ATG4C* (*Autophagy Related 4C Cysteine Peptidase*) in den Zellen von Haus aus exprimiert sind. Die mRNA-Expression wurden relativ zur Menge des Housekeeping Genes TBP (*TATA-binding protein*) berechnet (s. Tabelle 3). Es ist zu erkennen, dass U87 und sU87 ein recht ähnliches Expressionsmuster zeigen. sU87 exprimiert deutlich weniger *ABCB6* als U87. GB14 scheint deutlich weniger *ABCG2* zu exprimieren als U87.

	U87	SD (n= 2)	sU87	SD (n = 2)	GB14	SD (n = 2)
ABCB6	7,16	0,04	1,13	0,01	4,69	0,00
ABCG2	6,73	0,00	4,63	0,06	0,18	0,00
NPM1	843,36	8,41	592,22	24,52	467,88	6,58
DJ-1	274,37	6,52	168,90	8,51	183,55	3,63
NF-1	9,06	0,04	13,45	0,18	35,75	0,96
ATG4C	0,58	0,01	0,43	0,01	0,46	0,01

Tabelle 3: mRNA-Expression relativ zur Menge an TBP. Aufgeführt sind die Werte von U87, sU87 und GB14 als Mittelwert und Standardabweichung (SD, n = 2).

#### 3.5.2 Erhöhung von *NF-1* durch Shikonin und PDT

Nach 4-stündiger Inkubation der Zellen aus dissoziierten U87 Spheres mit Shikonin und/oder 5-ALA und anschließender Bestrahlung konnte bei fünf der sechs untersuchten Marker keine signifikante Änderung in der mRNA-Expression erkannt werden. Lediglich der Tumorsuppressor *NF-1* stieg sowohl unter 1  $\mu$ M Shikonin (1,31-fach rel. zur Kontrolle) als auch bei alleiniger PDT (1,37-fach relativ zur Kontrolle) an. Die Kombination beider Behandlungen führte darüber hinaus zu einer weiteren Verstärkung des Effektes, sodass eine Erhöhung der mRNA-Expression auf das 1,60-fache der Kontrollgruppe erzielt werden konnte ( $p < 0,001$ ).

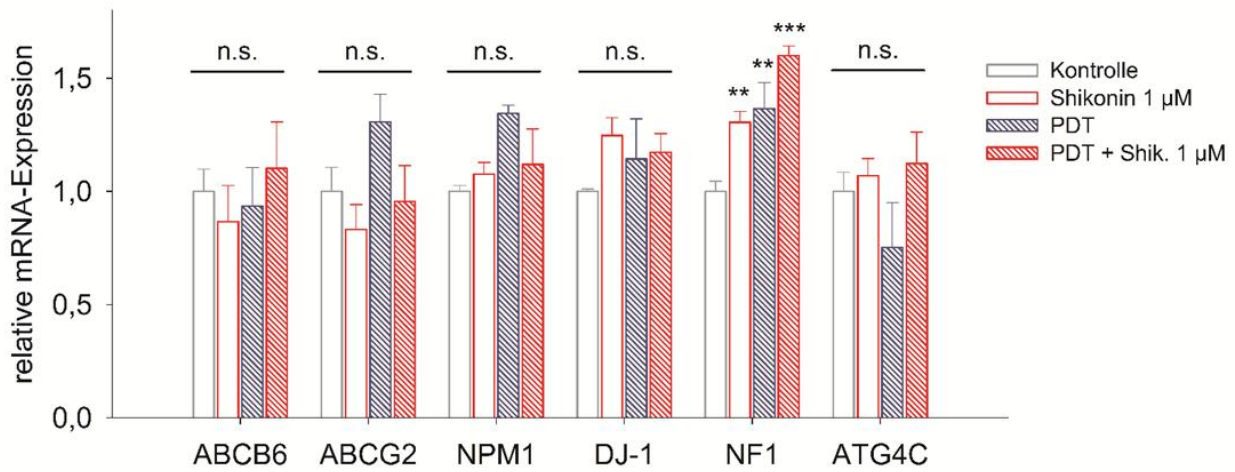


Abbildung 26: PDT und Shikonin führen zu einer Erhöhung der NF-1 mRNA-Expression. Dargestellt ist jeweils die mittlere mRNA-Expression relativ zur Kontrollgruppe gemessen mit RT-qPCR (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 6; Werner et al. 2022 [96], modifiziert)

## 4. Diskussion

### 4.1 Sekundäre Pflanzenstoffe zeigen zytotoxische Effekte

#### 4.1.1 Shikonin

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass Shikonin viele unterschiedliche zytotoxische Effekte auf Glioblastomzellen und deren Spheres *in vitro* aufweist. Es konnte eine dosis-abhängige Reduktion der Zellvitalität gezeigt werden (3.2.1), ebenso unterdrückte Shikonin die Proliferation der Zellen (3.2.2) und induzierte Apoptose (3.2.4). Darüber hinaus bewirkte Shikonin eine Unterdrückung der Neubildung von Tumorspheres aus adhärenenten Zellen (3.2.3).

Aktuelle Forschungsarbeiten zeigen ebenfalls die vielseitigen Effekte von Shikonin auf unterschiedliche Tumorentitäten. So konnte in Stammzellen vom Mammakarzinom eine Reduktion spezifischer Marker erreicht werden, u.a. *Nanog*, *SOX-2*, *c-myc* oder *ALDH-1* [97]. Auch in CD133-positiven Glioblastomstammzellen (U87 und U251) konnte Shikonin die Aktivität der pro-apoptotischen Caspase-9 und Caspase-3 steigern und gleichzeitig Bcl-2 reduzieren [97, 98]. JNK/c-Jun [99] EGFR [100] und PI3K/Akt [100, 101] scheinen eine nicht unwesentliche Rolle im Wirkmechanismus von Shikonin zu spielen. Dieser ist noch nicht vollständig entschlüsselt, sollte aber weiterhin Gegenstand der Forschung bleiben.

#### 4.1.2 Berbamin

Ähnlich zu Shikonin zeigen die Ergebnisse, dass auch Berbamin in der Lage ist, Zellvitalität (3.2.1) und Proliferation (3.2.2) zu reduzieren und Apoptose in Glioblastomzellen zu induzieren (3.2.4). Die Ausbildung von Tumorspheres war gestört in der Anwesenheit von Berbamin (3.2.3). Eine 2014 durchgeführte Studie brachte vergleichbare Ergebnisse, auch hier wurde durch ein Berbaminderivat die Morphologie der Spheres verändert und Apoptose konnte induziert werden [102]. Als potenzieller Mechanismus wurde angeführt, dass das Berbaminderivat eine Induktion des JNK-c-Jun/AP-1 Signalwegs bewirkt und somit zum programmierten Zelltod führt [102].

Eine neuere Studie zeigt, dass Berbamin ein CaMKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) -Inhibitor ist und die Eigenschaft besitzt, Angiogenese zu blockieren, wobei die beiden Signalwege über VEGF (vascular endothelial growth factor) und BDNF (brain-derived neurotrophic factor) eine entscheidende Rolle spielen [103]. Im Chick-embryo-chorioallantoic-membrane-Modell konnte das Tumorwachstum von U87 inhibiert und eine signifikante Unterdrückung von Neovaskularisation *in vivo* gezeigt werden [103]. Die gleiche Forschergruppe konnte mehrere NK1R (neurokinin 1 receptor) -blockierende Substanzen identifizieren, die gemeinsam mit CaMKII-Inhibitoren wie u.a. Berbamin zu einer signifikanten Reduktion von Tumorzellüberleben und einer Unterdrückung von Sphere-Bildung in U87 und U373 führen [104].

Auf die Verwendung von Berbamin für die weiteren Experimente mit 5-ALA und der Bestrahlungskammer wurde aus Zeitgründen verzichtet, da Shikonin mit seinen ABCG2-inhibierenden Eigenschaften als vielversprechendere Substanz bewertet wurde. Auch hier wäre eine weiterführende Forschungsarbeit sinnvoll, um eventuelle Auswirkungen von Berbamin auf die PDT zu entdecken.

## 4.2 Phytochemikalien in Kombination mit Temozolomid

Es konnte gezeigt werden, dass Shikonin die Effekte von TMZ verstärken kann, insbesondere in der Unterdrückung von Proliferation (3.2.2) und in der Induktion von Apoptose (3.2.4). Aber auch in der Unterdrückung der Sphere-Bildung war ein verstärkter Effekt bei der Kombination beider Substanzen zu erkennen (3.2.3). Ähnliches bestätigte sich auch in anderen Studien, in denen die Kombination aus Shikonin und der für den Tumor etablierte Chemotherapie untersucht wurde: Im Lungenkarzinom konnte beispielsweise eine Wirkungsverstärkung von Adriamycin auf A549 Zellen durch Shikonin gezeigt werden [42]. Ein ebensolcher Effekt ließ sich auch im Prostatakarzinom nachweisen, wo Shikonin eine Zunahme der Effektivität von Cabazitaxel bewirken konnte [25]. Im Glioblastom wurde eine Reduktion von Tumorwachstum, -migration und glial-mesenchymaler Transition gefunden, bewirkt durch die gemeinsame Anwendung von TMZ und Shikonin [105].

Ziel der Arbeit war es auch herauszufinden, ob Shikonin oder Berbamin zu einer Durchbrechung der TMZ-Resistenz der Stammzellen führen kann. Dazu wurden erfolgreich drei resistente Zelllinien (rU87, rGB14 und rU251) herangezogen und validiert (3.1). Die eigentliche Fragestellung konnte anschließend jedoch nicht hinreichend geklärt werden. Die Versuchsreihe, welche die Zellvitalität in Abhängigkeit steigender TMZ-Konzentrationen in Koinkubation mit Shikonin misst, lieferte keine auswertbaren Ergebnisse (3.2.5).

Eine 2023 durchgeführte Forschungsarbeit in unserem Labor untersuchte den Einfluss von 5-ALA-PDT auf die TMZ-resistenten Zellreihen rU87 und rGB14. Zunächst konnte gezeigt werden, dass sowohl rU87 und rGB14 ein insgesamt niedrigeres Apoptose-Verhalten bei steigenden TMZ-Konzentrationen zeigten als ihre Ursprungszellreihen U87 und GB14. Im Hinblick auf die Effektivität der 5-ALA-PDT zeichnete sich allerdings kein eindeutiges Bild ab. Bei rU87 und GB14 zeigte sich eine 5-ALA- und licht-dosis-abhängige Abnahme der Zellvitalität nach Bestrahlung. Bei U87 und rGB14 stellte sich jedoch kein solcher Effekt ein. Eine durchgeführte PCR zum MGMT-Methylierungsstatus zeigte interessanterweise, dass U87 MGMT-methyliert ist, während rU87 unmethyliert ist. GB14 und rGB14 waren beide unmethyliert. MGMT-Methylierung ist mit einem besseren Ansprechen auf TMZ assoziiert. [106]

Die neu etablierten resistenten Zelllinien rU87, rGB14 und rU251 sind kryokonserviert und können weiter für zukünftige Forschungsarbeiten verwendet werden.

## 4.3 Shikonin in Kombination mit 5-ALA und PDT

Bei gemeinsamer Inkubation von 5-ALA und Shikonin konnte mittels Fluorometrie eine gesteigerte Fluoreszenz der Zellen gemessen werden (3.3.1). Allerdings zeigt Shikonin selbst Fluoreszenz [34]

und so konnten die PpIX- und die Shikoninfluoreszenz nicht getrennt voneinander gemessen werden. Dies ging erst durch den Ansatz der Subtraktion der Kontrollgruppen in der Durchflusszytometrie, welche eine nicht-signifikante Erhöhung der intrazellulären PpIX-Konzentration ergab (3.3.2). Obwohl Ko143 einen deutlicheren Effekt erzielte, kann man bei den vorliegenden Ergebnissen zumindest auf eine PpIX-modulierende Wirkung von Shikonin schließen. Eine 2018 durchgeführte Studie zeigte, dass stammzellartige Zellen zwar durchaus mehr PpIX produzieren als differenzierte Zellen, gleichzeitig aber auch effektivere Ausschleusungsprozesse besitzen [107]. Daraus lässt sich ableiten, dass auf zellulärer Ebene die photodynamische Therapie noch Optimierungsmöglichkeiten aufweist.

Die durchgeführten Experimente in der Bestrahlungskammer konnten jedoch nicht ausreichend beantworten, ob Shikonin in Kombination mit TMZ und/oder PDT zu einer Reduktion von Zellüberleben und Proliferation führt oder Apoptose induzieren kann (3.4.2 - 3.4.4). Hierzu ist zu sagen, dass wahrscheinlich durch die Vielzahl an Schritten, die diese Experimente erforderten, die Fehleranfälligkeit und die Streuung der Werte sehr hoch waren. Bereits in den Vorversuchen zur Ermittlung der Bestrahlungsbedingungen (3.4.1) war die Reproduzierbarkeit der Werte mit Schwierigkeiten verbunden, eventuell würde eine andere oder eine angepasste Methodik interpretierbare Ergebnisse liefern.

Auf mRNA-Ebene ließ sich in den oben aufgeführten Experimenten (3.5.2) ermitteln, dass eine kombinierte Therapie aus Shikonin und PDT zu einer Erhöhung des Tumorsuppressors *NF-1* führte. *NF-1* ist eines der stark mutierten Gene im GBM [108, 109], wobei eine Reduktion der *NF-1*-Expression zu verstärkter Zellerneuerung, Invasion und Tumorentstehung führt [110]. Eine entscheidende Rolle könnte hier auch der Transkriptionsfaktor *FOSL1* spielen, über dessen Regulation *NF-1* zu höherer Tumoraggressivität und mesenchymaler Plastizität führt [111]. Im Gegensatz dazu führt eine höhere *NF-1*-Expression zu weniger *FOSL1* und somit die Stammzeleigenschaften in den betreffenden Zellen reduziert [111]. Ob Shikonin nun spezifische anti-Stammzeleigenschaften besitzt und ob es der Dedifferenzierung von Tumorzellen entgegenwirken kann, sollte in weiteren Experimenten überprüft werden, nach Möglichkeit auch *in vivo*. Shikonin als lipophile Substanz mit geringer Halbwertszeit stellt jedoch eine besondere Herausforderung für *in vivo* Experimente dar. Eine neuere Veröffentlichung berichtete von der Entwicklung Lactoferrin-funktionalisierter PEG-PLGA Nanopartikeln, die höhere Shikoninkonzentrationen im Gehirn, eine bessere Penetration der Blut-Hirn-Schranke und somit bessere *in vivo* Experimente ermöglichen [112]. Dieser Ansatz scheint vielversprechend und sollte weiterverfolgt werden.

## 4.4 Konklusion

Die Hypothesen dieser Arbeit konnten in Teilen bestätigt werden. Shikonin und Berbamin zeigten Anti-Tumor-Effekte *in vitro* und zeigten sich wirkungsvoll gegen die Ausbildung und das Wachstum von Tumorstammzellen. In Kombination mit TMZ ließen sich wirkungsvollere Effekte erzielen. Eine Durchbrechung der TMZ-Resistenz in den neu gezüchteten resistenten Zelllinien ließ sich nicht ausreichend darstellen. Die Kombination von Shikonin und PDT lieferten ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse. Es kann zwar von einer PpIX-modulierenden Wirkung von Shikonin ausgegangen werden, eine signifikante Zunahme der Apoptose nach PDT ließ sich jedoch nicht reproduzieren. In der

Analyse der mRNA-Marker ergaben sich Anhaltspunkte, dass NF-1 eine interessante Rolle in diesem Prozess spielen könnte, da es nach der kombinierten Behandlung mit Shikonin und PDT signifikant höher exprimiert wurde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können den bisherigen Stand der Forschung gut ergänzen. Es sollten weiterführende Versuchsansätze geplant und durchgeführt werden, um die vielversprechende photodynamische Therapie am Glioblastom weiter zu optimieren.

## Literaturverzeichnis

1. Tan, A.C., et al., *Management of glioblastoma: State of the art and future directions*. CA Cancer J Clin, 2020. **70**(4): p. 299-312.
2. Davis, M.E., *Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment*. Clin J Oncol Nurs, 2016. **20**(5 Suppl): p. S2-8.
3. McGirt, M.J., et al., *MRI-guided stereotactic biopsy in the diagnosis of glioma: comparison of biopsy and surgical resection specimen*. Surg Neurol, 2003. **59**(4): p. 277-81; discussion 281-2.
4. Louis, D.N., et al., *The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Neuro Oncol, 2021. **23**(8): p. 1231-1251.
5. Gritsch, S., T.T. Batchelor, and L.N. Gonzalez Castro, *Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system*. Cancer, 2022. **128**(1): p. 47-58.
6. 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.
7. Wilson, T.A., M.A. Karajannis, and D.H. Harter, *Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics*. Surg Neurol Int, 2014. **5**: p. 64.
8. Behling, F., et al., *Complete and Incomplete Resection for Progressive Glioblastoma Prolongs Post-Progression Survival*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 755430.
9. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
10. Stepp, H. and W. Stummer, *5-ALA in the management of malignant glioma*. Lasers Surg Med, 2018. **50**(5): p. 399-419.
11. Stupp, R. and D.C. Weber, *The role of radio- and chemotherapy in glioblastoma*. Onkologie, 2005. **28**(6-7): p. 315-7.
12. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013*. Neuro Oncol, 2016. **18**(suppl\_5): p. v1-v75.
13. Witthayanuwat, S., et al., *Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme*. Asian Pac J Cancer Prev, 2018. **19**(9): p. 2613-2617.
14. Kanderi, T. and V. Gupta, *Glioblastoma Multiforme*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
15. Bonavia, R., et al., *Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network*. Cancer Res, 2011. **71**(12): p. 4055-60.
16. Meacham, C.E. and S.J. Morrison, *Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 328-37.
17. Keyvani-Ghamsari, S., et al., *Current understanding of epigenetics mechanism as a novel target in reducing cancer stem cells resistance*. Clin Epigenetics, 2021. **13**(1): p. 120.
18. Iranmanesh, Y., et al., *Mitochondria's Role in the Maintenance of Cancer Stem Cells in Glioblastoma*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 582694.
19. Biserova, K., et al., *Cancer Stem Cells: Significance in Origin, Pathogenesis and Treatment of Glioblastoma*. Cells, 2021. **10**(3).
20. Dean, M., *Cancer stem cells: Implications for cancer causation and therapy resistance*. Discov Med, 2005. **5**(27): p. 278-82.
21. Aghajani, M., et al., *New emerging roles of CD133 in cancer stem cell: Signaling pathway and miRNA regulation*. J Cell Physiol, 2019. **234**(12): p. 21642-21661.
22. Senbanjo, L.T. and M.A. Chellaiah, *CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells*. Front Cell Dev Biol, 2017. **5**: p. 18.

23. Wen, Z.P., et al., *Knockdown ATG4C inhibits gliomas progression and promotes temozolomide chemosensitivity by suppressing autophagic flux*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 298.
24. Toda, Y., et al., *DJ-1 Contributes to Self-renewal of Stem Cells in the U87-MG Glioblastoma Cell Line*. Anticancer Res, 2019. **39**(11): p. 5983-5990.
25. Wang, L., et al., *Shikonin enhances the antitumor effect of cabazitaxel in prostate cancer stem cells and reverses cabazitaxel resistance by inhibiting ABCG2 and ALDH3A1*. Am J Cancer Res, 2020. **10**(11): p. 3784-3800.
26. Boswell-Casteel, R.C., Y. Fukuda, and J.D. Schuetz, *ABCB6, an ABC Transporter Impacting Drug Response and Disease*. AAPS J, 2017. **20**(1): p. 8.
27. Scheer, M., et al., *Neurofibromatosis Type 1 Gene Alterations Define Specific Features of a Subset of Glioblastomas*. Int J Mol Sci, 2021. **23**(1).
28. Najafi, M., B. Farhood, and K. Mortezaee, *Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy*. J Cell Physiol, 2019. **234**(6): p. 8381-8395.
29. Ludwig, K. and H.I. Kornblum, *Molecular markers in glioma*. J Neurooncol, 2017. **134**(3): p. 505-512.
30. Sessions, D.T. and D.F. Kashatus, *Mitochondrial dynamics in cancer stem cells*. Cell Mol Life Sci, 2021. **78**(8): p. 3803-3816.
31. Leonov, A., et al., *Longevity extension by phytochemicals*. Molecules, 2015. **20**(4): p. 6544-72.
32. Hong, M., et al., *Cancer Stem Cells: The Potential Targets of Chinese Medicines and Their Active Compounds*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(6).
33. Wang, Y., et al., *Review on Research about Traditional Chinese Medicine in Cancer Stem Cell*. Evid Based Complement Alternat Med, 2017. **2017**: p. 4505194.
34. Zhu, X., et al., *Identification and localization of bioactive naphthoquinones in the roots and rhizosphere of Paterson's curse (Echium plantagineum), a noxious invader*. J Exp Bot, 2016. **67**(12): p. 3777-88.
35. Andujar, I., et al., *Pharmacological properties of shikonin - a review of literature since 2002*. Planta Med, 2013. **79**(18): p. 1685-97.
36. Singh, B., et al., *Anti-inflammatory activity of shikonin derivatives from Arnebia hispidissima*. Phytomedicine, 2003. **10**(5): p. 375-80.
37. Andujar, I., et al., *Beneficial effect of shikonin on experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in BALB/c mice*. Evid Based Complement Alternat Med, 2012. **2012**: p. 271606.
38. Zhang, X., et al., *Advance in Anti-tumor Mechanisms of Shikonin, Alkannin and their Derivatives*. Mini Rev Med Chem, 2018. **18**(2): p. 164-172.
39. Jia, L., et al., *Shikonin inhibits proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis in NCI-N87 cells via inhibition of PI3K/AKT signal pathway*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019. **47**(1): p. 2662-2669.
40. Bao, C., et al., *Shikonin inhibits migration and invasion of triple-negative breast cancer cells by suppressing epithelial-mesenchymal transition via miR-17-5p/PTEN/Akt pathway*. J Cancer, 2021. **12**(1): p. 76-88.
41. Zhao, Q., et al., *Shikonin and its derivatives inhibit the epidermal growth factor receptor signaling and synergistically kill glioblastoma cells in combination with erlotinib*. Int J Cancer, 2015. **137**(6): p. 1446-56.
42. Liu, X. and G. Sun, *Shikonin enhances Adriamycin antitumor effects by inhibiting efflux pumps in A549 cells*. Oncol Lett, 2017. **14**(4): p. 4270-4276.
43. Farooqi, A.A., et al., *Regulation of Cell-Signaling Pathways by Berbamine in Different Cancers*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(5).
44. Zarei, A., et al., *A quick overview on some aspects of endocrinological and therapeutic effects of Berberis vulgaris L.* Avicenna J Phytomed, 2015. **5**(6): p. 485-97.



45. Liu, L., et al., *Proliferation, migration and invasion of triple negative breast cancer cells are suppressed by berbamine via the PI3K/Akt/MDM2/p53 and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways*. Oncol Lett, 2021. **21**(1): p. 70.
46. Liu, L., et al., *Berbamine Inhibits Cell Proliferation and Migration and Induces Cell Death of Lung Cancer Cells via Regulating c-Maf, PI3K/Akt, and MDM2-P53 Pathways*. Evid Based Complement Alternat Med, 2021. **2021**: p. 5517143.
47. Wang, L., et al., *Berbamine targets cancer stem cells and reverses cabazitaxel resistance via inhibiting IGF2BP1 and p-STAT3 in prostate cancer*. Prostate, 2024. **84**(2): p. 131-147.
48. Yu, B.B., et al., *Effect of berbamine on invasion and metastasis of human liver cancer SMMC-7721 cells and its possible mechanism*. Anticancer Drugs, 2022. **33**(1): p. e178-e185.
49. Zhang, H., et al., *Berbamine suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in ovarian cancer partially via the inhibition of Wnt/beta-catenin signaling*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018. **50**(6): p. 532-539.
50. Zhang, H., et al., *Berbamine suppresses cell viability and induces apoptosis in colorectal cancer via activating p53-dependent apoptotic signaling pathway*. Cytotechnology, 2018. **70**(1): p. 321-329.
51. Han, C., et al., *Berbamine Suppresses the Progression of Bladder Cancer by Modulating the ROS/NF-kappaB Axis*. Oxid Med Cell Longev, 2021. **2021**: p. 8851763.
52. Kessel, D., *Photodynamic Therapy: A Brief History*. J Clin Med, 2019. **8**(10).
53. Rkein, A.M. and D.M. Ozog, *Photodynamic therapy*. Dermatol Clin, 2014. **32**(3): p. 415-25, x.
54. 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.
55. Dougherty, T.J., et al., *Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors*. Cancer Res, 1978. **38**(8): p. 2628-35.
56. Dougherty, T.J., et al., *Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1979. **62**(2): p. 231-7.
57. Akimoto, J., *Photodynamic Therapy for Malignant Brain Tumors*. Neurol Med Chir (Tokyo), 2016. **56**(4): p. 151-7.
58. Cramer, S.W. and C.C. Chen, *Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioblastoma*. Front Surg, 2019. **6**: p. 81.
59. Ortel, B., C.R. Shea, and P. Calzavara-Pinton, *Molecular mechanisms of photodynamic therapy*. Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**: p. 4157-72.
60. Silva, Z.S., Jr., et al., *Animal models for photodynamic therapy (PDT)*. Biosci Rep, 2015. **35**(6).
61. Kiening, M. and N. Lange, *A Recap of Heme Metabolism towards Understanding Protoporphyrin IX Selectivity in Cancer Cells*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(14).
62. Valentine, R., *Biophysical Aspects of Photodynamic Therapy*. 2011, University of St. Andrews: Physics & Astronomy Theses. p. 203.
63. Soret, J.-L., *Analyse spectrale: Sur le spectre d'absorption du sang dans la partie violette et ultra-violette*. Compt. Rend, 1883. **97** p. 1269-1270.
64. Myrzakhmetov, B., et al., *Photophysical Properties of Protoporphyrin IX, Pyropheophorbide-a and Photofrin((R)) in Different Conditions*. Pharmaceuticals (Basel), 2021. **14**(2).
65. Galiakhmetova, D., et al., *Ultra-Short Laser Pulses Propagation Through Mouse Head Tissues: Experimental and Computational Study*. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2022: p. 1.
66. Aumiller, M., et al., *Interrelation between Spectral Online Monitoring and Postoperative T1-Weighted MRI in Interstitial Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas*. Cancers (Basel), 2021. **14**(1).

67. Zaak, D., et al., *Diagnosis of urothelial carcinoma of the bladder using fluorescence endoscopy*. BJU Int, 2005. **96**(2): p. 217-22.
68. Bahng, S., et al., *Photodynamic therapy for bile duct invasion of hepatocellular carcinoma*. Photochem Photobiol Sci, 2013. **12**(3): p. 439-45.
69. Lee, T.Y., Y.K. Cheon, and C.S. Shim, *Current status of photodynamic therapy for bile duct cancer*. Clin Endosc, 2013. **46**(1): p. 38-44.
70. Lee, C.N., et al., *Daylight Photodynamic Therapy: An Update*. Molecules, 2020. **25**(21).
71. Griffin, L.L. and J.T. Lear, *Photodynamic Therapy and Non-Melanoma Skin Cancer*. Cancers (Basel), 2016. **8**(10).
72. Naidoo, C., C.A. Kruger, and H. Abrahamse, *Photodynamic Therapy for Metastatic Melanoma Treatment: A Review*. Technol Cancer Res Treat, 2018. **17**: p. 1533033818791795.
73. Naidoo, C., C.A. Kruger, and H. Abrahamse, *Simultaneous Photodiagnosis and Photodynamic Treatment of Metastatic Melanoma*. Molecules, 2019. **24**(17).
74. Akhtar, F. and A.U. Khan, *Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) against vancomycin resistant Staphylococcus aureus (VRSA) biofilm disruption: a putative role of phagocytosis in infection control*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2021: p. 102552.
75. Akhtar, F., et al., *Antimicrobial and antibiofilm photodynamic therapy against vancomycin resistant Staphylococcus aureus (VRSA) induced infection in vitro and in vivo*. Eur J Pharm Biopharm, 2021. **160**: p. 65-76.
76. Fu, X.J., Y. Fang, and M. Yao, *Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 159157.
77. Mahmoudi, K., et al., *5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas*. J Neurooncol, 2019. **141**(3): p. 595-607.
78. 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.
79. 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.
80. Stepp, H., *Persönliche Kommunikation*. 23.01.2023.
81. Quach, S., et al., *Interstitial photodynamic therapy for newly diagnosed glioblastoma*. J Neurooncol, 2023. **162**(1): p. 217-223.
82. Lietke, S., et al., *Interstitial Photodynamic Therapy Using 5-ALA for Malignant Glioma Recurrences*. Cancers, 2021. **13**(8): p. 1767.
83. Seystahl, K., W. Wick, and M. Weller, *Therapeutic options in recurrent glioblastoma--An update*. Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **99**: p. 389-408.
84. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.
85. Promega. *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay, Instructions for Use of Products G8080, G8081 and G8082*. 2023 [cited 2024 13.12.24]; Technical Bulletin]. Available from: <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol.pdf?rev=3313091698e544ceaa6fff843658eb84&la=en>.
86. Promega. *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Instructions for Use of Products G3580, G3581 and G3582*. 2023 [cited 2024 13.12.24]; Technical Bulletin]. Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf>.
87. Knappe, A., et al., *[Computer-controlled laser irradiation unit for studies of light-induced processes in cell cultures]*. Biomed Tech (Berl), 1995. **40**(10): p. 272-5.
88. Muller, P., et al., *ABCG2 influence on the efficiency of photodynamic therapy in glioblastoma cells*. J Photochem Photobiol B, 2020. **210**: p. 111963.

89. Schmid, I., et al., *Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry*. Cytometry, 1992. **13**(2): p. 204-8.
90. QIAGEN. *RNeasy® Mini Handbook*. 2023 [cited 2024 13.12.24]; Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=f646813a-efbb-4672-9ae3-e665b3045b2b&lang=en>.
91. QIAGEN. *Quick-Start Protocol, QuantiTect® Reverse Transcription Kit*. 2016 [cited 2024 13.12.24]; Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=a7889bfb-cb1b-4e23-a538-9e4f20fdca91&lang=en>.
92. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
93. Ye, J., et al., *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 134.
94. Chen, Y., et al., *DJ-1, a novel biomarker and a selected target gene for overcoming chemoresistance in pancreatic cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2012. **138**(9): p. 1463-74.
95. Dekanat, L.M. *LEITFADEN FÜR KORREKTES ZITIEREN BEI DISSERTATIONEN*. 2020 20.05.2025 [cited 2025 20.05.2025]; Available from: <https://cms-cdn.lmu.de/media/07-medizin/fakultaet-medizin/mmrs/mmrs-downloads/leitfaden-zitieren.pdf>.
96. Werner, M., et al., *The role of Shikonin in improving 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy and chemotherapy on glioblastoma stem cells*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2022. **39**: p. 102987.
97. Cui, J., et al., *Natural products targeting cancer stem cells: a revisit*. Curr Med Chem, 2021.
98. Zhang, F.L., et al., *Topoisomerase I inhibitors, shikonin and topotecan, inhibit growth and induce apoptosis of glioma cells and glioma stem cells*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e81815.
99. Liu, J., et al., *Enhanced antitumor effect of shikonin by inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress via JNK/c-Jun pathway in human glioblastoma stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **466**(1): p. 103-10.
100. Wang, Q., et al., *Molecular mechanism of shikonin inhibiting tumor growth and potential application in cancer treatment*. Toxicol Res (Camb), 2021. **10**(6): p. 1077-1084.
101. Zhang, F.Y., et al., *Shikonin Inhibits the Migration and Invasion of Human Glioblastoma Cells by Targeting Phosphorylated beta-Catenin and Phosphorylated PI3K/Akt: A Potential Mechanism for the Anti-Glioma Efficacy of a Traditional Chinese Herbal Medicine*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(10): p. 23823-48.
102. Yang, F., et al., *A novel berbamine derivative inhibits cell viability and induces apoptosis in cancer stem-like cells of human glioblastoma, via up-regulation of miRNA-4284 and JNK/AP-1 signaling*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94443.
103. Kim, Y.J., J.M. Han, and H.J. Jung, *Antiangiogenic and antitumor potential of berbamine, a natural CaMKIIgamma inhibitor, against glioblastoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2021. **566**: p. 129-134.
104. Han, J.M., Y.J. Kim, and H.J. Jung, *Discovery of a New CaMKII-Targeted Synthetic Lethal Therapy against Glioblastoma Stem-like Cells*. Cancers (Basel), 2022. **14**(5).
105. Matias, D., et al., *Dual treatment with shikonin and temozolomide reduces glioblastoma tumor growth, migration and glial-to-mesenchymal transition*. Cell Oncol (Dordr), 2017. **40**(3): p. 247-261.
106. Scherer, H., *Evaluation of the Effects of 5-Aminolevulinic Acid mediated Photodynamic Therapy on Temozolomide Resistant Glioblastoma Cells*, in *LIFE-Zentrum, Fraunhoferstraße 20, 82152 Planegg/Martinsried*. 2023, Hochschule Furtwangen University. p. 85.
107. 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.

108. Zhu, Y. and L.F. Parada, *Neurofibromin, a tumor suppressor in the nervous system*. Exp Cell Res, 2001. **264**(1): p. 19-28.
109. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
110. Fadhlullah, S.F.B., et al., *Pathogenic mutations in neurofibromin identifies a leucine-rich domain regulating glioma cell invasiveness*. Oncogene, 2019. **38**(27): p. 5367-5380.
111. Marques, C., et al., *NF1 regulates mesenchymal glioblastoma plasticity and aggressiveness through the AP-1 transcription factor FOSL1*. Elife, 2021. **10**.
112. Li, H., et al., *Lactoferrin functionalized PEG-PLGA nanoparticles of shikonin for brain targeting therapy of glioma*. Int J Biol Macromol, 2018. **107**(Pt A): p. 204-211.

## Danksagung

Mein Dank gilt all jenen, die mir in diesem Projekt zur Seite gestanden haben und mir gezeigt haben, dass Forschungsarbeit nicht immer einfach und planbar verläuft. Besonders zu nennen sind meine Betreuer PD Dr. Heike Pohla und Dr. Herbert Stepp, sowie Prof. Dr. Ronald Sroka und Prof. Dr. Alexander Buchner. Danke für den kurzen Weg, die offenen Türen und die Möglichkeit jederzeit mit Fragen an euch herantreten zu können. Danke auch für die schnellen, ausführlichen und sehr hilfreichen Korrekturen. Gleiches gilt für das restliche Team im LIFE-Zentrum, insbesondere Dr. Adrian Rühm, Thomas Pongratz und Kornelia Eberle.

Bedanken möchte ich mich explizit auch bei Birgit Stadlbauer, die mich in die Zellkultur und alle technischen Geräte exzellent eingewiesen hat. Ebenso sind zu nennen meine Mitdoktorandinnen Lili Wang, Chen Lyu und Isabel Schrader, die mir nicht nur Gesellschaft, sondern auch immer eine Unterstützung waren.

Danke auch an die Doktoranden und Studenten aus der Physik, die mein Projekt immer mit ehrlichem Interesse verfolgt haben und mir die ein oder andere Anregung zu meiner Forschung geliefert haben. Zu nennen sind hier Maximilian Aumiller, Christian Heckl und Asmerom Arazar.

Auch mein privates Umfeld war sehr unterstützend, mir wurde zugehört und Mut zugesprochen, wenn ich wieder neuen Schwung holen musste. Danke an meinen Vater Thomas, meine Mutter Ines, meine Schwester Hannah und an meine Freundin Friederike.

Mein Dank gilt auch dem FöFoLe-Stipendiatenprogramm des LMU Klinikums München, insbesondere Prof. Dr. Thomas Gudermann und Petra Kleucker. Danke für die Organisation, die finanzielle Förderung und die Möglichkeiten zum wissenschaftlichen Austausch unter den Promovierenden trotz der anhaltenden Covid-19-Pandemie. Diese Arbeit wurde in Teilen durch das FöFoLe-Programm der LMU München finanziert (Förderung Nr. 36/2019).

# Affidavit



## Eidesstattliche Versicherung

Werner, Maxim

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Der Einfluss von Shikonin und Berbamin auf Glioblastomstammzellen in Kombination mit photodynamischer Therapie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 14.01.2026

Ort, Datum

Maxim Werner

Unterschrift Maxim Werner

## Erklärung der Übereinstimmung



### Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Werner, Maxim

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Der Einfluss von Shikonin und Berbamin auf Glioblastomstammzellen in Kombination mit photodynamischer Therapie**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 14.01.2026

Ort, Datum

Maxim Werner

Unterschrift Maxim Werner

## Publikationsliste

### Schriftliche Veröffentlichungen:

- Werner, Maxim et al. "The role of Shikonin in improving 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy and chemotherapy on glioblastoma stem cells." *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, vol. 39 102987. 26 Jun. 2022, doi:10.1016/j.pdpdt.2022.102987

### Vorträge von Maxim Werner:

- 29.06.2022: "The role of shikonin in improving 5-ALA-PDT and chemotherapy on glioblastoma stem cells." (AST-URO-LIFE Doktorandenseminar, online)
- 21.07.2021: "Shikonin might be an effective agent in the treatment of glioblastoma stemcells - Results" (LTI-Seminar, Planegg)
- 16.06.2021: "Shikonin might be an effective agent in the treatment of glioblastoma stemcells - Results" (IoP-LIFE Sino-German Workshop "Photobiology & Skin Disease", online)
- 17.04.2021: „Der Einfluss von Shikonin auf Glioblastom-Stammzellen in Kombination mit photodynamischer Therapie“ (FöFoLe-Statusseminar, online)
- 25.02.2021: "The influence of shikonin and berbamine on glioblastoma stem cells in combination with photodynamic therapy – Present results" (URO-LIFE Doktorandenseminar, Planegg)
- 24.02.2021: "The influence of shikonin and berbamine on glioblastoma stem cells in combination with photodynamic therapy – Present results" (LTI-Seminar, Planegg)
- 23.11.2020: „In-vitro investigations on the potential impact of phyto-agents for PDT - Hypothesis, Methods, Preliminary results" (LMU-ChAN, online)
- 14.10.2020: "The influence of shikonin and berbamine on glioblastoma stem cells in combination with photodynamic therapy – Present results" (LTI-Seminar, Planegg)
- 11.03.2020: „The influence of Berbamin and Shikonin on glioblastoma-stemcells in combination with photodynamic therapy" (LTI-Seminar, Planegg)