

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neue Ansätze zur Photodynamischen Therapie von gastrointestinalen
Tumoren

Novel Approaches for Photodynamic Therapy of Gastrointestinal
Tumors

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Till Jacob Valentin Schmidt

aus Friedberg

Datum der Promotion: 18.12.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abstract.....	6
Abstrakt	8
Manteltext	10
1. Vorbemerkung.....	10
2. Einleitung.....	10
2.1. Die photodynamische Therapie von Cholangio- und Ösophaguskarzinomen	11
2.2. Das Prinzip der photodynamischen Therapie.....	13
2.3. Photosensibilisatoren	14
2.4. Zielsetzung	16
3. Material und Methoden.....	17
3.1. Verbindungen.....	17
3.2. Zelllinien.....	17
3.3. Lichtquelle und photodynamische Therapie	18
3.4. Untersuchung zugrundeliegender Wirkmechanismen der ZnPc- und Pc32-PDT <i>in vitro</i>	18
3.5. Untersuchung antiangiogener und antitumoraler Effekte der ZnPc-PDT <i>in vivo</i>	21
3.6. Statistik	22
4. Ergebnisse	23
4.1. Zelluläre Aufnahme von ZnPc und Pc32	23
4.2. Antiproliferative Effekte bei Cholangio- und Ösophagus-karzinomzellen.....	24
4.3. ZnPc- und Pc32-PDT induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	30
4.4. Zytotoxische Effekte nach ZnPc- und Pc32-PDT.....	32
4.5. Apoptoseinduktion durch ZnPc-PDT	33
4.6. Zellzyklusinhibition durch ZnPc-PDT.....	36
4.7. Antineoplastische Effekt der PDT mit ZnPc <i>in vivo</i>	38
4.8. Effekte der ZnPc- und Pc32-PDT auf die Vaskularisierung und Neoangiogenese <i>in vivo</i> ...	39
5. Diskussion.....	40

6. Conclusio	54
7. Referenzen	55
Eidesstattliche Versicherung.....	61
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	62
Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge SM).....	63
Publikationsliste	65
Druckexemplar der Originalpublikation 1.....	66
Druckexemplar der Originalpublikation 2.....	78
Lebenslauf.....	88
Danksagung	88

Abkürzungsverzeichnis

ALA	5-Aminolevulinsäure
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CAM	Chorioallantoismembran
CC	Cholangiokarzinom
CRT	Chemoradiotherapie
DPBF	1,3-diphenylisobenzofuran
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ERK $\frac{1}{2}$	Extracellular signal-regulated kinases $\frac{1}{2}$
EthD-1	Ethidium Homodimer-1
EC	Ösophaguskarzinom
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
FKS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
LDH	Laktatdehydrogenase
NaCl	Natriumchlorid
HCC	hepatozelluläres Karzinom
ISC	Interkombination (Englisch: intersystem crossing)
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
$^3\text{O}_2$	Triplettsauerstoff
Pc	Phthalocyanin
PDT	photodynamische Therapie

PS	Photosensibilisator
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
S ₀	Grundenergiezustand
S ₁	angehobener Energiezustand
S ₂	zweiter angehobener Energiezustand
T ₁	Triplettzustand des Photosensibilisators
ZnPc	Zinkphthalocyanin
ZnPcS2P2	disulfoiertes Diphthalimidomethyl-Zinkphthalocyanin
Pc32	Siliziumphthalocyanin

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a versatile and minimally invasive therapy option for the treatment of malignant tumors such as gastrointestinal cholangiocarcinoma and esophageal carcinoma. Despite promising studies, PDT is rarely used in the treatment of these tumours, which is amongst other things due to the disadvantages of the previously clinically used photosensitizers. In this work two phthalocyanines, tetra-triethyleneoxysulfanyl-substituted zinc phthalocyanine (ZnPc) and tetra-triethyleneoxysulfanyl-substituted dihydroxy silicon phthalocyanine (Pc32) were evaluated as new photosensitizers for PDT of cholangio- and esophageal carcinoma.

In vitro experiments were performed to decipher the molecular mechanisms of action of the novel phthalocyanines. Intracellular uptake and accumulation, dark toxicity, growth inhibition, cytotoxic effects and formation of reactive oxygen species (ROS) after ZnPc- and Pc32-PDT were investigated in two cholangiocarcinoma cell lines (EGI-1, TFK-1). In addition, the effect of ZnPc-PDT on apoptosis and cell cycle distribution in the cholangiocarcinoma cells was determined. ZnPc-experiments on uptake, ROS-formation and proliferation were also performed in two esophageal carcinoma cell lines (Kyse-140, OE-33). Chorio allantoic membrane assays focused on darktoxicity, antitumoral effects in esophageal carcinoma and anti-angiogenic effects of the ZnPc-PDT *in vivo*.

Both photosensitizers accumulated predominantly in the cytoplasm. None of them was toxic without photoactivation and did thus not exhibit dark toxicity. After PDT, cytoplasmic and mitochondrial/nuclear ROS formation was observed. ZnPc-PDT induced a time- and dose-dependent growth inhibition of >90% *in vitro*. Moreover, ZnPc-PDT led to intrinsic/mitochondrial apoptosis. EGI-1 cells showed a G₀/G₁-phase arrest after ZnPc-PDT, while TFK-1 cells revealed a G₂/M phase arrest. Absence of dark toxicity of ZnPc was confirmed *in vivo*. After ZnPc-PDT, esophageal tumor volume was reduced by >70% compared to control. ZnPc-PDT induced a sustained anti-angiogenic effect. Pc32-PDT showed a sustained antiproliferative effect of >80% only in EGI-1 cells, but did not show comparable effectiveness in TFK-1 cells. ROS-formation, direct cytotoxic and antiproliferative effects were also more pronounced after ZnPc-PDT. Moreover, Pc32-PDT showed no significant anti-angiogenic effect.

ZnPc appears to be a promising photosensitizer for the PDT of the cholangio- and esophageal carcinoma due to its advantageous efficacy profile. EGI-1 cells showed a more sensitive reaction to ZnPc- and Pc32-PDT than TFK-1 cells. Kyse-140 cells reacted more sensitively to ZnPc-PDT

than OE-33 cells. The different response of the cell lines illustrates the need for a cell-specific, individual PDT-protocol.

The encouraging results of the study warrant further *in vivo* elucidation of ZnPc as a novel photosensitizer for PDT of cholangio- and esophageal carcinoma, which includes respective animal testing.

Abstrakt

Die photodynamische Therapie (PDT) ist eine vielseitige, minimal-invasive Therapieoption zur Behandlung von malignen Tumoren wie dem gastrointestinalen Cholangio- und Ösophaguskarzinom. Trotz vielversprechender Studien wird die PDT in der Tumorthherapie selten eingesetzt, was zum Teil auf Nachteile der bisher eingesetzten Photosensibilisatoren zurückzuführen ist. In dieser Arbeit wurden zwei Phthalocyanine, tetra-triethylenoxysulfonyl-substituiertes Zink- (ZnPc) und Dihydroxy-Siliziumphthalocyanin (Pc32) als neue Photosensibilisatoren für die PDT des Cholangio- und Ösophaguskarzinoms evaluiert.

In vitro wurden die molekularen Wirkmechanismen der Phthalocyanine untersucht. Dafür wurden die intrazelluläre Aufnahme und Akkumulation, Dunkeltoxizität, Wachstumshemmung, zytotoxische Effekte und Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach ZnPc- und Pc32-PDT in zwei Cholangiokarzinom-Zelllinien (EGI-1, TFK-1) analysiert. Außerdem wurde die Induktion von Apoptose und die Zellzyklusverteilung nach ZnPc-PDT in den Zellen untersucht. ZnPc-Experimente zur Aufnahme, ROS-Bildung und Proliferation wurden in zwei Ösophaguskarzinom-Zelllinien (Kyse-140, OE-33) durchgeführt. Chorioallantoismembran-Assays konzentrierten sich auf die Dunkeltoxizität, die antitumorale Wirkung auf das Ösophaguskarzinom und antiangiogene Effekte der ZnPc-PDT *in vivo*.

ZnPc und Pc32 akkumulierten überwiegend im Zytoplasma und waren ohne Photoaktivierung nicht (dunkel-)toxisch. Nach der PDT mit ZnPc und Pc32 wurde eine zytoplasmatische sowie mitochondriale/nukleare ROS-Entstehung beobachtet. Die ZnPc-PDT induzierte eine zeit- und dosisabhängige Proliferationsinhibition von >90% *in vitro*. Zudem führte die ZnPc-PDT zu intrinsischer/mitochondrialer Apoptose. EGI-1-Zellen zeigten einen G₀/G₁-Zellzyklusarrest und TFK-1-Zellen einen G₂/M-Arrest nach ZnPc-PDT. Die fehlende Dunkeltoxizität von ZnPc wurde *in vivo* bestätigt. Nach ZnPc-PDT wurde das Ösophagustumorvolumen um >70% im Vergleich zur Kontrolle reduziert. ZnPc-PDT induzierte eine anhaltende antiangiogene Wirkung. Die Pc32-PDT offenbarte eine antiproliferative Wirkung von >80% in EGI-1 Zellen, jedoch keine vergleichbare Wirkung in TFK-1 Zellen. ROS-Bildung sowie direkte zytotoxische und antiproliferative Effekte waren nach ZnPc-PDT ebenfalls stärker ausgeprägt. Überdies zeigte Pc32-PDT keine nennenswerte antiangiogene Wirkung.

Insgesamt ergibt sich in ZnPc aufgrund des vorteilhaften Wirkungsprofils ein vielversprechender Photosensibilisator für die PDT des Cholangio- und Ösophaguskarzinoms. EGI-1-Zellen zeigten

eine sensiblere Reaktion auf die ZnPc- und Pc32-PDT als TFK-1-Zellen. Kyse-140 Zellen reagierten empfindlicher auf die ZnPc-PDT als OE-33 Zellen. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit eines zellspezifischen PDT-Protokolls.

Die Ergebnisse der Studie legen damit die weitere *in vivo* Untersuchung von ZnPc als neuen Photosensibilisator für die PDT des Cholangio- und Ösophaguskarzinoms, einschließlich entsprechender Tierversuche, nahe.

Manteltext

1. Vorbemerkung

Diese Dissertation fasst meine Forschungsarbeiten zum Thema „Neue Ansätze zur Photodynamischen Therapie von gastrointestinalen Tumoren - Novel Approaches for Photodynamic Therapy of Gastrointestinal Tumors“ kumulativ als Publikationspromotion zusammen. Die vorliegende Arbeit basiert auf den ausgewählten Originalpublikationen 1 und 2 (siehe: Druckexemplare der Originalpublikation 1 und 2).

2. Einleitung

Trotz sich entwickelnder Therapieoptionen stellt Krebs die zweithäufigste Mortalitätsursache des Menschen dar und ist somit für mehr Todesfälle verantwortlich als AIDS, Tuberkulose und Malaria zusammengenommen (1). Die bisher, je nach Tumorentität, klinisch angewandten Therapiemöglichkeiten erstrecken sich über die chirurgische Exzision, Bestrahlung, Chemotherapie, die Immuntherapie sowie diverse zielgerichtete niedermolekulare Therapien (englisch: small-molecule targeted therapies). Trotz großer Fortschritte in der Entwicklung von Tumortheraeutika und Therapiestrategien ergeben sich vielfältige Probleme und Herausforderungen. Dazu zählen beispielsweise die hohe Intensität und ein breites Spektrum an Nebenwirkungen, Therapieresistenzentwicklungen der Tumorzellen und eine hohe Invasivität vieler Therapien, bei nur geringer Spezifität für das entartete Gewebe. Die photodynamische Therapie (PDT) stellt eine nicht- bis minimalinvasive ablative Therapieoption für verschiedene prämaligene und maligne Erkrankungen dar, welche vielen der therapeutischen Herausforderungen gerecht wird. Die PDT beinhaltet die topische oder systemische Applikation eines Photosensibilisators und die anschließende selektive Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Aus der Wechselwirkung zwischen Licht und photosensibler Verbindung resultiert der Tod der Tumorzellen durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Vorteile sind die geringe Invasivität bei einer fast schmerzfreien Behandlung und einer hohen Tumorselektivität (2). Die PDT geht im Vergleich zu anderen Therapieoptionen mit einer geringen Intensität und Bandbreite an Nebenwirkungen einher. Zudem kann sie mit unterschiedlichen Behandlungsmodalitäten wie Radio- oder Chemotherapie kombiniert werden. Die Behandlung

kann zudem wiederholt werden, da keine Resistenzentwicklung durch die Therapie auftritt (3). Für die PDT ergibt sich insgesamt ein breites Einsatzspektrum, welches nicht nur auf den Bereich der Tumorthherapie begrenzt ist. Neben der Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration oder Infektionen mit antibiotikaresistenten Bakterien findet die PDT ihren Einsatz jedoch vor allem in der Therapie von diversen dermatologischen, urologischen oder gastrointestinalen Tumorentitäten (3,4).

2. 1. Die photodynamische Therapie von Cholangio- und Ösophaguskarzinomen

Nach dem hepatozellulären Karzinom ist das Cholangiokarzinom der zweithäufigste leberassoziierte Tumor. Das Cholangiokarzinom weist eine sehr niedrige 5-Jahres-Überlebensrate von 5-10% auf und stellt ca. 3% aller gastrointestinalen Tumorerkrankungen dar (5). Etwa 60-70% dieser Tumore befinden sich in einem Radius von 2 cm von der Verzweigung des Ductus choledochus entfernt (hiläres Cholangiokarzinom, auch "Klatskintumor" genannt). Weitere 20-30% der Cholangiokarzinome befinden sich in den extrahepatischen und 5-10% in den intrahepatischen Gallewegen (6). Das Cholangiokarzinom wird in den meisten Fällen aufgrund unspezifischer Symptome in einem späten Stadium diagnostiziert, sodass für 70-80% der Patienten eine R0-Resektion als einzige kurative Therapieoption nicht in Frage kommt (5). Radio- und Chemotherapie nehmen in der Palliativbehandlung nur eine begrenzte Rolle ein. Sie wirken nicht lebensverlängernd und mindern häufig sogar die Lebensqualität des Patienten (6). Zur biliären Entlastung und Verhinderung obstruktiver Cholestasen erfolgt nach derzeitigem Therapiestandard die transpapilläre oder perkutane Stentimplantation mit einer medianen Überlebensrate von 4-10 Monaten (6). Um diesen unbefriedigenden Behandlungsmöglichkeiten etwas entgegenzusetzen, müssen neue Therapiestrategien entwickelt werden. Die PDT, welche im Fall des Cholangiokarzinoms via endoskopischer retrograder Cholangiopankreatikographie (ERCP) durchgeführt werden kann, erscheint dabei als eine vielversprechende Kombinationsmöglichkeit zum bisher palliativ eingesetzten biliären Stenting. Ortner *et al.* konnten beispielsweise in einer prospektiven randomisierten Studie einen Anstieg der medianen Überlebensrate von 3,3 (alleinige Stenteinlage) auf 16,4 Monate (Stent-PDT-Kombinationstherapie) erzielen (7). Ein signifikanter Überlebensvorteil sowie die Steigerung der Lebensqualität und eine Reduktion von tumorbedingten Cholestasen konnte durch Moole *et. al.* in ihrer aktuellen systematischen Übersichtsarbeit und Metaanalyse bestätigt werden (6).

Auch für die Behandlung des Ösophaguskarzinoms (EC) kommt die PDT als vielseitige Therapieoption in Frage. Das EC weist eine Inzidenz von etwa 8/100.000 auf und stellt die sechsthäufigste tumorassoziierte Todesursache weltweit dar (8,9). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 15-25 % (8). Dabei tritt das Ösophaguskarzinom in überwiegender Zahl der Fälle entweder als Plattenepithelkarzinom oder Adenokarzinom auf. Während das Plattenepithelkarzinom durch Tabakrauch und Alkohol verursacht wird, ist das Adenokarzinom mit gastroösophagealem Reflux und der Barrett-Metaplasie als prämaligener Vorstufe assoziiert (8). Als kurative Therapieoptionen bestehen die chirurgische Resektion sowie multimodale Behandlungskonzepte mit enthaltener Radio-, Chemotherapie oder endoskopischer Therapie. Dabei ist eine neoadjuvante Chemotherapie mit nachfolgender Ösophagektomie die am häufigsten angewandte kurative Therapiemethode. Eine Chemoradiotherapie (CRT) kommt für Patienten mit dem Wunsch eines Ösophaguserhalts in Frage oder wird zur Palliativtherapie eingesetzt (8). Die PDT stellt eine geeignete Alternative zur chirurgischen oder endoskopischen Resektion von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus dar, welche nicht vollständig resezierbar sind oder bei denen die Patienten aufgrund von Komorbiditäten für eine Operation ausscheiden (2). Als Palliativtherapie kann die PDT zur Auflösung von ösophagealen Obstruktionen und damit verbundener Dysphagie eingesetzt werden. Heier *et al.* sowie Lightdale *et al.* konnten etwa in randomisierten, kontrollierten Studien die Überlegenheit der PDT gegenüber der Nd:YAG-Thermoablation in Bezug auf ein längeres dysphagiefreies Intervall zeigen (10,11). Zudem konnten Lindemann *et al.* in ihrer retrospektiven Analyse einen signifikanten Überlebensvorteil nach PDT als Initialbehandlung in einer multimodalen palliativen Therapie feststellen. Es wurde eine durchschnittliche Überlebenszeit von 17,3 Monaten bei initialem Einsatz von verschiedenen palliativen Therapiemodalitäten (endoskopischer Dilatation, endoluminaler Brachytherapie, externer Bestrahlung, Chemotherapie, Stenting, Ernährungssonden oder palliativer Resektion) ermittelt, während nach PDT als Initialtherapie ein Überleben von 50,9 Monaten erzielt werden konnte (12). Ein weiteres Einsatzgebiet für die PDT des Ösophaguskarzinoms ergibt sich als Salvage-Therapie nach fehlgeschlagener Chemoradiotherapie (13). Die Anwendung der PDT ist jedoch nicht auf den palliativen Bereich beschränkt. In Japan ist die PDT bereits als kurative Therapiemodalität für die frühe, superfizielle Form des Ösophaguskarzinoms etabliert (13). Eine weitere Indikation, vor allem in den USA und Europa, besteht in der kurativen Behandlung der Barrett-Metaplasie (2,13).

Trotz vielseitiger Einsatzmöglichkeiten und guter Studienergebnisse wird die PDT insgesamt nur selten als therapeutisches Verfahren angewandt. Ein wesentliches Hindernis für einen stärker verbreiteten Einsatz der PDT stellen unter anderem Nachteile der eingesetzten Photosensibilisatoren und die auftretenden Nebenwirkungen dar (14).

2. 2. Das Prinzip der photodynamischen Therapie

Die photodynamische Therapie (PDT) basiert auf einer photochemischen Reaktion zwischen einem lichtaktivierbaren Molekül oder Photosensibilisator, Licht im sichtbaren Spektrum und molekularem Sauerstoff. Diese drei Komponenten sind einzeln nicht toxisch, führen aber in ihrer Kombination zu zellzerstörenden Effekten. Der Photosensibilisator wird entweder systemisch oder topisch appliziert, woraufhin dieser vorzugsweise im Tumorgewebe akkumuliert. Die folgende loko-regionäre Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge aktiviert den Photosensibilisator, welcher dabei durch Absorption eines Photons in seinem Energieniveau angehoben wird. In Anwesenheit von Sauerstoff führt eine nachfolgende Reaktionskaskade (siehe Abb. 1.) zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche schließlich über verschiedene molekulare Mechanismen den Untergang der Tumorzelle einleitet (3,15,16).

Im Detail wird der Photosensibilisator durch photophysikalische Anregung aus seinem Grundzustand (S_0) in den angeregten und damit instabilen Energiezustand (S_1) angehoben. Im Anschluss kann der angeregte Photosensibilisator entweder durch Abgabe seiner Energie mittels Fluoreszenz in den Grundenergiezustand zurückfallen oder wird via Interkombination (englisch: intersystem crossing) in den stabileren Triplettzustand (T_1) überführt. Indem die Energie des Photosensibilisators im Triplettzustand unter sauerstoffreichen Bedingungen auf ein molekulares Sauerstoffmolekül (O_2) transferiert wird kommt es zur Formation von ROS in Form von hochreaktivem 1O_2 (Typ-II Reaktion). Unter sauerstoffarmen Bedingungen kann der Photosensibilisator außerdem unter Bildung von freien Radikalen direkt mit den organischen Strukturen der Zelle reagieren (Typ-I Reaktion) (3,14).

Die gebildeten ROS besitzen ein ausgeprägtes zelluläres Toxizitätspotenzial sowie das Potenzial, Apoptose und/oder Nekrose zu induzieren, wodurch die Eliminierung der Tumorzelle herbeigeführt wird. Die antitumorale Wirkung der PDT beruht neben der direkten zytotoxischen Wirkung auf die behandelten Tumorzellen auch auf der Schädigung der tumoralen Blutgefäße und der Entwicklung einer systemischen Immunität über eine Inflammationsreaktion (3).

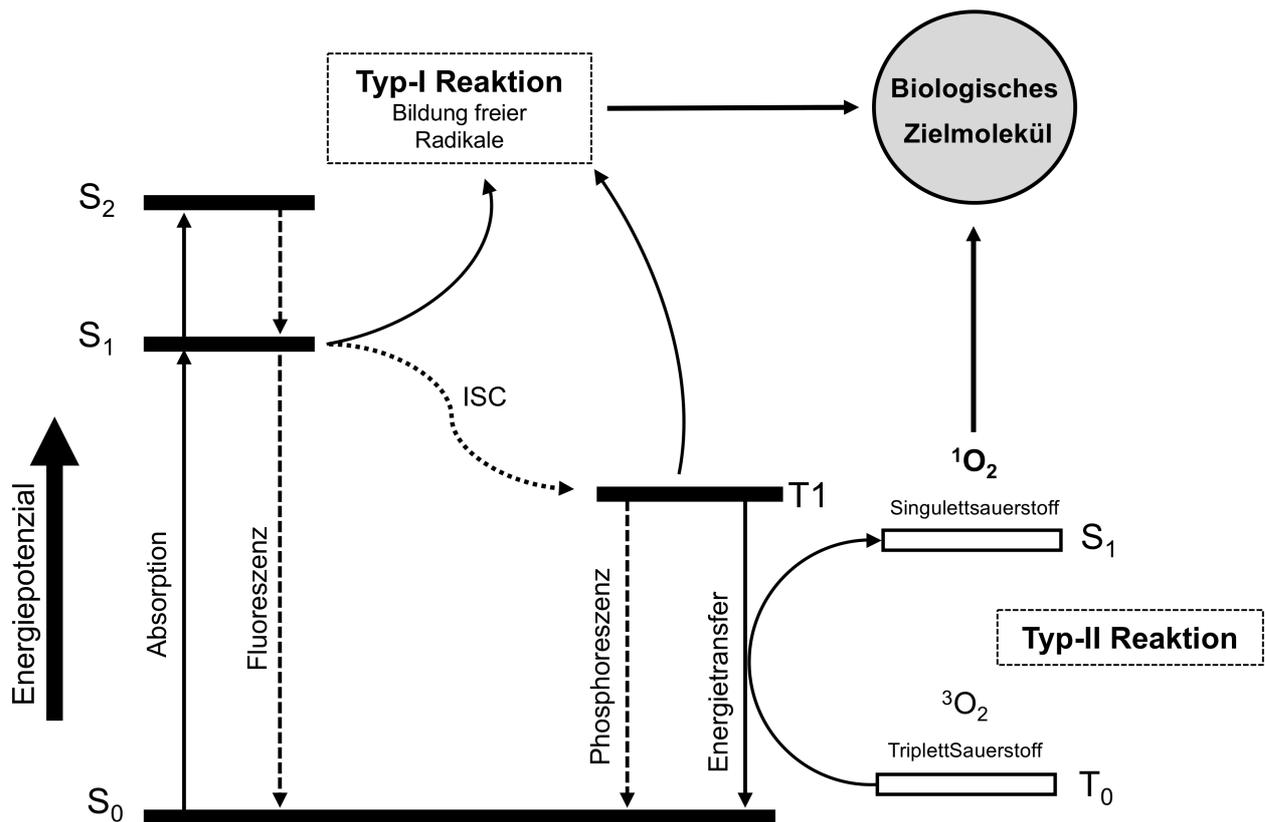


Abbildung 1. Das Jablonski-Schema beschreibt den Energietransfer des Photosensibilisators in der Typ-I und Typ-II Reaktion unter Bildung hochreaktiver freier Radikale und Singulett-Sauerstoff. S_0 – Grundzustand; S_1 – angeregter Energiezustand; S_2 – zweiter angeregter Zustand; ISC – intersystem crossing/Interkombination; T_1 – Tripletzustand; 3O_2 – Triplett-Sauerstoff; 1O_2 – Singulett-Sauerstoff. Modifizierte Abbildung nach Zhang *et al.*, 2018, Acta Pharm Sin B. (14).

2. 3. Photosensibilisatoren

Der Erfolg der PDT ist maßgeblich abhängig von der Qualität des eingesetzten Photosensibilisators und dessen photochemischen- und physikalischen Eigenschaften. Er sollte eine hohe chemische Reinheit und Stabilität sowie eine geringe Aggregationstendenz haben. Der Photosensibilisator sollte sich in hohem Maße im neoplastischen Zielgewebe anreichern und eine schnelle Clearance im gesunden Gewebe aufweisen. Dabei sollte der Photosensibilisator ohne Photoaktivierung keine Toxizität aufweisen (Dunkeltoxizität). Nach erfolgter Bestrahlung sollte er jedoch ein hohes Maß an ROS erzeugen. Sein Lichtabsorptionsmaximum sollte im roten bis infraroten Bereich bei einer Wellenlänge von 600-800 nm liegen, um eine ausreichend tiefe Gewebepenetration von 0,5 – 1 cm zu ermöglichen (3,15).

Die Struktur der überwiegenden Anzahl an Photosensibilisatoren basiert auf heterozyklischen Ringstrukturen mit Ähnlichkeit zu Chlorophyll oder dem Häm des Hämoglobinmoleküls. Photosensibilisatoren der ersten Generation, die Einzug in die klinische Anwendung der PDT fanden, sind die Hematoporphyrinderivate Photofrin®, ein Gemisch aus verschiedenen Porphyrindimeren und – oligomeren, sowie 5-Aminolevulinsäure (5-ALA), welches als Prodrug verabreicht und in dem Zielgewebe enzymatisch zum aktiven Photosensibilisator Protoporphyrin IX umgewandelt wird (16). Trotz ihrer erfolgreicher Anwendung im onkologischen Bereich wurden einige Nachteile dieser Photosensibilisatoren offenbar. In Bezug auf das Cholangiokarzinom konnten Zoepf *et al.* zeigen, dass die Photodynamische Therapie mit 5-ALA trotz ausreichender Gewebsanreicherung nicht zu einer nachhaltigen Auflösung Cholangiokarzinom-assoziiierter biliärer Obstruktionen führt. Eine mögliche Erklärung könnte dabei laut Zoepf *et al.* beispielsweise die unterschiedliche molekulare Ausstattung der Cholangiokarzinomzellen im Vergleich zu anderen epithelialen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Ösophaguskarzinom sein, bei dem die 5-ALA-PDT erfolgreich eingesetzt wird (17). Nachteile des klinisch am häufigsten eingesetzten Photosensibilisator, Photofrin®, bestehen in dessen unzureichender chemischen Reinheit. Photofrin® ist eine Mischung aus 60 Einzelverbindungen mit individuellen photochemischen Charakteristika. Einzelne Absorptionsmaxima der enthaltenen photoaktiven Anteile des Photofrin® liegen im grünen und blauen Wellenlängenbereich. Licht dieser Wellenlängen weist eine nur suboptimale Gewebepenetration auf, weshalb gerade in tiefer gelegenen Gewebeanteilen die unzureichende Lichtaktivierung von Photofrin® zu vergleichsweise geringer ROS-Entstehung führt und der therapeutische Effekt nicht beziehungsweise nur vermindert ausfällt (14,18). Der Einsatz von Photofrin® bei der PDT führt zudem zu lang anhaltender Photosensibilität der Haut von bis zu drei Monaten (14,16). Um diese Nachteile zu überwinden, wurden Photosensibilisatoren der zweiten Generation entwickelt. Neben Porphyrinvorstufen wie 5-ALA oder Chlorinen wie Foscan® stellen die Phthalocyanine eine der vielversprechendsten Stoffklassen dar. Phthalocyanine sind Porphyrinderivate, die mit einem metallischen Zentralatom wie Zink, Silizium, Aluminium oder Indium eine potente ROS-Generierung gewährleisten und durch ihre vorteilhaften photophysikalischen Eigenschaften in der Vergangenheit zu vielversprechenden Photosensibilisatoren im Rahmen der PDT avanciert sind (siehe Abb. 2.) (5,19). Die Verbindungen sind einfach herzustellen, photostabil und weisen ein hohes Absorptionsmaximum im roten bis infraroten Lichtspektrum auf (20). Dies ermöglicht beispielsweise eine über doppelt so tiefe Gewebepenetration im Vergleich zu Photofrin®. Je nach chemischer Struktur werden

Phthalocyanine innerhalb von wenigen Tagen durch den Körper ausgeschieden, wodurch anhaltende Photosensibilisierungen der Haut minimiert werden (16,18). Phthalocyanine weisen periphere Bindungsstellen auf, über deren Substitution mit verschiedenen Seitenketten die Löslichkeitseigenschaften des Phthalocyanins modifiziert werden können (siehe Abb. 2.) (19,21). Silizium-Phthalocyanine besitzen darüber hinaus den Vorteil zusätzlicher Bindungsstellen an den axialen Positionen. Durch die Substitution der zentralen Bindungsstellen kann eine zusätzliche Löslichkeit erreicht werden, was eine Aggregation des Photosensibilisators verhindert und die Effektivität der PDT steigert (siehe Abb. 2.) (19). Zink-Phthalocyanine weisen neben vorteilhaften Lichtabsorptionseigenschaften bei Wellenlängen im Bereich von 700 nm durch ihr diamagnetisches Zentralatom eine besonders hohes Phototoxizitätspotenzial im Vergleich zu anderen Phthalocyaninen auf (21). Neben den photophysikalischen und -chemischen Eigenschaften des Photosensibilisators ist die Phototoxizität innerhalb der PDT jedoch abhängig von weiteren Faktoren, wie der subzellulären Akkumulation, Konzentration, Inkubationszeit und den Eigenschaften verschiedener Zellen (21).

2. 4. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Eignung zweier neu synthetisierter Metallophthalocyanine, einem Zink- und Siliziumphthalocyanin, als Photosensibilisatoren für die PDT des Cholangio- und Ösophaguskarzinoms zu evaluieren.

Dazu sollten die zugrundeliegenden zellulären Wirkungsmechanismen im Hinblick auf das zelluläre Aufnahmeverhalten und die intrazelluläre Akkumulation der Verbindungen, der Bildung von ROS, des antiproliferativen Potenzials als Photosensibilisator innerhalb der PDT, der Wirkung auf den Zellzyklus, eine mögliche Dunkeltoxizität der Verbindungen ohne Bestrahlung sowie zugrunde liegende Mechanismen des Zelltods (Apoptose und/oder Nekrose) durch explorative *in vitro*-Studien untersucht werden. Weiterführend sollten Untersuchungen bezüglich des antineoplastischen und antiangiogenen Effekts einer PDT mit den neuen Photosensibilisatoren im *in vivo*-Modell erfolgen.

3. Material und Methoden

3.1. Verbindungen

Die in dieser Arbeit benutzten Photosensibilisatoren Tetra-triethylenoxysulfonyl-substituiertes **Zinkphthalocyanin** (ZnPc) und Tetra-triethylenoxysulfonyl-substituiertes Dihydroxy-**Siliziumphthalocyanin** (Pc32) wurden von unserem Kooperationspartner aus dem Institut für Chemie der Technischen Universität in Gebze, Türkei (Prof. Ayşe Gül Gürek) zur Verfügung gestellt. Die Synthese und photophysikalischen Eigenschaften der Substanzen sind der Literatur zu entnehmen (4,19–21).

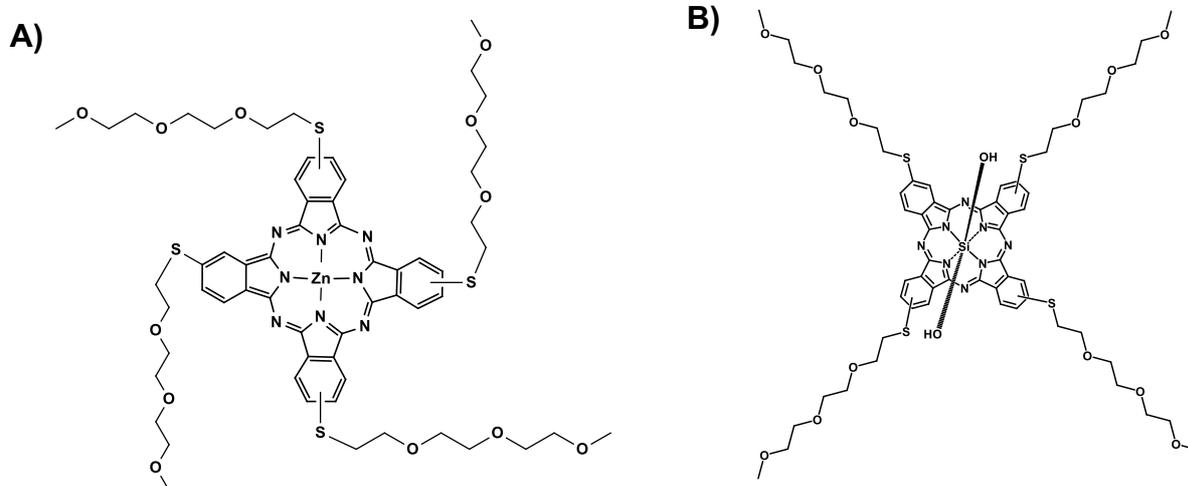


Abbildung 2. Die chemische Struktur von (A) Zinkphthalocyanin (ZnPc) und (B) Siliziumphthalocyanin (Pc32). Die Verbindungen sowie die gezeigten Abbildungen der Verbindungen wurden freundlicherweise durch Prof. Gürek, Institut für Chemie der Technischen Universität in Gebze, Türkei, bereitgestellt. (A) modifiziert nach Kuzyniak *et al.*, 2016, Photodiagnosis Photodyn Ther. (20).

3.2. Zelllinien

Die molekularen Mechanismen der PDT mit ZnPc und Pc32 wurden in humanen Zelllinien cholangiozellulärer und ösophagelaer Karzinomentitäten untersucht:

- **TFK-1** – teils tubulär, teils papillär wachsendes, extrahepatisches Adenokarzinom der Gallenwege (Leibnitz Institute DSMZ, Braunschweig, Deutschland; Nr.: ACC 344)
- **EGI-1** – fortgeschrittenes, metastasiertes, großzelliges Adenokarzinom der Gallenwege mit geringer Differenzierung (Leibnitz Institute DSMZ, Braunschweig, Deutschland; Nr.: ACC 385)

- **Kyse-140** – moderat differenziertes Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (Leibnitz Institute DSMZ, Braunschweig, Deutschland; Nr.: ACC 348)
- **OE-33** – Barrett-Adenokarzinom des Ösophagus (Leibnitz Institute DSMZ, Braunschweig, Deutschland; Nr.: ACC 706)

Die Zelllinien wurden in einem Zellkulturinkubator (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Das Zellkulturmedium (RPMI 1640; Biochrom AG, Berlin, Deutschland) wurde mit 10% fetalem Kälberserum (FKS; Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), sowie L-Glutamin (2 mM) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) angereichert. Jeden zweiten Tag wurde das Medium ausgetauscht und einmal in der Woche wurden die Zellen mithilfe von Trypsin/EDTA (1%) abgelöst und passagiert. Die Zellen wurden bis zu einer maximalen Passage von 40 verwendet.

3. 3. Lichtquelle und photodynamische Therapie

Für die PDT-Behandlung wurden die Zellen auf Mikrotiterplatten oder Petrischalen ausgesät und für 48 h im Zellkulturinkubator kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit ZnPc (0,2-10 µM) oder Pc32 (1-10 µM) bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt für 1-30 h. Nach der Inkubationsperiode wurde das photosensibilisatorhaltige Medium durch PBS ersetzt und nachfolgend bestrahlt. Die Lichtaktivierung des Photosensibilisators wurde mit einer Breitband-Weißlichtquelle (100-W Halogenlampe, EFR 12 V/100 W GZ -6.35, Omnilux; Thomann GmbH, Burgebrach, Deutschland) mit einem Spektraloutput von 400-800 nm durchgeführt. Um eine Bestrahlung mit Infrarotlicht zu verhindern, wurde ein hitzereflektierender und für Wellenlängen > 700 nm undurchlässiger Filter zwischengeschaltet. Die Bestrahlung erfolgte mit einer durchschnittlichen Bestrahlungsstärke von 10 J/cm². Die Temperatur wurde mit einem digitalen Thermometer im Inneren des Bestrahlungssystems gemessen. Ein Lüfter wurde verwendet, um die Beleuchtungseinheit abzukühlen, sobald eine Innentemperatur von 37°C erreicht wurde.

3. 4. Untersuchung zugrundeliegender Wirkmechanismen der ZnPc- und Pc32-PDT *in vitro*

Die zeit- und dosisabhängige **intrazelluläre Aufnahme und Akkumulation** der Photosensibilisatoren wurde mittels konfokaler Lasermikroskopie detektiert (Leica DMI 6000;

Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Die Anregung mit einem HeNe-Laser erfolgte bei 633 nm, während die Detektion mittels eines Photomultipliers (PMT) bei 690-710 nm stattfand (22).

Pc32- und ZnPc-PDT induzierte Veränderungen der **Zellzahl und des Zellwachstums** wurden mittels Kristallviolett färbung zellulärer DNA und anschließender Messung der Lichtextinktion bei 570 nm mit einem ELISA-Mikroplattenreader analysiert (23).

Pc32- und ZnPc-PDT-induzierte **Zytotoxizität** wurde durch die zytotoxisch bedingte Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) in den Überstand bestimmt. Dafür wurde ein kolorimetrischer Zytotoxizitätsassay (Cytotoxicity Detection KitPLUS LDH; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet (24).

Die Bestimmung ZnPc-PDT-induzierter **Apoptose** erfolgte fluorometrisch, indem die Spaltung des Caspase-3 spezifischen AC-DEVD-AMC (EMD Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) mithilfe eines VersaFluor Fluorometers (Bio-Rad, München, Deutschland; Filtersätze: Exzitation 360/40 nm, Emission 460/10 nm) gemessen wurde. Nur bei aktivierter Caspase-3 kann das Substrat in eine fluoreszierende Form überführt werden, so dass eine Zunahme an Fluoreszenz als Ausdruck einer apoptosespezifischen Aktivierung der Caspase 3 als einem Schlüsselenzym der zellulären Apoptose detektiert werden kann (20). Die Bildung von apoptosespezifischen Abschnürungen (sog. apoptotic bodies (25)) wurde mithilfe des LIVE/DEAD Cell Viability Assays (ThermoFisher Waltham, Massachusetts, USA) überprüft. Apoptotic bodies entstehen innerhalb des programmierten und geordneten Zelltods und besitzen eine intakte Membran, welche residuale, fragmentierte Zellkomponenten enthält und noch mit der apoptotischen Zelle in Assoziation steht. Die Zellen wurden nach ZnPc-PDT mit den Fluoreszenzfarbstoffen Calcein-AM und Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Calcein-AM wird von lebenden Zellen zu dem grün fluoreszierenden Calcein (Exzitation/Emission 495/510 nm) umgesetzt. EthD-1 (Exzitation/Emission 495/635 nm) wird von sterbenden Zellen mit fehlender Membranintegrität aufgenommen und fluoresziert unter Bindung von intrazellulären Nukleinsäuren mit roter Farbe (20). Die Identifizierung von apoptotic bodies mit intakter Membran und Assoziation zu der Zelle konnte aufgrund der Anfärbarkeit mittels Calcein-AM bei fehlender Anfärbarkeit mit EthD-1 erfolgen.

Veränderungen des Zellzyklus wurden durchflusszytometrisch (FACSCanto II, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) erfasst und mittels FCS Express 6 Software (De Novo

Software, Los Angeles, Kalifornien, USA) analysiert. Dazu wurden die vorher mit 100% Ethanol fixierten und mit RNase behandelten Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid angefärbt. Propidiumiodid interkaliert mit der DNA-Doppelhelix und liegt nach dem Anfärben proportional zum zellulären DNA-Gehalt vor. Der durchflusszytometrisch über die Propidiumiodidfluoreszenz (Exzitation/Emission 433 nm/ 564 - 606 nm) bestimmte phasenspezifische DNA-Gehalt einer Zelle ermöglicht, in einer Zellpopulation den Anteil der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen (sub-G₁-, G₀/G₁-, S-, sowie G₂/M-Phase) zu ermitteln. Die eingesetzten Karzinomzellen weisen in der G₀/G₁-Phase einen hypertetraploiden Chromosomensatz auf. In der S-Phase wird das Genom repliziert, was zu einer Verdopplung der DNA-Menge in der G₂/M-Phase führt. Zellen in der sub-G₁-Phase, welche aufgrund des Abbaus und der Abschnürung von DNA in Apoptosekörperchen während des programmierten Zelltods einen geringeren, hypoploiden DNA-Gehalt aufweisen, wurden als apoptotische Zellen gewertet (5). Für jede Probe wurden mindestens 30.000 Events aufgezeichnet. Mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtanalyse wurden Debris und Zelldubletten in FCS Express 6 exkludiert und mithilfe des Propidiumiodidsignals die zellzyklusphasenspezifische DNA-Verteilung analysiert.

Durch das Anfärben mit den ROS-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen CellROX (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) wurde die **Bildung reaktiver Sauerstoffspezies** nach ZnPc- bzw. Pc32-PDT mikroskopisch erfasst und dargestellt (Axioskop 40, Zeiss; Objektiv 40x, NA 1.30, Zeiss, Wetzlar, Deutschland mit Digitalkamera Kappa, DX4-285FW, Gleichen, Deutschland). Zytoplasmatisch lokalisierte ROS wurden mit dem Farbstoff CellROX orange (Exzitation/Emission 546/575 nm) detektiert, während die nukleär/mitochondriale Lokalisation mit dem Farbstoff CellROX green (Exzitation/Emission 470/525 nm) bestimmt wurde (5). Innerhalb eines separaten Ansatzes wurde Kyse-140 Zellen neben ZnPc für 1 h mit dem Radikalfänger Vitamin C inkubiert, um die die Entstehung von ROS zu verifizieren (22).

ZnPc-PDT-assoziierte **Veränderungen der Expression von zellulären Regulationsproteinen** wurden mittels Western Blot untersucht (5,20). Zunächst wurden Zelllysate mit RIPA-Puffer hergestellt und deren Proteinkonzentration mit dem Bicinchoninsäure-Protein-Assay-Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) bestimmt. Anschließend wurden Polyacrylamidgele (10% oder 12%; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) mit ≥ 20 μ g-Protein/Tasche beladen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Mittels Elektroblothing wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Blots wurden für mindestens 1 h in 5%iger Milchpulverlösung (Merck Millipore) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurden sie über

Nacht bei 4°C mit den jeweiligen Primärantikörpern inkubiert. Die Antikörper richteten sich gegen die Proteine , Bcl-2 (1:500), Bax (1:1.000), ERK½ (1:1.000), GAPDH (1:1.000), Cyclin D1 (1:1.000) und Cyclin B1 (1:1.000) von Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA), und Bcl-2 (1:1.000) und β-Aktin (1:2.000) von Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) sowie Bax (1:500) von Cell Signaling Technology (Dancers, MA, USA). Nach Inkubation mit Meerrettichperoxidase-gekoppelten Anti-IgG-Antikörpern (1:10.000; GE Healthcare Life Sciences) für mindestens 1 h bei Raumtemperatur wurden die Blots mit einem Chemilumineszenzreagenz (ECL Clarity Max; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA und GE Healthcare Life Sciences) versetzt und in einem Chemilumineszenz-Imager Celvin® S 420 (Biostep, Burkhardsdorf, Deutschland) oder mittels ECL Hyperfilm entwickelt. Zur densitometrischen Quantifizierung der Expressionänderung der detektierten Proteine wurde das Softwareprogramm ImageJ-Software (Version 2.0.0-rc-43/1.50e; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) verwendet. Die Proteinexpression wurde auf die Haushaltsgenexpression von β-Aktin oder GAPDH normalisiert.

3. 5. Untersuchung antiangiogener und antitumoraler Effekte der ZnPc-PDT *in vivo*

Antiangiogene Effekte der ZnPc- und Pc32-PDT wurden *in vivo* mithilfe des Chorioallantoismembran (CAM-Assay) untersucht. Bei diesem Assay dient die CAM befruchteter Hühnereier als Beobachtungsmodell für die Effekte der PDT-Behandlung. Die gute Zugänglichkeit und starke Vaskularisierung der CAM ermöglichen dabei die direkte Visualisierung der Angiogenese und Veränderungen des Mikrogefäßnetzwerks vor und nach der ZnPc-PDT (23,26). Die Fotodokumentation erfolgte 24 bis 72 h nach PDT. Im Anschluss fand eine qualitative Analyse der Veränderungen des untersuchten CAM-Areals statt.

Neben der Beobachtung des CAM-Gefäßnetzes wurde, durch die Evaluation der Entwicklung und des Überlebens der Hühnerembryonen, die mögliche **Dunkeltoxizität** von nicht-photoaktiviertem ZnPc überprüft.

Zudem wurden Tumorplaques aus Kyse-140 Zellen (1×10^6) in das CAM-Gewebe inokuliert, sodass eine direkte Beobachtung des tumoralen Wachstums erfolgen konnte. Anhand der auf der CAM wachsenden Tumorplaques wurden **antineoplastische Behandlungseffekte** von photoaktiviertem ZnPc untersucht (22).

3. 6. Statistik

Signifikanzen zwischen einzelnen Werten wurden mit der Software Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) mittels ungepaarten zweiseitigen t-Tests analysiert. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf $p < 0,05$ festgelegt. Sofern nicht anders gekennzeichnet wurden die Versuche $n \geq 3$ mal durchgeführt. Die Beurteilung des IC_{50} -Werts und dessen Standardabweichung nach ZnPc-PDT in EGI-1 und TFK-1 Zellen erfolgte mittels nichtlinearer Regressionsanalyse (log(inhibitor) vs. normalized response) in Graphpad Prism 6, 24 h nach Behandlung mit 7 verschiedenen Konzentrationen: 0,2 μ M - 0,5 μ M - 1 μ M - 2,5 μ M - 5 μ M - 7,5 μ M - 10 μ M (TFK-1 $n=5$; EGI-1 $n=6$). Auf die gleiche Weise wurde der IC_{50} -Wert bei Kyse-140 und OE-33 Zellen, die mit 5 verschiedenen Konzentrationen ZnPc behandelt wurden, berechnet: 1 μ M - 2 μ M - 3 μ M - 4 μ M - 5 μ M (Kyse 140 $n=3$; OE-33 $n=3$).

4. Ergebnisse

In der Studie zur Originalpublikation 1: „Novel zinc - and silicon-phthalocyanines as photosensitizers for photodynamic therapy of cholangiocarcinoma.“ wurde die Tauglichkeit und das Potenzial zweier Metallophthalocyanine, Tetra-triethylenoxysulfonyl-substituiertes-Zinkphthalocyanin (**ZnPc**) und Tetra-triethylenoxysulfonyl-substituiertes-Dihydroxy-Siliziumphthalocyanin (**Pc32**), als Photosensibilisatoren für die Photodynamische Therapie (PDT) von Cholangiokarzinomen evaluiert. In der Studie zur Originalpublikation 2: „Novel zinc phthalocyanine as a promising photosensitizer for photodynamic treatment of esophageal cancer.“ wurde ZnPc als Photosensibilisatoren für die PDT von Ösophaguskarzinomen untersucht.

4. 1. Zelluläre Aufnahme von ZnPc und Pc32

Mittels Konfokalmikroskopie wurde zunächst das dosisabhängige Aufnahmeverhalten und die intrazelluläre Akkumulation von ZnPc (0-5 μM bei Cholangiokarzinomzellen; 0-10 μM bei Ösophaguskarzinomzellen) und Pc32 (0-10 μM bei Cholangiokarzinomzellen) nach 24-stündiger Inkubation untersucht. Dabei zeigte sich eine vorwiegend zytoplasmatische Anreicherung von ZnPc in Cholangio- (EGI-1, TFK-1) sowie Ösophaguskarzinomzellen (Kyse-140, OE-33) (siehe Abbildung 3 A, C). Trotz höher eingesetzter Konzentrationen von Pc32 wurde im Vergleich zu ZnPc eine deutlich schwächere Akkumulation in den Cholangiokarzinomzellen beobachtet (siehe Abbildung 3 B).

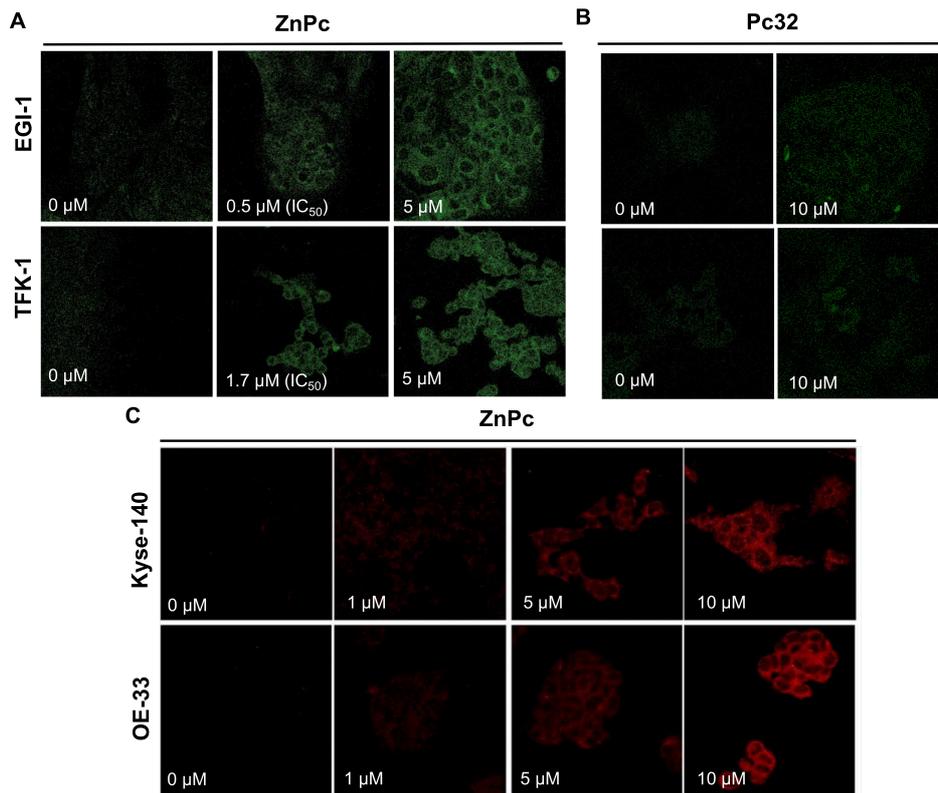


Abbildung 3. Aufnahmeverhalten von ZnPc in Cholangio- und Ösophaguskarzinomzellen sowie von Pc32 in Cholangiokarzinomzellen. Die intrazelluläre Aufnahme der Photosensibilisatoren wurde nach 24 h Inkubation mittels Fluoreszenzmikroskopie durch ein Konfokalmikroskop beobachtet. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige vorwiegend zytoplasmatische Akkumulation von ZnPc in (A) Cholangio- und (C) Ösophaguskarzinomzellen. (B) In den Cholangiokarzinomzellen wurde im Vergleich zu ZnPc eine schwächere Akkumulation von Pc32 beobachtet (B). Vergrößerung, x63. Gezeigt sind repräsentative Bilder von drei Versuchen. Originalpublikation 1, Figure 1 A, B, Schmidt *et al.*, 2018, *Int J Mol Med.* (5) und Originalpublikation 2, Figure 1, Kuzyniak *et al.*, 2017, *Int J Oncol.* (22) zusammengefügt.

4. 2. Antiproliferative Effekte bei Cholangio- und Ösophaguskarzinomzellen

Dunkeltoxizität von Pc32 und ZnPc in Cholangio- und Ösophaguskarzinomzellen

Cholangiokarzinomzellen wurden für 24 h mit ZnPc und Pc32 inkubiert. Ösophaguskarzinomzellen wurden für den gleichen Zeitraum mit ZnPc inkubiert. Anschließend erfolgte die weitere Kultivierung der Zellen in photosensibilisatorfreiem Medium für bis zu 72 h ohne eine Bestrahlung und schließlich die Bestimmung der Zellzahl. Dabei zeigte sich bei eingesetzten Konzentrationen von bis zu 10 µM an ZnPc zu keinem Zeitpunkt und in keiner

Zelllinie eine Reduktion der Zellzahl als Anzeichen für eine Dunkeltoxizität (24-72 h nach 24-stündiger Inkubation) (siehe Abb. 4 A, B und 7 A, B). Gleichmaßen war keine Dunkeltoxizität von Pc32 in Cholangiokarzinomzellen ersichtlich (siehe Abb. 6).

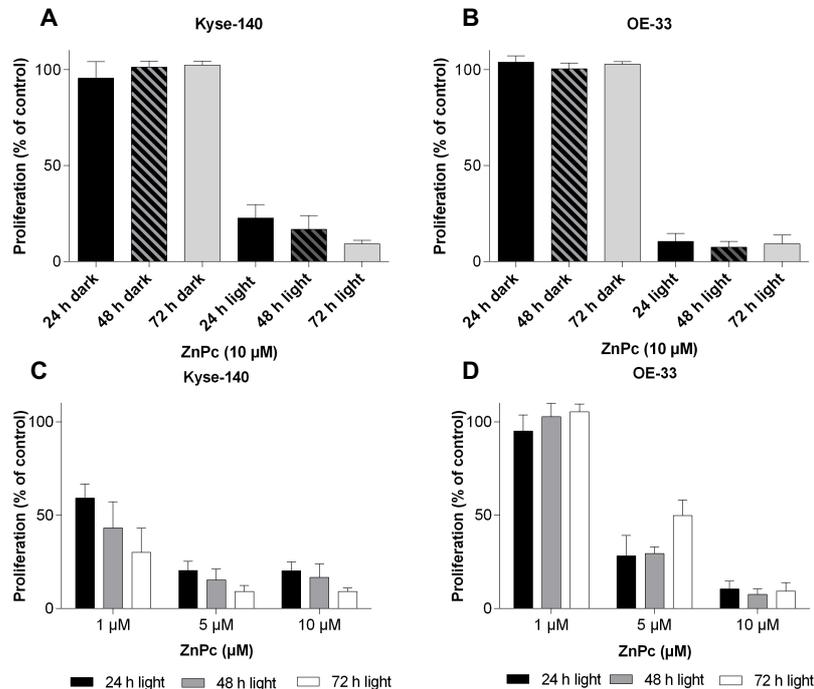


Abbildung 4. Wachstumsinhibitorische Effekte der ZnPc-PDT auf Ösophaguskarzinomzellen. Ohne Photoaktivierung zeigte sich bei vorangehender 24-stündiger Inkubation mit ZnPc kein Effekt auf die Proliferation von (A) Kyse-140 und (B) OE-33 Zellen. (C, D) Nach Photoaktivierung (10 J/cm²) zeigte sich eine zeit- und konzentrationsabhängige Reduktion der Zellzahl in beiden Zelllinien um bis zu 90% im Vergleich zur unbehandelten, bestrahlten Kontrolle in beiden Zelllinien. Die Daten werden als Prozentsatz (Mittelwert ± SD) der Proliferation der unbehandelten Kontrollen angegeben. Für jede Zelllinie wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Originalpublikation 2, Figure 3 und 4 zusammengefügt, Kuzyniak *et al.*, 2017, *Int J Oncol.* (22).

Weiterführend wurde das Ausbleiben einer Dunkel- bzw. Eigentoxizität mittels CAM-Assay *in vivo* überprüft. Injektion von 10 µL ZnPc (10 µM) in ein großes venöses CAM-Gefäß am Tag 14 der Embryonalentwicklung ohne anschließende PDT führte innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 24 h nicht zu einem Ableben der Hühnerembryonen. Auch gab es keinerlei Anzeichen dafür, dass die Embryonenentwicklung beeinträchtigt wurde. Das Ausbleiben einer Dunkeltoxizität von ZnPc konnte zusätzlich im Tierversuch mit jungen, männlichen Wistar-Ratten bestätigt werden. Dabei zeigten sich keinerlei Veränderungen der Wasser- und Nahrungsaufnahme, keine Gewichtsreduktion der Tiere und keine ZnPc-induzierte Anzeichen für

eine Entzündung durch Größenveränderung von Leber, Niere und Milz oder eine Erhöhung der Leukozytenzahl zu einem Zeitpunkt von 7 Tagen nach ZnPc-Applikation.

Antiproliferativer Effekt der Pc32-PDT in Cholangiokarzinomzellen

Die PDT mit Pc32 bewirkte in EGI-1 Zellen eine zeit- und konzentrationsabhängige Reduktion der Zellzahl. Dabei wurde das Wachstum nachhaltig gehemmt, ohne dass Zellen, die dem Zelltod durch die Behandlung zunächst entgehen konnten, eine erneute Proliferation im Vergleich zur Kontrolle zeigten (Reproliferation). Die Pc32-PDT zeigte jedoch keine effektive und nachhaltige Reduktion der Zellzahl bei TFK-1 Zellen.

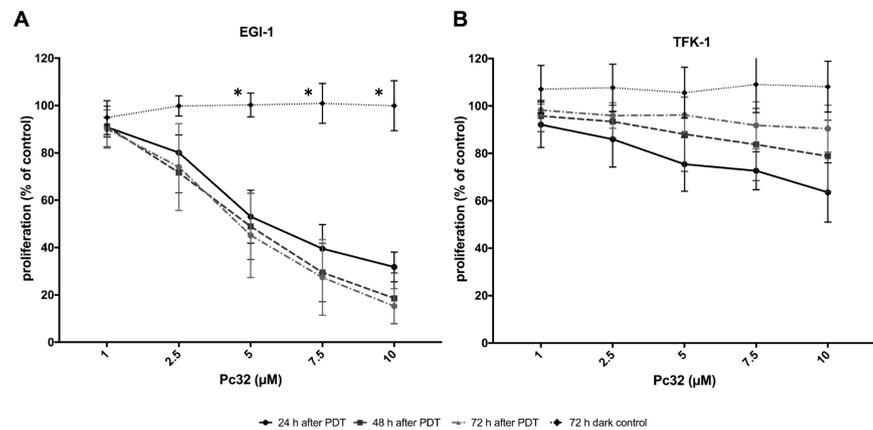


Abbildung 5. Wachstumsinhibitorische Effekte der Pc32-PDT auf Cholangiokarzinomzellen. (A) Die PDT (10 J/cm²) mit Pc32 führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Proliferationsreduktion von EGI-1-Zellen. (B) In TFK-1 Zellen induzierte die Pc32-PDT keine deutliche oder anhaltende Wachstumshemmung. Die Daten werden als Prozentsatz (Mittelwert ± SD) der Proliferation der unbehandelten, bestrahlten Kontrollen angegeben. Es werden die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Ungepaarter, zweiseitiger t-test, *p<0,05 nicht-photoaktiviertes vs. photoaktiviertes Pc32 (72 h nach PDT). Originalpublikation 1, Figure 3, Schmidt *et al.*, 2018, *Int J Mol Med.* (5).

Hier konnte ein vergleichsweise geringer Rückgang der Zellzahl von <40% im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (24 h nach PDT). Die übrigen TFK-1 Zellen konnten zudem im Verlauf von 72 h nach PDT auf das Niveau der Kontrolle reproliferieren (siehe Abb. 5).

Antiproliferativer Effekt der ZnPc-PDT in Cholangio- und Ösophaguskarzinomzellen

Eine Photoaktivierung (10 J/cm²) von ZnPc führte in den eingesetzten Cholangio- sowie Ösophaguskarzinom-Zelllinien zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellzahl um >90% zum Zeitpunkt von 24 h nach PDT, ohne dass eine Reproliferationstendenz bis zu einem Zeitpunkt von 72 h nach PDT beobachtet werden konnte (siehe Abb. 4 C, D und Abb. 6 A, B)

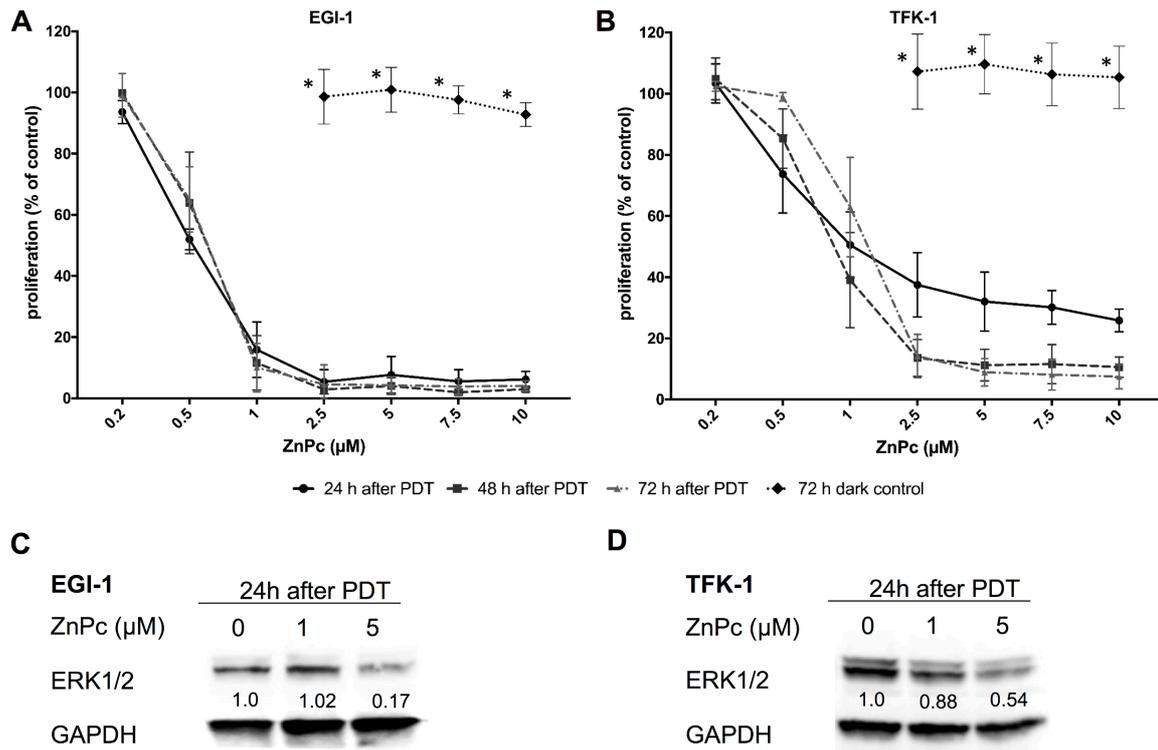


Abbildung 6. Wachstumsinhibitorische Effekte der ZnPc-PDT auf Cholangiokarzinomzellen. Die ZnPc-PDT (10 J/cm^2) führte zu einer dosis- und zeitabhängigen Reduktion der Zellzahl von (A) EGI-1 und (B) TFK-1 Zellen um über 90%. Nicht-photoaktiviertes ZnPc zeigte in beiden Zelllinien keine nennenswerte "Dunkeltoxizität". Die ZnPc-PDT induzierte eine deutliche Abnahme der Expression des mitogen-activated protein kinase-Signaltransduktionswegs assoziierten Proteins ERK $\frac{1}{2}$ im Vergleich zur Kontrolle in (C) EGI-1 und (D) TFK-1 Zellen. Die Daten werden als Prozentwert (Mittelwert \pm SD) der unbehandelten, bestrahlten Kontrollen angegeben. Es werden die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Kristallviolett- und zwei Western Blot-Versuchen gezeigt. Die Western Blots wurden densitometrisch mittels ImageJ analysiert, normalisiert auf GAPDH. Ungepaarter, zweiseitiger t-test, * $p < 0,05$ nicht-photoaktiviertes vs. photoaktiviertes ZnPc (72 h nach PDT). Originalpublikation 1, Figure 2, Schmidt *et al.*, 2018, Int J Mol Med. (5).

Weiterführend wurde für die einzelnen Zelllinien die halbmaximale, wachstumsinhibitorische Konzentration (IC_{50}) 24 h nach ZnPc-PDT mittels nichtlinearer Regressionsanalyse bestimmt (siehe Kap. 3.6). Für EGI-1 Zellen zeigte sich dabei eine IC_{50} -Konzentration von $0,5 \pm 0,17 \mu\text{M}$ ZnPc, während sich für TFK-1 Zellen eine IC_{50} -Konzentration von $1,7 \pm 0,13 \mu\text{M}$ ZnPc ergab (siehe Tabelle 1.). Innerhalb der Cholangiokarzinom-Zelllinien reagierten EGI-1 Zellen demzufolge sensibler auf die ZnPc-PDT als TFK-1 Zellen. Innerhalb der Ösophaguskarzinom-Zelllinien zeigten Kyse-140 Zellen eine IC_{50} -Konzentration von $1,4 \pm 0,4 \mu\text{M}$ und OE-33-Zellen von $3,35 \pm 0,79 \mu\text{M}$ ZnPc. Kyse-140 Zellen konnten zudem bereits durch eine ZnPc-PDT mit $1 \mu\text{M}$ nachhaltig in ihrem Wachstum gehemmt werden, während dieser Effekt bei OE-33 Zellen erst nach PDT-Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ ZnPc zu beobachten war. Insgesamt zeigte sich damit bei den

Ösophaguskarzinom-Zelllinien ein sensibleres Ansprechen der Kyse-140 Zellen im Vergleich zu OE-33 Zellen.

Tabelle 1. IC₅₀-Konzentrationen von ZnPc für Cholangio- und Ösophaguskarzinomzelllinien 24 Stunden nach photodynamischer Therapie.

	ZELLINIE	IC ₅₀ -KONZENTRATION (µM)	¹ STANDARD-ABWEICHUNG
CHOLANGIO-KARZINOM	EGI-1 (n=6)	0,5	±0,17
	TFK-1 (n=5)	1,7	±0,13
ÖSOPHAGUS-KARZINOM	Kyse-140 (n=3)	1,4	±0,4
	OE-33 (n=3)	3,35	±0,79

Die IC₅₀-Konzentrationen für die Cholangiokarzinomzellen sind Schmidt *et al.*, 2018, Int J Mol Med. entnommen (5). Die IC₅₀-Konzentrationen für die Ösophaguskarzinomzellen sind Kuzyniak *et al.*, 2017 Int J Oncol. entnommen (22).

Um zu überprüfen, ob neben der eingesetzten Konzentration auch die Inkubationszeit des Photosensibilisators einen Einfluss auf die Effektivität der PDT hat, wurden Cholangio- und Ösophaguskarzinomzellen in aufsteigender Konzentration zwischen 1 und 30 h mit ZnPc inkubiert. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der Dauer des Inkubationszeitraums mit Photosensibilisator und dem antiproliferativen Effekt der anschließenden PDT. Je länger der Inkubationszeitraum war, desto größer fiel der antiproliferative Effekt aus. In den Cholangiokarzinom-Zelllinien zeigte sich bei ZnPc-Konzentrationen von $\geq 2,5$ µM ZnPc bereits nach 10-stündiger Inkubation eine ausgeprägte Reduktion der Zellzahl um ca. 70% gegenüber den Kontrollen (5). Bei dem ösophagealen Zellmodell, Kyse-140, führte ein Inkubationszeitraum von nur 6 h bei einer ZnPc-Konzentration von 10 µM bereits zu einer Reduktion der Zellzahl um >50 Prozent. Dieser eindeutige antiproliferative Effekt zeigte sich im anderen Ösophaguskarzinom-Zellmodell, OE-33, erst bei einer längeren Inkubationszeit. Ein Inkubationszeitraum von 6 h mit 10 µM ZnPc führte bei OE-33 Zellen nur zu einer Proliferationsinhibition von ca. 20% (siehe Abb. 7). Ein maximaler antiproliferativer Effekt einer gegebenen ZnPc-Konzentration wurde sowohl bei Cholangio- als auch bei Ösophaguskarzinomzellen nach 24-stündiger Inkubation erreicht. Die Verlängerung auf 30 h führte in Ösophaguskarzinomzellen zu keiner Erhöhung der

¹ halbmaximale, wachstumsinhibitorische Konzentration 24 h nach PDT

antiproliferativen Wirkung der anschließenden PDT-Behandlung, weshalb für weitere Versuche eine Inkubationszeit von 24 h mit ZnPc gewählt wurde.

In Zusammenhang mit der Proliferationsinhibition wurde die Expression von ERK $\frac{1}{2}$ bestimmt, welches ein MAP-Kinaseenzym (englisch: mitogen-activated protein kinase) darstellt, das an der Regulation der zellulären Adhäsion, dem Fortschritt des Zellzyklus, dem Überleben der Zelle sowie ihrer Differenzierung, dem Metabolismus und der zellulären Proliferation beteiligt ist (27). 24 h nach ZnPc-PDT konnte eine dosisabhängige Abnahme der Proteinexpression von ERK $\frac{1}{2}$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in beiden Cholangiokarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden (siehe Abb. 6 C, D). Dies kennzeichnet den Rückgang proliferationsfördernder Prozesse auf molekularer Ebene.

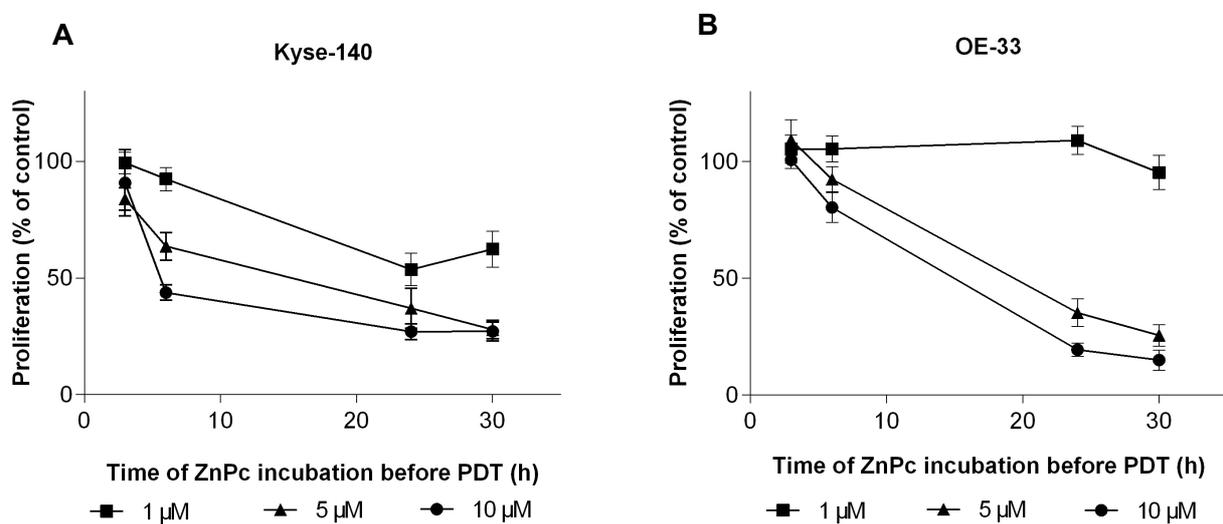


Abbildung 7. Die Wirksamkeit der PDT hängt von der Vorinkubationszeit mit ZnPc ab. (A) Kyse-140 und (B) OE-33 Zellen wurden vor der Bestrahlung (10 J/cm²) für 1-30 h mit steigenden Konzentrationen ZnPc (1-10 µM) inkubiert. Die Höhe der Wachstumshemmung nach ZnPc-PDT zeigte dabei eine starke Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit mit dem Photosensibilisator. Je länger die Inkubationszeit war, desto ausgeprägter zeigte sich die wachstumshemmende Wirkung. (A) Kyse-140 (A) reagierten empfindlicher als (B) OE-33 Zellen. Die Daten werden als Prozentsatz (Mittelwert ± SEM) der unbehandelten, bestrahlten Kontrollen angegeben. Es werden die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Versuchen gezeigt. Originalpublikation 2, Figure 2, Kuzyniak *et al.*, 2017, Int J Oncol. (22).

4. 3. ZnPc- und Pc32-PDT induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

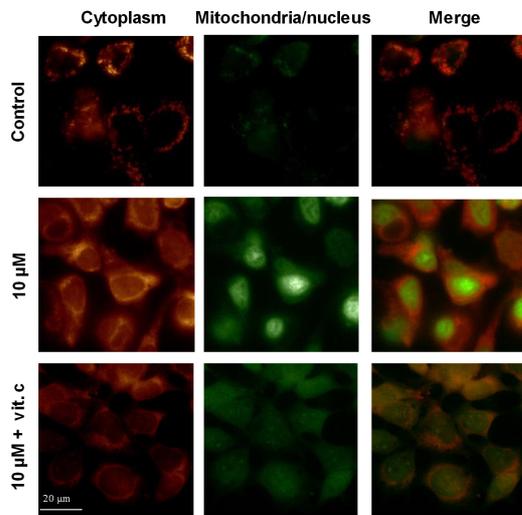


Abbildung 8. Die PDT mit ZnPc induziert die Bildung von Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Ösophaguskarzinomzellen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (oberes Panel) wurde in Kyse-140 Zellen 24 h nach ZnPc-PDT ($10 \mu\text{M}/10 \text{ J}/\text{cm}^2$) eine Induktion der ROS-Bildung im Zytoplasma (orange) und im Kern/Mitochondrium (grün) deutlich (mittleres Panel). Nach Inkubation mit 1 mM des Antioxidationsmittels Vitamin C vor Bestrahlung wurde eine reduzierte Entstehung von ROS erfasst (unteres Panel). Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Vergrößerung, $\times 40$. Originalpublikation 2, Figure 5, Kuzyniak *et al.*, 2017, *Int J Oncol.* (22).

Die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Photoaktivierung des eingesetzten Photosensibilisatoren stellt bei der PDT einen entscheidenden Faktor für die zellzerstörende Effektivität der PDT dar. Mittels ROS-sensitiver Fluoreszenzfarbstoffen sowie nachfolgender Fluoreszenzmikroskopie wurde die Entstehung von intrazellulären ROS im zytoplasmatischen Kompartiment (orange) und Mitochondrium/Nukleus (grün) überprüft. Zudem wurden Kyse-140 Zellen für 1 h mit dem Radikalfänger Vitamin C (1 mM) vor ZnPc-PDT inkubiert. Eine abgeschwächte ROS-Entstehung nach ZnPc-PDT durch gleichzeitige Inkubation mit dem Radikalfänger kann dabei indirekt die Generierung von ROS durch die ZnPc-PDT bestätigen.

24 h nach ZnPc-PDT zeigte sich eine starke Induktion von zytoplasmatischen und mitochondrialen/nukleären ROS in Ösophaguskarzinomzellen (siehe Abb. 8). In Cholangio-karzinomzellen wurde eine Entstehung von ROS sowohl im Zytoplasma als auch im

Nukleus/Mitochondrium bereits 2 h nach ZnPc-PDT nachgewiesen. Im Gegensatz zur ZnPc-PDT induzierte die Pc32-basierte PDT nur eine vergleichsweise schwache ROS-Bildung (siehe Abb. 9). Kyse-140 Ösophaguskarzinomzellen, die zusätzlich eine Stunde vor ZnPc-PDT mit Vitamin C (1 mM) inkubiert wurden, zeigten eine deutlich schwächere ROS-Entstehung in beiden Kompartimenten, was auf die antioxidative Wirkung von Vitamin C zurückzuführen ist (siehe Abb. 8).

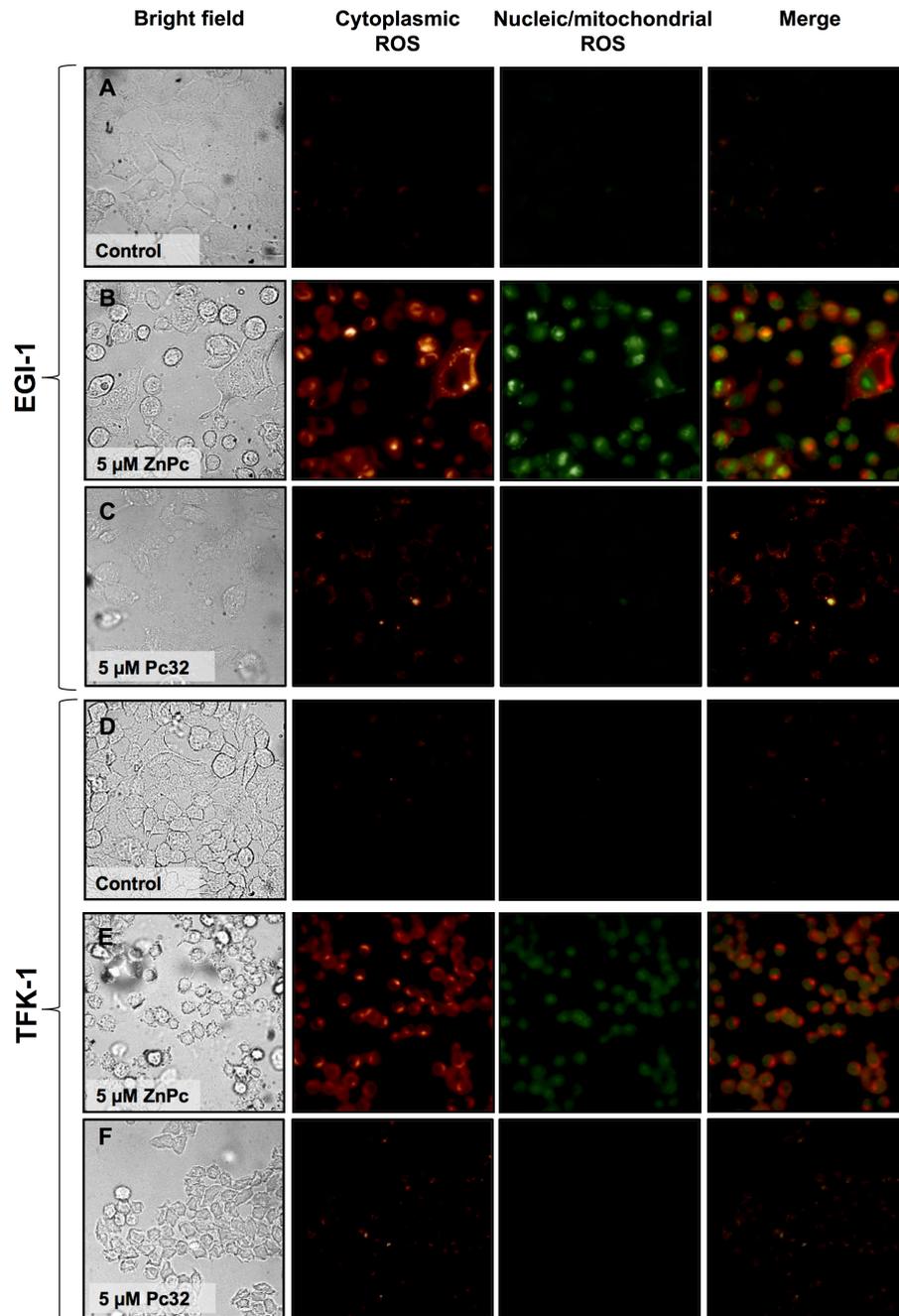


Abbildung 9. Die PDT mit ZnPc und Pc32 induziert die Bildung von Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Cholangiokarzinomzellen. Im Vergleich zur (A) unbehandelten, bestrahlten Kontrolle wurde in (B) EGI-1 Zellen 2 h nach ZnPc-PDT (5 μ M/10 J/cm²) eine deutliche Induktion der ROS-Bildung im Zytoplasma (orange) und im Kern/Mitochondrium (grün) beobachtet. (C) 2 h nach der PDT mit Pc32 (5 μ M/10 J/cm²) wurde nur eine geringfügige Entstehung von ROS im Zytoplasma (orange) und im Kern/Mitochondrien (grün) sichtbar. Bei den TFK-1 Zellen wurde im Vergleich zur (D) Kontrolle 2 h nach (E) ZnPc-PDT (5 μ M/10 J/cm²) eine deutliche Induktion der ROS-Generierung im Zytoplasma (orange) und im Kern/Mitochondrium (grün) erfasst. (F) 2 h nach der Pc32-PDT (5 μ M/10 J/cm²) wurde wiederum nur eine minimale ROS-Entstehung beobachtet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Vergrößerung, x40. Originalpublikation 1, Figure 4, Schmidt *et al.*, 2018, Int J Mol Med. (5).

4. 4. Zytotoxische Effekte nach ZnPc- und Pc32-PDT

Direkte zytotoxische Effekte durch photoaktiviertes ZnPc bzw. Pc32 wurden über die Freisetzung der intrazellulären Laktatdehydrogenase (LDH) aus Cholangiokarzinomzellen in den Überstand bestimmt. LDH fungierte hier als Marker zur relativen Quantifizierung der PDT-induzierten Schädigung der zellulären Integrität der behandelten Tumorzellen.

Beide Cholangiokarzinomzelllinien zeigten eine zeit- und konzentrationsabhängige LDH-Freisetzung im Anschluss an die PDT mit ZnPc und Pc32. In EGI-1 Zellen wurde eine maximale LDH-Freisetzung von 34,8% 6 h nach ZnPc-PDT mit 5 μM ermittelt. In TFK-1 Zellen fiel die maximale LDH-Freisetzung unter gleichen

Versuchsbedingungen mit ~17,8% zwar deutlich schwächer aus, belegte aber dennoch eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung der Behandlung (Abb. 10 A, B). Demgegenüber zeigte sich 6 h nach Pc32-PDT eine vergleichsweise deutlich geringere LDH-Freisetzung in EGI-1 (9,5%) und TFK-1 Zellen (8,5%) (siehe Abb. 10 C, D). Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den antiproliferativen Effekten der beiden Photosensibilisatoren bei der PDT von Cholangiokarzinomzellen und deuten darauf hin, dass die im Vergleich mit der Pc32-basierten PDT größere zytotoxische Potenz der ZnPc-basierten PDT einen wichtigen Faktor für die größere antiproliferative Effektivität darstellt. Die Zytotoxizität wurde durch Berechnung des

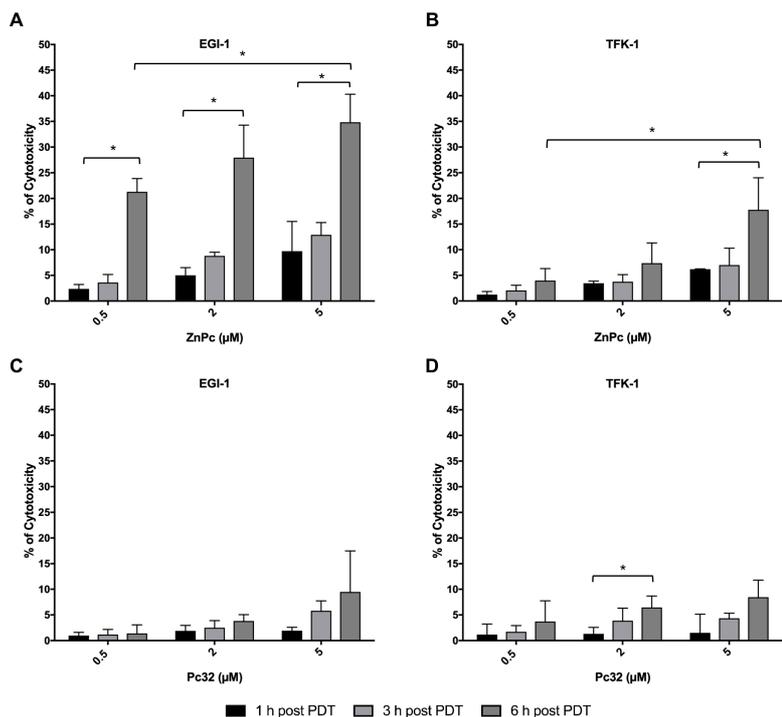


Abbildung 10. Direkte Zytotoxizität der PDT mit ZnPc und Pc32 in Cholangiokarzinomzellen. Die ZnPc-PDT (0,5-5 $\mu\text{M}/10 \text{ J}/\text{cm}^2$) induzierte bei (A) EGI-1 und (B) TFK-1 Zellen eine höhere zeit- und dosisabhängige LDH-Freisetzung im Vergleich zur (C, D) LDH-Freisetzung nach PDT mit Pc32 (0,5-5 $\mu\text{M}/10 \text{ J}/\text{cm}^2$). Die Daten werden als Prozentsatz (Mittelwert \pm SD) verglichen mit den unbehandelten Kontrollen deren Wert 0% ausmachte sowie der maximalen LDH-Freisetzung der mit Triton-X-100 lysierten Zellen, deren Wert 100% betrug, angegeben. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Ungepaarter, zweiseitiger t-test * $p < 0,05$ Zytotoxizität 1 vs. 6 h post-PDT bzw. 0,5 vs. 5 μM 6 h nach PDT. Originalpublikation 1, Figure 5, Schmidt *et al.*, 2018, Int J Mol Med. (5).

Prozentsatzes der LDH-Freisetzung in der behandelten Probe bestimmt, verglichen mit der LDH-Freisetzung der unbehandelten Zellen, deren Wert 0% betrug, und der maximalen LDH-Freisetzung der Triton X-100 lysierten Zellen, deren Wert 100% ausmachte (32).

4. 5. Apoptoseinduktion durch ZnPc-PDT

Da ZnPc nachweislich einen größeren Einfluss auf den oxidativen Stress, die direkte Zytotoxizität und die Proliferationshemmung von Cholangiokarzinomzellen besitzt als Pc32, wurden die weiterführenden Charakterisierungen vorwiegend mit ZnPc als Photosensibilisator für die PDT bei Cholangiokarzinomzellen durchgeführt.

Neben zytotoxischer Zellschädigung kann die PDT-induzierte ROS-Bildung auch durch Beeinträchtigung der mitochondrialen Integrität, Apoptose als programmierte Form des Zelltodes einleiten.

8 h nach ZnPc-PDT wurde in den Cholangiokarzinomzellen eine 26- (EGI-1) bzw. 6-fache Erhöhung (TFK-1) der Caspase-3-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen. 24 h nach PDT zeigte sich eine schwächere, jedoch immer noch deutliche Induktion einer 9- (EGI-1) beziehungsweise 4-fachen Erhöhung der Caspase-3-Aktivität (Siehe Abb. 11 A, B). In den ösophagealen Kyse-140 Zellen führte die ZnPc-PDT zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Zunahme der Caspase-3-Aktivität um das 15-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 3 bis 6 h nach PDT (siehe Abb. 12 A). Die Caspase-3 stellt ein Effektorenzym der Apoptose dar, welches unter anderem an der Spaltung zellulärer Bestandteile innerhalb des programmierten Zelltods beteiligt ist (28). Die beobachtete Aktivitätssteigerung spricht demzufolge für die Induktion intrazellulärer Signalkaskaden, die zur Apoptose führen.

Western Blot Analysen beteiligter pro- und antiapoptotischer Proteine ergaben für ZnPc-PDT von EGI-1 Zellen eine zeit- und konzentrationsabhängige Expressionszunahme des proapoptotischen Proteins Bax um das 2,45-fache gegenüber der unbehandelten Kontrolle bei gleichzeitiger Abnahme des antiapoptotischen Proteins Bcl-2, dessen Expression gegenüber der Kontrolle auf das 0,45-fache reduziert wurde. Bei TFK-1 Zellen zeigten sich entsprechende Effekte später und weniger stark ausgeprägt. 24 h nach PDT wurde eine Induktion des proapoptotischen Bax auf das ca. 1,5 -fache der Kontrolle bei gleichzeitiger Suppression von Bcl-2 auf das 0,8-fache festgestellt (siehe Abb. 11 D, E).

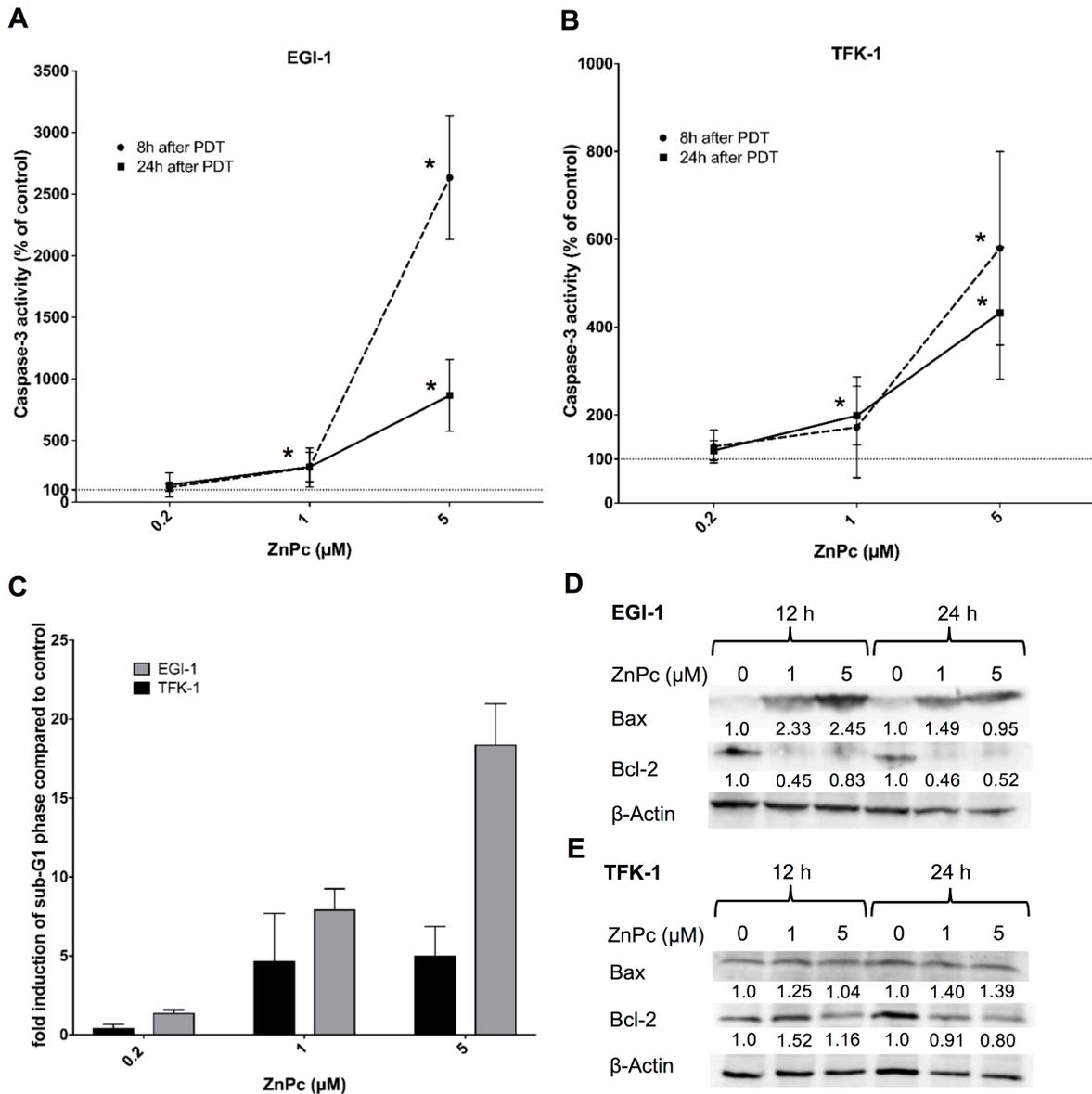


Abbildung 11. Apoptoseinduktion in Cholangiokarzinomzellen durch die PDT mit ZnPc. 8 und 24 h nach PDT mit ZnPc (0,2-5 μM) wurde zeit- und dosisabhängige Aktivitätssteigerung der Effektor-Caspase-3 in (A) EGI-1 und (B) TFK-1 Zellen gemessen. (C) Ein dosisabhängiger Anstieg des apoptotischen sub-G1-Peaks wurde durch FACS-basierte Messung der Veränderungen des hypoploiden DNA-Gehalts 24 h nach ZnPc-PDT-Behandlung in EGI-1 und TFK-1 Zellen bestimmt. Die Western Blot-Analyse der Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax und des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 erfolgte nach 12 und 24 h in (D) EGI-1 und € TFK-1 Zellen. Die densitometrische Analyse mit ImageJ zeigte die relative Zunahme beziehungsweise Abnahme der Proteinexpression der pro- und antiapoptotischen Proteine Bax und Bcl-2 nach ZnPc-PDT, normalisiert auf β -Aktin. Die Daten werden als Prozentsatz (Mittelwert \pm SD) der unbehandelten Kontrollen angegeben. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Ungepaarter, zweiseitiger t-test * $P < 0,05$ Caspase-3-Aktivität 8 oder 24 h nach der PDT vs. Kontrolle. Originalpublikation 1, Figure 6, Schmidt *et al.*, 2018, Int J Mol Med. (5).

Analog zu den Cholangiokarzinom-Zellmodellen wurde auch in den ösophagealen Zellmodellen eine zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme der Expression von Bax (maximal 1,75-fache Expression; 10 μ M) bei gleichzeitiger Expressionsabnahme von Bcl-2 (~0,1-fache Expression; 10 μ M) detektiert. (siehe Abb. 12 C).

Da das Gleichgewicht des pro-apoptotischen Proteins Bax und des anti-apoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 eine entscheidende Rolle in der Induktion von mitochondrial vermittelter Apoptose spielt (5,29,30), deuten die erhobenen Daten auf die Induktion Caspase-3-abhängiger Apoptose über den intrinsischen/mitochondrialen Signalweg hin.

Als zusätzlicher Marker der ZnPc-PDT induzierten Apoptose wurde bei Cholangiokarzinomzellen der konzentrationsabhängige Anstieg der sich in der sub-G₁-Phase befindlichen Zellen mittels FACS Analysen bestimmt. Hierbei zeigten EGI-1 einen ausgeprägten (ca. 18-fachen) und TFK-1 Zellen einen ebenfalls deutlichen, aber geringer ausfallenden Anstieg (ca. 5-fach) der sub-G₁-Population im Vergleich zur Kontrolle (siehe Originalpublikation 1, Abbildung 6 C, Seite 58). Ein Anstieg der Zellpopulation in der hypoploiden sub-G₁-Phase entsteht durch Caspase-bedingte DNA-Fragmentierung sowie den Verlust zellulärer Bestandteile durch Abschnürung sogenannter „Apoptosekörperchen“ (apoptotic bodies) (28), die im weiteren fluoreszenzmikroskopisch (LIVE/DEAD Assay) detektiert wurden.

Hierbei wurden die in den Proliferationsuntersuchungen (Kap. 4.2.) und Toxizitätsstudien (Kap. 4.4.) festgestellten Effekte bestätigt (siehe Abb 12 B). Apoptotische Zellen erschienen zusammengeschrumpft, amorph und wiesen apoptosespezifische Membranausstülpungen/Abschnürungen in Form von grün gefärbten Apoptosekörperchen auf (28). Die Ergebnisse bilden damit ein morphologisches Korrelat zu den oben beschriebenen Ergebnissen und verfestigen das Bild der apoptoseinduzierenden Wirkung der ZnPc-PDT bei den untersuchten gastrointestinalen Karzinomzellmodellen.

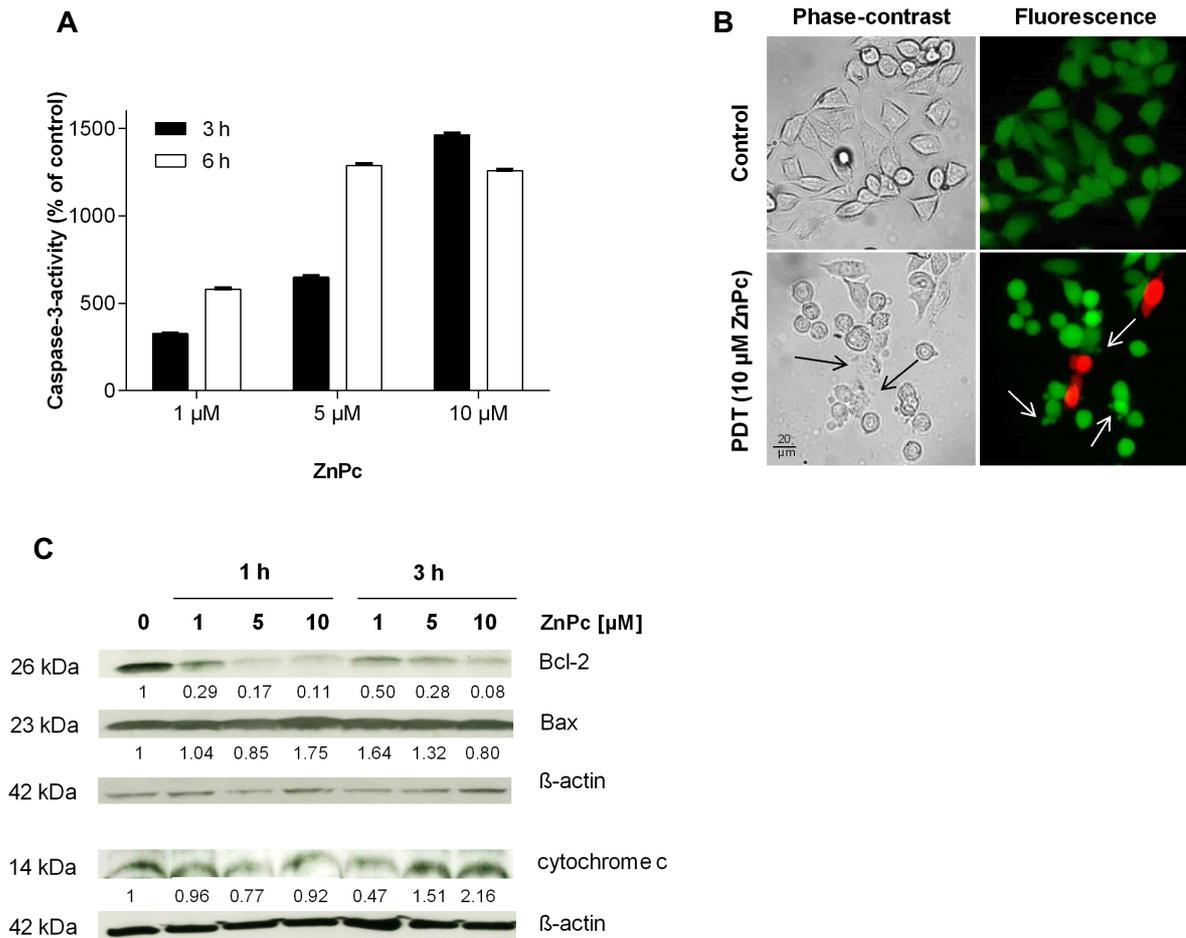


Abbildung 12. Apoptoseinduktion der ZnPc-PDT in Kyse-140 Ösophaguskarzinomzellen. (A) 3 und 6 h nach PDT wurde ein dosisabhängiger Anstieg der Caspase-3-Aktivität um das ≤ 15 -Fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrollen beobachtet. (B) 6 h nach ZnPc-PDT zeigte sich im fluoreszenzmikroskopischen LIVE/DEAD-Assays die Bildung apoptotischer Körper (weiße Pfeile) sowie ein Schrumpfen und Abflachen Zellen. Lebende Zellen sind grün, tote Zellen rot gefärbt. (C) Es zeigte sich eine Expressionszunahme der pro-apoptotischen Proteine Cytochrom C und Bax sowie eine Abnahme des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 im Vergleich zur unbehandelten, bestrahlten Kontrolle 1 und 3 h nach Behandlung in der densitometrischen Western Blot-Analyse mit ImageJ. Die Daten werden als Prozentsatz (Mittelwert \pm SD) der unbehandelten Kontrollen angegeben. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Originalpublikation 2, Figure 6, Kuzyniak *et al.*, 2017, Int J Oncol. (22)

4. 6. Zellzyklusinhibition durch ZnPc-PDT

ZnPc-PDT induzierte Veränderungen des Zellzyklus von Cholangiokarzinomzellen wurden mittels propidiumiodidbasierter Durchflusszytometrie und Expressionsuntersuchung der Zellzykluspromotoren Cyclin D1 und Cyclin B1 evaluiert.

Dabei ergab sich in EGI-1 Zellen ein konzentrationsabhängiger Arrest in der G₀/G₁-Phase mit konsekutiver Abnahme von Zellen in der G₂/M-Phase und Expressionsabnahme des

Zellzykluspromotors Cyclin D1, welcher in der Transition von G₁- zur S-Phase wirkt (siehe Abb. 13 A, C und E) (22). In TFK-1 Zellen wurde ein G₂/M-Phasenarrest beobachtet. Hier erfolgte eine konzentrationsabhängige Abnahme an Zellen in G₂/M-Phase bei gleichzeitiger Expressionsabnahme von Cyclin B1, welches als Promotor der G₂- zu-M-Phasentransition wirkt (siehe Abb. 13 B, D, F) (5,20).

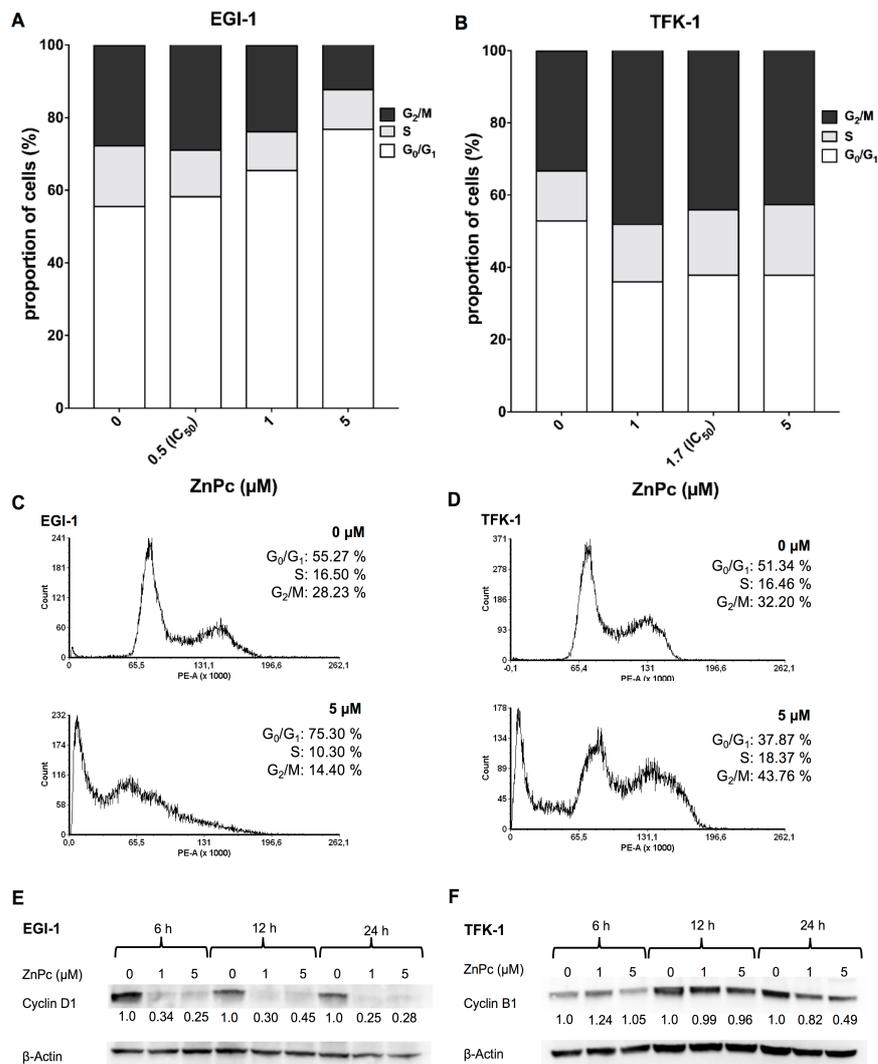


Abbildung 13. Auswirkungen der ZnPc-PDT auf den Zellzyklus von Cholangiokarzinomzellen. (A) Mittels Propidiumiodid-basierter FACS-Analyse der Zellzyklusverteilung wurde eine ZnPc-PDT induzierte dosisabhängige Zunahme von EGI-1 Zellen in der G₀/G₁-Phase, mit einer entsprechenden Abnahme von Zellen in der G₂/M-Phase 24 h nach der Behandlung beobachtet. (B) In TFK-1-Zellen zeigte sich eine Zunahme der Zellen in der G₂/M-Phase und einer Abnahme der Zellen in der G₀/G₁-Phase. (C,D) Gezeigt sind entsprechende Histogramme inklusive hypoploidem sub-G₁-Peaks apoptotischer Zellen. (E) EGI-1 Zellen zeigten eine abnehmende Expression von Cyclin D1 im Vergleich zur Kontrolle in der densitometrischen Western Blot-Analyse mit Image J. (F) TFK-1 Zellen offenbarten eine Abnahme der Expression von Cyclin 24 h nach Behandlung. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Versuche. Originalpublikation 1, Figure 7, Schmidt *et al.*, 2018, Int J Mol Med. (5).

4. 7. Antineoplastische Effekt der PDT mit ZnPc *in vivo*

Mittels eines modifizierten Chorioallantoismembran (CAM)-Assays mit tumortragenden CAMs wurde der antitumorale Effekt der ZnPc-PDT bei Ösophaguskarzinom-Tumoren untersucht. Tumorplaques aus 1×10^6 Kyse-140 Zellen wurden auf der CAM kultiviert und anschließend für 24 Std. mit $10 \mu\text{M}$ ZnPc inkubiert. 72 Std nach Bestrahlung mit 10 J/cm^2 wurden die Tumorplaques exzidiert und gewogen.

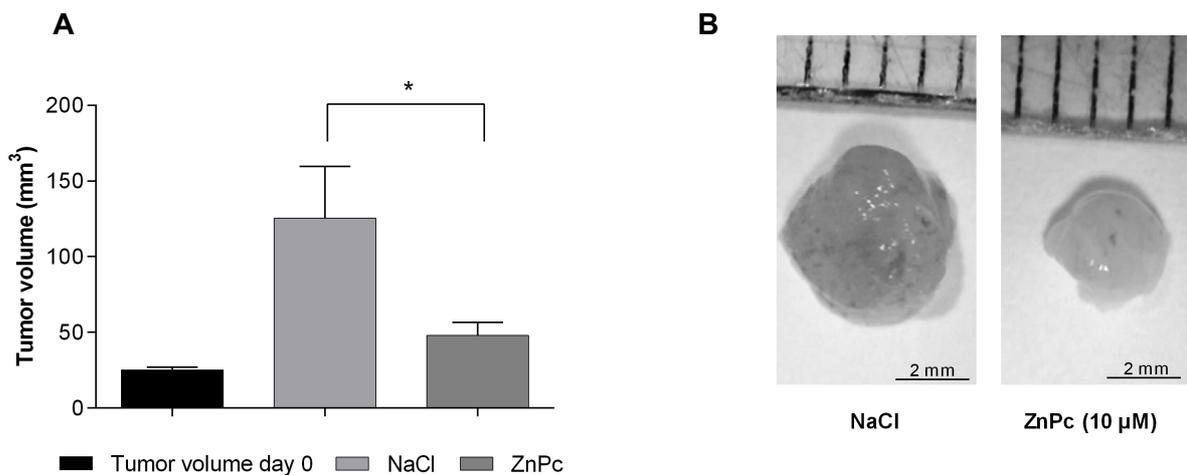


Abbildung 14. Antineoplastische Wirksamkeit der ZnP-PDT in ösophagealen Tumorplaques. Auf der Chorionallantoismembran (CAM) befruchteter Hühnereier angezüchtete ösophageale Tumorplaques aus Kyse-140 Zellen wurden mit ZnPc ($10 \mu\text{M}/24 \text{ h}$) inkubiert und bestrahlt (10 J/cm^2). (A) 72 h nach der PDT konnte eine signifikante Verkleinerung ($>70 \%$) der mit ZnPc-PDT behandelten Tumorplaques im Vergleich zur unbehandelten, beleuchteten Kontrolle. (B) Dieses Ergebnis spiegeln die repräsentativen Bilder der mit NaCl behandelten Kontrolle sowie der mit ZnPc-behandelten Ösophaguskarzinom-Plaques 72 h nach der PDT wider. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM von 6 unabhängigen Versuchen. Ungepaarter, zweiseitiger t-Test $*p < 0.001$. Originalpublikation 2, Figure 7 Kuzyniak *et al.*, 2017, *Int J Oncol.* (22).

Ohne ZnPc-PDT konnte bei der nur mit NaCl-behandelten und bestrahlten Kontrolle ein durchschnittliches Tumorplaquewachstum von $\sim 25 \text{ mm}^3$ an Tag 0 auf 122 mm^3 nach 72 h beobachtet werden. Nach PDT mit ZnPc wurde hingegen ein signifikant geringeres Wachstum der Tumorplaques auf nur $\sim 47 \text{ mm}^3$ zu diesem Zeitpunkt beobachtet. Dies entspricht einem effektiven wachstumsinhibitorischen Effekt von $>70\%$ nach PDT mit $10 \mu\text{M}$ ZnPc im Vergleich zur bestrahlten NaCl-Kontrolle (siehe Abb. 14). Das Ergebnis spricht für die antineoplastische Wirksamkeit der ZnPc-PDT *in vivo* und bestätigt die *in vitro* Ergebnisse bezüglich der durch die Behandlung induzierten Proliferationsinhibition (siehe Kap. 4.2.).

4. 8. Effekte der ZnPc- und Pc32-PDT auf die Vaskularisierung und Neoangiogenese *in vivo*

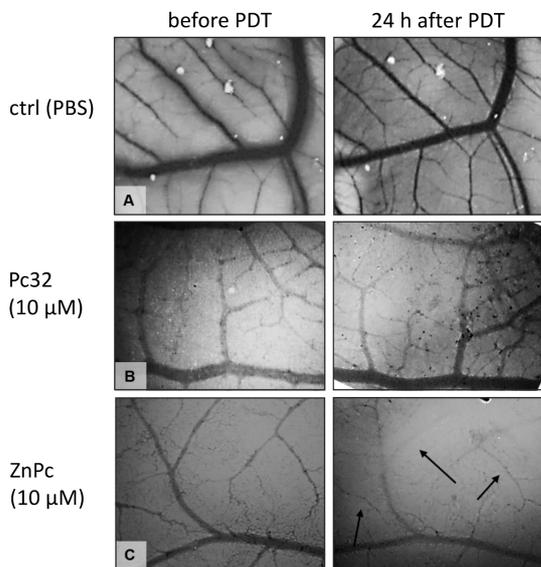


Abbildung 15. Bildung von Blutgefäßen der sich entwickelnden Hühner-Chorioallantoismembran (CAM) nach ZnPc- oder Pc32-PDT. Die Bilder zeigen repräsentative CAMs vor und 24 h nach PDT mit PBS (Kontrolle) (A), Pc32 (10 µM) (B) und ZnPc (10 µM) (C). Bei den Kontroll-CAMs und bei der mit Pc32 behandelten CAM präsentierte sich das Gefäßnetz homogen in antiparalleler Ausrichtung. 24 h nach Behandlung zeigte sich eine Neubildung von Blutgefäßen, wie anhand der Verzweigung der kleinen Blutgefäße zu sehen ist. Lediglich die PDT mit ZnPc induzierte eine Degeneration des Gefäßnetzes, was sich in Form von nicht perfundierten Regionen und Veränderungen in der Verzweigung der kleinen, versorgenden Gefäße zeigte (Pfeile). Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei CAMs pro Ansatz. Vergrößerung, x12. Originalpublikation 1, Figure 8, Schmidt *et al.*, 2018, *Int J Mol Med.* (5)

Ein weiterer möglicher Effekt der PDT stellt die Hemmung von tumorversorgenden Gefäßneubildungen im Sinne antiangiogener Effekte dar. Mithilfe des Chorioallantoismembran (CAM) Assays von befruchteten Hühnereiern wurde der Einfluss der ZnPc- und Pc32-PDT auf die Neoangiogenese sowie Vaskularisierung qualitativ *in vivo* untersucht. Die CAM wurde dafür in einem Areal von 5 mm Durchmesser am Tag 10 der Befruchtung mit 10 µM ZnPc oder Pc32 beimpft und schließlich nach 24-stündiger Inkubation bestrahlt.

In den Kontrollarealen fand eine Zunahme der Mikrovascularisierung und eine stetige Zunahme der Verästelung am distalen Ende der kleinen Gefäße statt. Die ZnPc-PDT resultierte im Vergleich zur Kontrolle in einer deutlichen Unterdrückung der Neubildung von Mikrogefäßen sowie zu einer Degeneration der bereits bestehenden Vaskularisierung. Dabei kam es zu einer Abnahme der Verzweigungsdichte und es entstanden nicht-perfundierte Areale. Die Pc32-PDT hingegen hatte keinen Einfluss auf die Vaskularisierung der CAM im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 15).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung von zwei neuartigen Photosensibilisatoren aus der Gruppe der metallsubstituierten Phthalocyanine, ZnPc und Pc32, für die PDT von Cholangio- und Ösophaguskarzinomen evaluiert.

Zytoplasmatische Akkumulation von ZnPc und Pc32 in Cholangio- und Ösophaguskarzinomzellen

Entscheidend für die Wirkung des Photosensibilisators im Rahmen der PDT ist neben dessen photophysikalischen und -chemischen Eigenschaften die zelluläre Aufnahme sowie sein intrazelluläres Verteilungsmuster, welches kern-, organellspezifisch und/oder vorwiegend zytoplasmatisch sein kann. Fabris *et al.* konnten die subzelluläre Akkumulation von Zinkphthalocyaninderivaten innerhalb des Golgi-Apparats nach 2 h Inkubation nachweisen, während eine mitochondriale Anreicherung erst nach 24 h gefunden wurde (31). Andere Silizium- und Zinkphthalocyanine akkumulieren hingegen vorwiegend in Lysosomen, im endoplasmatischen Retikulum oder der Zellmembran (30–32). Im Gegensatz dazu beobachteten wir nach 24 h eine vorwiegend zytoplasmatische Anreicherung der beiden untersuchten Photosensibilisatoren in Cholangio- und auch Ösophaguskarzinomzellen (siehe Kap. 4.1.). ZnPc offenbarte dabei eine prominentere Akkumulation in den Cholangiokarzinomzellen im Vergleich zu Pc32, obwohl deutlich höhere Konzentrationen an Pc32 eingesetzt wurden.

Bestätigung der fehlenden Dunkeltoxizität von ZnPc und Pc32

Eine obligate Voraussetzung eines Photosensibilisators im Rahmen der PDT besteht in der Abwesenheit von zytotoxischen Effekten ohne eine Photoaktivierung im Sinne einer Dunkeltoxizität, um gesundes, tumorfreies Gewebe nicht zu schädigen und das Auftreten von Nebenwirkungen zu vermeiden. Nach erfolgter Photoaktivierung sollte der Photosensibilisator jedoch einen nachhaltigen und effektiven antineoplastischen Effekt im photoaktivierten Tumorgewebe hervorrufen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass weder Pc32 noch ZnPc ohne Photoaktivierung einen dunkeltoxischen Effekt auf Cholangio- und Ösophaguskarzinomzellen ausüben (siehe Kapitel 4.2.). Die Ergebnisse meiner Arbeit stehen im Einklang mit einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe, in der die Dunkeltoxizität von ZnPc bei Zelllinien verschiedener Tumorentitäten untersucht wurde und in der ebenfalls keine zytotoxische Wirkung von nicht-photoaktiviertem ZnPc gefunden wurde (20). Außerdem sind die Ergebnisse

über die fehlende Dunkeltoxizität konkordant zu den Resultaten anderer Arbeiten über verschiedene ähnliche Metallophthalocyanine, wie Zhang *et al.* in ihrer Übersichtsarbeit darlegen (14). Ein divergierendes Ergebnis konnte durch Yslas *et al.* mit einem anderen ZnPc-Derivat aufgezeigt werden, welches zwar bei sehr niedrigen Dosen von 0,1 μM keine Dunkeltoxizität aufwies, bei etwas höheren Konzentrationen von 0,5 μM und einer Inkubationszeit von 24 h jedoch eine Proliferationsinhibition von etwa 30% in der Larynxkarzinom-Zelllinie Hep-2 bewirkte (33). Auch in den *in vivo* Evaluierungen am CAM-Modell wurde nach Injektion von ZnPc in venöse CAM-Gefäße keine dunkeltoxische Wirkung festgestellt. 24 h nach Injektion überlebten 100% der mit ZnPc behandelten Hühnerembryonen (siehe Kap. 4.2.). Zudem zeigten Biotolerabilitätsstudien an männlichen Wistar-Ratten, dass ZnPc auch im Säugetier keine dunkeltoxische Wirkung ausübt, da die Applikation von ZnPc nicht zu einer Änderung des Organkoeffizienten führte, welcher Inflamationsprozesse oder organspezifische Störungen anzeigt (22). Auch eine Änderung der Anzahl weißer Blutzellen, ein verändertes Nahrungsverhalten oder eine Gewichtsveränderung der Tiere wurde nicht beobachtet. Diese Ergebnisse sprechen für eine gute Biotolerabilität von ZnPc und bestätigen die *in vitro*-Ergebnisse bezüglich der fehlenden Dunkeltoxizität von ZnPc (siehe Kap. 4.2.).

ZnPc- und Pc32-PDT induzierte zytoplasmatische und nukleäre/mitochondriale ROS

Nach Photoaktivierung sollte der Photosensibilisator jedoch einen starken antineoplastischen Effekt auf das bestrahlte Tumorgewebe haben. Eine zentrale Voraussetzung für die Wirksamkeit der PDT stellt dabei die effektive Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dar, durch welche der Tod der Tumorzellen eingeleitet wird (14). Obwohl wir eine vorwiegend zytoplasmatische Anreicherung der beiden untersuchten Photosensibilisatoren nach 24 h beobachteten (siehe Kap. 4.1.), wurde nach ZnPc-PDT neben der Induktion von ROS im Zytoplasma auch eine deutliche ROS-Induktion in den Mitochondrien und dem Nukleus beobachtet (siehe Kap. 4.3.). Dieses Ergebnis belegt das große Potenzial des Photosensibilisators, ROS zu generieren. Außerdem ist das ROS-Ergebnis im Einklang damit, dass die ZnPc-PDT Einfluss auf mitochondrial lokalisierte Regulationsproteine wie Bax oder Bcl-2 nimmt (siehe Kap. 4.5.). Dies ist kongruent zu Shao *et al.*, die in ihrer Arbeit über die photodynamische Wirkung von unsubstituiertem ZnPc bei HepG2 Leberkarzinomzellen eine Akkumulation in Mitochondrien und Lysosomen sowie eine dazu passende ROS-Entstehung mit nachfolgender mitochondrialer Apoptose beobachten konnten (34). Auch für andere Siliziumphthalocyanine, wie zum Beispiel Pc4, ist eine spezifisch mitochondriale Anreicherung und ROS-Induktion bekannt (3). Eine

zusätzliche Inkubation mit dem Antioxidans Vitamin C vor erfolgter ZnPc-PDT verursachte hingegen eine abgeschwächte ROS-Entstehung in Ösophaguskarzinomzellen (siehe Kap. 4.5.). Dies ist in Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Grimm *et al.*, die unter 8 h Vorinkubation mit Vitamin C bei der PDT mit dem Photosensibilisator ALA bei Melanomzellen eine abgeschwächte Wirksamkeit feststellten (35). Da die PDT-Wirkung maßgeblich davon abhängig ist, in welchem Maß ROS induziert werden, ist der Einfluss von Radikalfängern wie Vitamin C auch für den Einsatz innerhalb der Klinik relevant. Es liegt nahe, dass Patienten vor und während der Behandlung keine antioxidanzienreiche Nahrung oder Nahrungsergänzungsmittel zu sich nehmen sollten, was jedoch zunächst in entsprechenden *in vivo*-Untersuchungen genauer überprüft werden muss.

Die Pc32-PDT zeigte ebenfalls eine zytoplasmatische und mitochondriale/zytoplasmatische ROS-Entstehung. Diese fiel jedoch weniger prominent aus, was konkordant zu der geringer ausgeprägten Aufnahme ist (siehe Kap.4.1.).

ZnPc-PDT induzierte antiproliferative Effekte in Ösophagus- und Cholangiokarzinomzellen

Die Photoaktivierung von ZnPc im Rahmen der PDT-Behandlung führte zu einer ausgeprägten sowie nachhaltigen zeit- und konzentrationsabhängigen Proliferationsinhibition in Ösophagus- sowie Cholangiokarzinomzellen mit einer Reduktion der Zellzahl um >90% (siehe Kap.4.2.). Insgesamt konnte dabei eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀-Konzentration) im unteren mikromolaren Bereich ermittelt werden, was für ein hohes antiproliferatives Potenzial von ZnPc spricht (siehe Tabelle 1). Die vielversprechenden Ergebnisse bezüglich des antiproliferativen Effekts konnten auf das *in vivo* CAM-Modell übertragen werden. Dabei bewirkte die ZnPc-PDT der behandelten Tumorplaques aus Kyse-140 Zellen eine Verlangsamung des Wachstums und eine signifikante Volumenreduktion (>70%) im Vergleich zur Kontrolle 72 h nach PDT (siehe Kap. 4.8.) Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte der klinisch häufig eingesetzte Photosensibilisator ALA in einer vorherigen *in vitro* Untersuchung meiner Arbeitsgruppe die Proliferation beider Ösophaguskarzinom-Zelllinien nur bei wesentlich höheren IC₅₀-Werten (182±8 µM in Kyse-140 und 285±10 µM in OE-33 Zellen) hemmen (Vergleich mit Tabelle 1.) (36). Zudem erfolgte die Hemmung ohne einen anhaltenden antiproliferativen Effekt. Für das Cholangiokarzinom wurde ein entsprechendes Resultat auf klinischer Ebene von Zoepf *et al.* gezeigt, wobei die PDT mit ALA trotz anfänglich sichtbarer Tumornekrose keine anhaltende Befreiung von biliären Stenosen bewirken konnte (17). Im Gegensatz dazu konnte in der

vorliegenden Arbeit die ZnPc-PDT einen effektiven und vor allem nachhaltigen antiproliferativen und antineoplastischen Effekt schon bei niedrigen Konzentrationen hervorrufen, ohne dass eine Replikation beziehungsweise größere Zunahme der Tumormasse 72 h nach erfolgter PDT im Vergleich zu Tag 0 beobachtet werden konnte. Dies deutet auf das außerordentliche Potenzial und die vorteilhaften Wirkungseigenschaften von ZnPc als Photosensibilisator für die PDT des Cholangio- und Ösophaguskarzinoms hin. Die Resultate bezüglich des antiproliferativen Effekts von ZnPc stehen des Weiteren im Einklang zur Literatur bezüglich anderer Derivate des Photosensibilisators, welche an verschiedenen Zelllinien getestet wurden. So konnten Machacek *et al.* mit ihren (2-(triethylammonio)-ethyl)-sulfony-substituierten ZnPc-Derivaten ebenfalls IC₅₀-Konzentrationen im unteren mikromolaren Bereich in 3T3, Hela, SK-MEL-28 und HCT116 Zellen erzielen (37).

Abhängigkeit der antiproliferativen Effekte der ZnPc-PDT von der Inkubationszeit des Photosensibilisators

Das individuelle PDT-Protokoll, sowie die Inkubationszeit des Photosensibilisators oder auch die optimale Konzentration haben einen maßgeblichen Einfluss auf das Therapie-Outcome und variieren zwischen den einzelnen Tumorentitäten. Dabei ist das Zeitintervall zwischen der Applikation des Photosensibilisators und der nachfolgenden Bestrahlung aufgrund des Photosensibilisator- und zellspezifischen Aufnahmeverhaltens essentiell für die Therapie. In der vorliegenden Arbeit wurde der antiproliferative Effekt der PDT nach verschiedenen langen Inkubationszeiträumen mit dem Photosensibilisator evaluiert. Dabei führte die ZnPc-PDT schon nach kurzen Inkubationszeiträumen (10-16 h) zu einer sichtbaren Reduktion der Zellzahl in Cholangio- und Ösophaguskarzinomzellen, sofern Konzentrationen >2,5 µM eingesetzt wurden. Eine ausgeprägte und anhaltende Wachstumsinhibition der PDT bei niedrigen Konzentrationen (<2,5 µM) wurde erst nach einer Inkubationszeit von 24 h erreicht (siehe Kap. 4.2.). Die Abhängigkeit der Wachstumsinhibition von der Inkubationslänge konnte am deutlichsten bei den EGI-1 Zellen beobachtet werden. EGI-1 Zellen wiesen den niedrigsten ZnPc-IC₅₀-Wert (0,5±0,17 µM) innerhalb der getesteten Zelllinien nach 24 h Inkubation auf. Auf der anderen Seite konnten die EGI-Zellen durch eine PDT mit ZnPc-Konzentrationen von bis zu 2,5 µM und einer kurzen Inkubationszeit von nur 10 Stunden allenfalls nur marginal in ihrem Wachstum gehemmt werden. Zudem ist interessant, dass eine Verlängerung der Inkubationsperiode auf 30 h zu keinem stärkeren antiproliferativen Effekt bei Ösophaguskarzinomzellen führte als eine 24-stündige Inkubation, da ab diesem Zeitpunkt offenbar eine maximalwirksame Anreicherung des Photosensibilisators in

den Tumorzellen erreicht war (siehe Kap. 4.2.). Im Unterschied dazu konnten Shao *et al.* und Machacek *et al.* eine maximale Aufnahme ihrer ZnPc-Verbindungen in HepG2 beziehungsweise HeLa Zellen nach einer Inkubationsperiode von 12 h beobachten, während Velazquez *et al.* eine maximale Aufnahme von unsubstituiertem ZnPc nach einer 18 h-Inkubation in T 98G Glioblastomzellen zeigen konnten (37–39). Es erscheint demnach von Vorteil, das individuelle PDT-Protokoll an den Photosensibilisator und die spezifischen Tumorzellecharakteristika anzupassen, um eine Balance zwischen vorzugsweise kurzen Inkubationszeiträumen, niedrigen Konzentrationen und einem potenten und nachhaltigen wachstumsinhibitorischen Effekt der PDT zu erzielen.

ZnPc-PDT vermittelte Expressionsabnahme des proliferationsfördernden MAP-Kinaseenzym ERK $\frac{1}{2}$

Im Zusammenhang mit der effektiven Proliferationsinhibition durch die ZnPc-PDT konnte eine Expressionsabnahme des MAP-Kinaseenzym (englisch: mitogen-activated protein kinase) ERK $\frac{1}{2}$ in den beiden Cholangiokarzinomzelllinien EGI-1 und TFK-1 gezeigt werden (siehe Kap. 4.2.). Die Expressionsabnahme von ERK $\frac{1}{2}$ verdeutlicht, dass die ZnPc-PDT ihre antiproliferative Wirkung auch über die Herunterregulation für die Tumorzellen überlebenswichtiger Signalwege entfaltet (20,27). ERK $\frac{1}{2}$ stellt ein wesentliches Protein innerhalb der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade dar, welche an der Induktion wichtiger intrazellulärer Prozesse beteiligt ist. Durch Aktivierung der Signalkaskade wird unter anderem das Voranschreiten des Zellzyklus, die zelluläre Differenzierung, der Stoffwechsel, die Induktion zellulärer Überlebensprogramme sowie die Zellproliferation vorangetrieben (27). Die Expressionsabnahme von ERK $\frac{1}{2}$ und die damit verbundene Proliferationshemmung spiegelt sich in der effektiven Hemmung der Reproliferation von Zellen, welche dem Zelltod zunächst entgehen konnten wider (siehe Kap. 4.2). Im Vergleich dazu konnten Weijer *et al.* in der Cholangiokarzinom Zelllinie SK-ChA-1 nach PDT mit einem liposomal eingekapselten ZnPc eine Hochregulation verschiedener proliferativer Signalwege, inklusive der MAP-Kinase-Signalkaskade nachweisen (40). Eine aktivierende Mutation von Protoonkogenen der MAP-Kinase-Signalkaskade wie beispielsweise k-Ras stellt in gastrointestinalen Tumorentitäten wie dem kolorektalen Karzinom, Pankreaskarzinom oder Cholangiokarzinom zudem einen häufigen Mechanismus der Tumorgenese durch unkontrollierte Zellteilung dar (27). So tritt beispielsweise in 31% aller Cholangiokarzinome eine aktivierende k-Ras Mutation auf, welche auch in EGI-1 Zellen, nicht aber in TFK-1 Zellen vorhanden ist (27,41). Die unterschiedliche Mutation von Protoonkogenen des MAP-Kinase-Signalwegs in Verbindung

mit der durch ZnPc-PDT induzierten Expressionsreduktion von ERK $\frac{1}{2}$ bietet unter anderem eine Erklärung für das sensiblere Ansprechen der EGI-1 Zellen (IC_{50} : $0,5\pm 0,17 \mu M$) im Vergleich zu TFK-1 Zellen (IC_{50} : $1,7\pm 0,13$) auf die ZnPc-PDT. Wie zudem durch Schmitz et al.

Unterschiede des proliferationsinhibitorischen Effekts der Pc32-PDT innerhalb der Cholangiokarzinomzelllinien

Die PDT mit dem neuartigen Siliziumphthalocyanin Pc32 führte innerhalb der Cholangiokarzinomzelllinien nur in den weniger differenzierten EGI-1 Zellen zu einem anhaltenden sowie zeit- und konzentrationsabhängigen antiproliferativen Effekt. Im Vergleich zur ZnPc-PDT fiel dieser jedoch weniger potent aus und konnte eine vergleichbare Reduktion der Zellzahl nur mithilfe höherer Konzentrationen bewirken. Die PDT mit Pc32 bewirkte keinen deutlichen oder nachhaltigen antiproliferativen Effekt bei den differenzierten TFK-1 Zellen. Diese konnten sogar nach einer anfänglichen Reduktion der Zellzahl in etwa auf das Niveau der Kontrolle reproglieren (siehe Kap. 4.2.).

Das unterschiedliche Ansprechen der Cholangiokarzinomzelllinien auf die Pc32-PDT (siehe Kap. 4.2.) sowie die geringe Effektivität im Vergleich zur ZnPc-PDT ist von Bedeutung, da andere Siliziumphthalocyanine in gastrointestinalen Tumorentitäten, wie dem kolorektalen Karzinom, potente antitumorale Effekte zeigen konnten. So konnten Whitacre *et al.* im SW480-Xenograft-Mausmodell nach der PDT mit dem Siliziumphthalocyanin Pc4 eine nahezu vollständige Ablation der implantierten Kolonkarzinome nachweisen (29). Des Weiteren wurden in der Arbeit von Lo *et al.* IC_{50} -Werte im submikromolaren Bereich nach PDT mit verschiedenen Siliziumphthalocyanin-Derivaten innerhalb des HepG2-Leberkarzinomzellmodells ermittelt (42). Die unterschiedliche Sensibilität der beiden Cholangiokarzinomzelllinien bei der PDT mit Pc32 und ZnPc ist insofern interessant, da es bekräftigt, dass innerhalb der molekularen Wirkungsmechanismen der Phthalocyanin-basierten PDT zellspezifische Unterschiede bestehen, die für ein maßgeblich verschiedenes Therapieoutcome verantwortlich sein können. Da die Pc32-PDT jedoch nur in einer von zwei Cholangiokarzinomzelllinien eine nachhaltige Wachstumsinhibition erzielen konnte, scheint zumindest ein nicht an die spezifischen Tumorzellcharakteristika angepasster Einsatz des Photosensibilisators innerhalb der PDT des Cholangiokarzinoms auszuschließen.

Hervorrufen direkter zytotoxischer Effekte durch die PDT mit ZnPc und Pc32

Der PDT-induzierte Zelltod wird durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) induziert und führt zum Absterben der Tumorzellen durch Apoptose und/oder Nekrose (31). Mithilfe der Zytotoxizitätsmessungen (LDH-Release Assay) konnte in den Cholangiokarzinomzelllinien sowohl für die Pc32- als auch ZnPc-PDT ein zeit- und dosisabhängiger, direkt zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden (1-6 h nach PDT) (siehe Kap. 4.4.). In Übereinstimmung mit Challa und Chan kann die PDT-induzierte LDH-Ausschüttung als Zeichen einer primären Nekrose durch Störung der zellulären Membranintegrität interpretiert werden (43). Die Zytotoxizitätsergebnisse stehen damit im Einklang mit Hodgkinson *et al.* sowie Manoto *et al.*, die in ihren Arbeiten eine konzentrationsabhängige LDH-Freisetzung nach der PDT mit ZnPcS_{mix}, einem Gemisch aus sulfonierten ZnPc-Derivaten, in HeLa Zervixkarzinomzellen, A549 Lungenkarzinomzellen und DLD-1 Kolonkarzinomzellen zeigen konnten (44,45). Im Gegensatz dazu offenbarte sich in T98G Glioblastomzellen nach PDT mit unsubstituiertem ZnPc in der Arbeit von Velazques *et al.* keine Induktion eines nekrotischen Zelltods, sondern ausschließlich Apoptose (39). Der zytotoxische Effekt der PDT mit Pc32 als Photosensibilisator war im Vergleich zur ZnPc-PDT jedoch deutlich schwächer ausgeprägt (siehe Kap. 4.4.). Dieses Ergebnis passt zu jenen Resultaten, in denen die Effekte der beiden Photosensibilisatoren miteinander verglichen wurden. Auch bei der Aufnahme in die Tumorzellen, der Induktion von ROS, sowie der antiproliferativen Potenz zeigte sich eine stets schwächere Wirksamkeit von Pc32 im Vergleich zu ZnPc. Die Ergebnisse für Pc32 stehen allerdings im Gegensatz zu Forschungsergebnissen anderer Gruppen (3,22,37). Büyükekşi *et al.* beurteilen Silizium-Phthalocyanine aufgrund ihrer photochemischen und -physikalischen Eigenschaften als die tauglichsten Metallophthalocyanine für die PDT-Anwendung. Sie konnten im Zuge ihrer Arbeit über die Synthese und die photochemische- und physikalische Charakterisierung von Pc32 eine starke Entstehung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff (¹O₂) nach Bestrahlung mittels Fluoreszenznachweis über 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) beobachten. Die Ausmaß der ¹O₂ Bildung lag mit einer Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute ($\Phi\Delta$) von $\Phi\Delta=0,61$ in etwa im Bereich von dem in dieser Arbeit eingesetzten ZnPc mit $\Phi\Delta=0,64$ in den DPBF-Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe (19,21). Diese vielversprechenden Ergebnisse bezüglich der vorteilhaften photophysikalischen- und chemischen Eigenschaften von Pc32 konnten in den durchgeführten *in vitro*-Überprüfungen anhand des Cholangiokarzinom-Zellmodells jedoch nicht bestätigt werden.

Induktion von Apoptose in Cholangio- und Ösophaguskarzinomzellen durch die PDT mit ZnPc

Neben PDT-induzierter Nekrose ist bekannt, dass auch die inflammationsfreie geordnete Eliminierung der Tumorzellen durch PDT-induzierte Apoptose eine wichtige Rolle bei der antitumoralen Wirkung dieser Behandlungsmethode spielt. In der vorliegenden Studie wurden deshalb apoptotische Effekte im Rahmen der ZnPc-PDT von Cholangio- und Ösophaguskarzinomzellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass ZnPc die intrinsische/mitochondriale Apoptose mit korrespondierenden Expressionsveränderungen der regulatorischen Proteine Bax und Bcl-2 in Ösophagus- und Cholangiokarzinomzellen induziert. Es konnte eine konzentrationsabhängige Expressionssteigerung des proapoptotischen Proteins Bax bei gleichzeitig verringerter Expression des antiapoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 gezeigt werden. Weiterhin kam es zu einem konsekutiven Anstieg der Caspase-3-Aktivität (Kap. 4.5.) (30). Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten morphologische Veränderungen in Form der charakteristischen Apoptosekörper (englisch: apoptotic bodies) in Ösophaguskarzinomzellen gezeigt werden. Zudem wurde der konzentrationsabhängige Anstieg von sich in der apoptosespezifischen sub-G₁-Phase befindlichen Zellen nachgewiesen (siehe Kap. 4.5.) (28,30). Dies steht in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, die sich mit den Zelltodmechanismen der phthalocyanin-basierten PDT bei verschiedenen Tumorentitäten beschäftigt haben, wie Mfou-Tynga und Abrahamse in ihrer Übersichtsarbeit über die Phthalocyanin-PDT vermittelten Zelltodmechanismen verdeutlichen (30). So konnten Fabris *et al.* zeigen, dass je nach ZnPc-Derivat, das dem dieser Arbeit ähnelt, entweder Nekrose (2 h Inkubationsperiode) oder Apoptose (24 h Inkubationsperiode) als hauptsächlicher Zelltodmechanismus ausgelöst wird (31). Die Art des induzierten Zelltods kann für das tumorspezifische PDT-Protokoll entscheidend sein. Ein vorwiegend nekrotischer Zelltod könnte laut Fabris *et al.* bei der Behandlung infiltrierender und/oder metastasierender Tumoren von Vorteil sein, da durch die ausgelöste Inflamationsreaktion eine systemische Immunantwort induziert wird und die PDT so zusätzlich über die Aktivierung körpereigener antitumoraler Mechanismen wirkt (31). Ein hauptsächlich apoptotischer und damit entzündungsfreier Zelltod könnte günstig sein, wenn es sich um eine *in situ*-Raumforderung handelt, bei der Phagozyten einen schlechten Zugang zum Gewebe haben oder aber wenn ein rasches Tumorwachstum die schnelle Beseitigung einer Obstruktion notwendig macht (3,11,31). In Bezug auf die ZnPc-PDT konnte in dieser Arbeit neben der effektiven Reduktion der Zellzahl und des Tumorumfanges sowohl ein direkter, zytotoxischer Effekt als auch

ein starker apoptotischer Effekt bei einer Inkubationsperiode von 24 h nachgewiesen werden. Diese Resultate stehen zudem im Einklang mit den Ergebnissen weiterer Arbeiten mit verschiedenen ZnPc-Derivaten und Zelllinien. Valli *et al.* konnten etwa die Induktion von direkter Zytotoxizität und zusätzlicher Einleitung von intrinsischer Apoptose, angezeigt durch eine Abnahme der Bcl-2-Expression bei gleichbleibender Bax-Expression und Caspase-3-Aktivierung, nach PDT mit einem ähnlichen ZnPc-Derivat in Melanomzellen nachweisen (46). Shao *et al.* konnten zudem ein gleichzeitiges Nebeneinander von apoptotischen und nekrotischen Prozessen nach der ZnPc-PDT von HepG2-Zellen zeigen, was den Ergebnissen dieser Arbeit entspricht (34). Das Cholangiokarzinom wird in den meisten Fällen erst in einem Stadium nachgewiesen, in dem es durch tumorbedingten Obstruktion der Gallenwege zur Cholestase kommt (7). Die damit verbundenen Komplikationen, wie Cholangitis, Sepsis und Leberversagen stellen die Haupttodesursachen der Cholangiokarzinom-Patienten dar (6). Auch bei dem Ösophaguskarzinom besteht eine Hauptindikation der PDT in der Reduktion von Obstruktionen der Speiseröhre durch fortgeschrittene Tumoren, welche unter anderem zur Dysphagie führen (10,13). In beiden Fällen ist die schnelle und nachhaltige Befreiung von der Obstruktion, jedoch auch ein langfristiger und nicht zur überschießenden Entzündungsreaktion führender antitumoraler Effekt entscheidend. Da die PDT mit ZnPc sowohl die Induktion des nekrotischen, als auch des apoptotischen Zelltods bewirken konnte, spricht dies für das Potenzial, zum einen obstruktive Prozesse aufzulösen und zum anderen die Aktivierung des Immunsystems bewirken zu können. Die nekroseinduzierte Immunaktivierung kann dabei gerade im Hinblick auf die palliative Behandlungssituation der meisten Patienten mit fortgeschrittenen und eventuell bereits metastasierten cholangiozellulären oder ösophagealen Tumoren von Vorteil sein (6).

Unterschiedliche ZnPc-PDT vermittelte Zellzyklusarreste in Cholangiokarzinomzellen

Ein weiterer entzündungsfreier Weg, die Tumorproliferation zu unterdrücken, besteht in der Inhibition des Zellzyklus. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellzyklusarrest in beiden Cholangiokarzinomzelllinien nach ZnPc-PDT beobachtet. EGI-1 Zellen zeigten dabei einen Arrest in der G₀/G₁-Phase und eine korrespondierende Expressionsverminderung des Zellzykluspromotors Cyclin D1. TFK-1 Zellen reagierten hingegen mit einem G₂/M-Phasenarrest und gleichzeitiger Expressionsreduktion von Cyclin B1 (siehe Kap. 4.6.). In einer vorherigen Arbeit konnte bereits ein Zellzyklusarrest der plattenepithelialen Ösophaguskarzinomzelllinie Kyse-70 in der G₀/G₁-Phase mit korrespondierender Expressionsreduktion von Cyclin D1 nachgewiesen werden (20). Auch in anderen Arbeiten mit verschiedenen Zelllinien bewirkte die

PDT mit ZnPc-Derivaten Zellzyklusarretierungen in verschiedenen Phasen. Konkordant zu TFK-1 Zellen konnten Shao *et al.* einen G₂/M-Phasenarrest in HepG2 Leberkarzinomzellen nachweisen (34). B16F0-Melanomzellen zeigten in der Studie von Valli *et al.* einen Zyklusarrest in der G₀/G₁-Phase, so wie bei EGI-1 Zellen (46). Das Hämatoporphyrinderivat Photofrin® bewirkte in der Arbeit von Crescenzi *et al.* im Unterschied dazu einen S-Phasenarrest in H1299 Zellen eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (47). Ein dem entsprechendes G₂/M-Phasenarrest von TFK-1 Zellen entsprechendes Ergebnis konnten Park *et al.* in YGIC-6B Cholangiokarzinomzellen nach der PDT mit Verteporfin zeigen (48). Neben den Unterschieden in der Art des Zellzyklusarrests zeigte sich bei den weniger differenzierten EGI-1 Zellen ein insgesamt stärkerer antiproliferativer Effekt, eine stärkere zytotoxische Wirkung und Apoptoseinduktion durch die ZnPc-PDT im Vergleich zu TFK-1 Zellen. Auch innerhalb der ösophagealen Zellmodelle ergaben sich entitätsspezifische Unterschiede in Bezug auf den Effekt der ZnPc-PDT. Die plattenepithelialen Kyse-140 Zellen zeigten ein sensibleres Ansprechen im Vergleich zu OE-33 Zellen, welche ein aus dem Barrett-Ösophagus entstandenes Adenokarzinom darstellen. Gründe könnten in einer unterschiedlichen Expression und Mutation von regulatorischen Proteinen beziehungsweise Protoonkogenen liegen. Unterschiede der beiden Cholangiokarzinomzelllinien ergeben sich neben einer aktivierenden Mutation von k-RAS in EGI-1 Zellen etwa in der mutationsbedingten Überexpression des Tumorsuppressors p53, die in TFK-1 Zellen nicht zu finden ist (41,49). Im Zuge einer Mutation des EGFR- und MAP-Kinase-Signalweg assoziierten Protoonkogens k-RAS kommt es zu einer unkontrollierten Zellteilung und Proliferation der Krebszellen (41). p53 ist bekannt als eines der zentralen Regulationsproteine der Apoptose und des Zellzyklus, wobei es auf Zellstress und DNA-Schäden reagiert (49). Dabei kontrolliert p53 beispielsweise die Transition von der G₁- zur S-Phase und kann bei Schädigung der zellulären DNA einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase einleiten (49). Dies deutet darauf hin, dass die ZnPc-PDT im Kontext der genetischen Aberrationen unterschiedliche Mechanismen auf subzellulärer Ebene anspricht. Im klinischen Setting erscheint es somit erfolgsentscheidend, eine individuelle und tumorspezifische Therapie anzustreben. Auch für die Kombinationstherapie mit anderen Tumorthapeutika, wie beispielsweise der Hemmung des EGFR-Pathways mittels Cetuximab als Unterstützung der PDT ist dieser Aspekt erheblich (3,41). Zudem sollte in zukünftigen Studien Wert auf eine vertiefte Untersuchung der Rolle der genetischen Aberrationen, sowie des EGFR- und p53-Status oder der Mutation von wichtigen Protoonkogenen wie k-RAS in Beziehung mit der Wirkungsweise der ZnPc-PDT gelegt werden.

Die Zellzyklusergebnisse sind auch für weitere Kombinationsansätze von Bedeutung, weil sich wichtige Ableitungen bezüglich geeigneter, zellzyklusspezifisch wirkender Kombinationspartner aus dem Bereich der Radio- und Chemotherapie ergeben (3,48). So können Zytostatika wie beispielsweise Gemcitabin in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus wirken und bieten sich daher als Kombinationspartner bei Cholangiokarzinomen an, bei denen die ZnPc-PDT (wie bei den EGI-1 Zellen) zu einem G₀/G₁-Phasenarrest führt (47). Ein möglicher chemotherapeutischer Kombinationspartner für TFK-1 Zellen könnte zum Beispiel in Paclitaxel bestehen, wie Park *et al.* bei der Verteporfin-PDT der gallengangskarzinomatösen Zelllinie YGIC-6B aufzeigen konnten (48). Hingegen ist die Effektivität einer Radiotherapie von einem G₁/S-Phasenarrest abhängig, denn es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G₂/M-Phase des Zellzyklus befinden, um das bis zu 3-fache sensitiver auf ionisierende Strahlung reagieren (50). So könnte die Kombination aus Radiotherapie und ZnPc-PDT bei jenen Cholangiokarzinomen eine vielversprechende Variante darstellen, bei denen - ähnlich den TFK-1 Zellen - eine Arretierung in der G₂/M-Phase durch die ZnPc-PDT induziert wird. Durch synergistische Effekte der kombinierten Therapien kann es zum Einsatz von geringeren Dosen kommen, wodurch das Auftreten von Nebenwirkungen reduziert wird.

ZnPc-PDT induzierte antiangiogene Effekte und Hemmung der Neoangiogenese

Neben der spezifischen antineoplastischen Wirkung der PDT auf den Tumor kann ein Ansatz auch in der Unterbindung der O₂- und Nährstoffversorgung durch Zerstörung der tumorversorgenden Gefäße bestehen (51). Der Einfluss der ZnPc- und Pc32-PDT auf die Gefäßstruktur und Neoangiogenese wurde mittels CAM-Assay untersucht. Die ZnPc-PDT führte dabei zu einer Zerstörung der bestehenden Blutgefäße. Es kam nicht zu einer Ausbildung regenerativer Gefäße bis zu einem Beobachtungszeitpunkt von 72 h nach ZnPc-PDT. Dies spricht für die effektive Zerstörung des Gefäßbetts und die nachhaltige Unterdrückung der Neoangiogenese durch die ZnPc-PDT (Kap. 4.8.). Im Gegensatz dazu zeigte die PDT mit Pc32 keinen antiangiogenen Effekt, was konkordant zu den übrigen Ergebnissen bezüglich der Wirksamkeit von Pc32 ist.

Eine antiangiogene Wirkung ist auch im Zuge der PDT mit anderen Photosensibilisatoren, wie etwa Verteporfin bekannt. Die Zerstörung des Gefäßbetts durch die Verteporfin-PDT wird so zum Beispiel in der Behandlung der exsudativen Makuladegeneration eingesetzt (15). Nach der Zerstörung der Gefäße kann es dabei jedoch längerfristig zur hypoxiegetriebenen Regeneration und Neoangiogenese der Gefäße kommen (15,26). Nowak-Sliwinska *et al.* beobachteten nach

anfänglicher Gefäßschädigung der CAM durch die PDT mit Verteporfin eine solche hypoxieabhängige Ausbildung eines neuen regenerativen Gefäßbetts, welche zum Zeitpunkt von 48 h nach PDT abgeschlossen war (26). Im Gegensatz dazu zeigte die ZnPc-PDT keine solche Regeneration bis zu einem Zeitpunkt von 72 h, was das Potenzial des Photosensibilisators verdeutlicht, neben der direkten Beeinflussung des Tumorwachstums, auch dessen Mikroumgebung in Form eines nachhaltigen und effektiven antivaskulären Effekts zu beeinflussen.

Einsatz der Methoden und Limitationen

Die Evaluierung der beiden Photosensibilisatoren anhand der verschiedenen immortalisierten Zelllinien erfolgte mithilfe von etablierten Labormethoden. Zunächst konnte das Aufnahmeverhalten der Photosensibilisatoren mittels Laserscanning Konfokalmikroskopie ermittelt werden. Dabei konnte die generelle zytoplasmatische Akkumulation der Verbindungen in den Zellen gezeigt werden. Eine präferentielle Lokalisation der Photosensibilisatoren in bestimmten Zellkompartimenten/Organellen sowie unmittelbare Rückschlüsse auf die Kinetik der Aufnahme konnten dabei nicht erfasst werden. Dies könnte Gegenstand zukünftiger *in vitro*-Untersuchungen sein. Mittelbar konnten jedoch durch die Kristallviolett-Untersuchungen Rückschlüsse über den Zusammenhang zwischen Inkubationszeit des Photosensibilisators und PDT-Effekt abgeleitet werden. Mittels Kristallviolett-Messung wurde eine zeit- und konzentrationsabhängige Proliferationsinhibition gezeigt, welche durch iCELLigence Echtzeit-Zellanalyse bestätigt werden konnte. Anhand der Daten erfolgte die Abschätzung der IC₅₀-Werte mittels nichtlinearer Regressionsanalyse. Die Proliferationsergebnisse konnten zudem im Rahmen erster *in vivo*-Versuche anhand von CAM-Assays (antitumorale Effekte) und Wistar-Ratten (Biotolerabilität) bestätigt werden. Um die Effektivität der ZnPc-PDT auch im komplexen Organismus zu beurteilen, sollte in zukünftigen Studien eine Evaluation der antitumoralen Effekte im Ratten- oder Mausmodell stattfinden.

Die Ermittlung der durch die PDT eingeleiteten Zelltodmechanismen erfolgte mittels verschiedener etablierter experimenteller Methoden. Dabei wurde die Einleitung mitochondrialer Apoptose durch fluorometrisch bestimmte Caspase-3-Aktivierung und durchflusszytometrische Propidiumiodidmessungen herausgearbeitet, die einen Anstieg der apoptosespezifischen sub-G₁-Phasenpopulation ergaben. Weiterhin wurde durch Western-Blot-Analysen die Regulation mitochondrialer Apoptoseproteine erbracht und die Bildung von Apoptoskörperchen im

fluoreszenzmikroskopischen LIVE/DEAD-Assay erfasst. Um Interferenzen zu vermeiden, wurde bei den fluoreszenzbasierten Methoden darauf geachtet, dass keine Anregungswellenlängen im Exzitationsbereich von ZnPc verwendet werden.

Mittels LDH-Assays wurden direkte zytotoxische Effekte der Photosensibilisatoren auf die Zellen evaluiert, um nekrotische Effekte der PDT mit den neuen Photosensibilisatoren zu erfassen. Jedoch lassen die Methoden untereinander keine proportionale Zuordnung zu, welcher Anteil der Reduktion der Zellzahl auf einem apoptotischen bzw. nekrotischen Zelltodmechanismus basiert. Dementsprechend könnte in zukünftigen Arbeiten mittels Annexin-V/Propidiumiodidfärbung eine vergleichende Evaluation des überwiegenden Zelltodmechanismus stattfinden. Mithilfe des fluoreszenzmikroskopischen ROS-Assays konnte eine zu den übrigen Ergebnissen passende Entstehung von ROS in verschiedenen subzellulären Lokalisationen gezeigt werden. Für zukünftige Studien wäre es interessant herauszufinden, welchen Effekt verschiedene Konzentrationen, Inkubationszeiten und Belichtungsintensitäten auf die Höhe der ROS-Entstehung haben und wie dieser im Vergleich anderer Photosensibilisatoren in verschiedenen Zellen ausfällt.

Mithilfe von propidiumiodid-basierter FACS-Analyse wurden die unterschiedlichen Zellzyklusphasenverteilungen in den Zellpopulationen nach Behandlung gemessen, wobei verschiedene Phasenarreste ermittelt wurden. Die Ergebnisse konnten durch korrespondierende Expressionsänderungen der entsprechenden Zellzykluspromotoren mittels Western Blot-Analyse gestützt werden. Antiangiogene Effekte der ZnPc-PDT wurden qualitativ mittels CAM-Assay ermittelt. Diese Ergebnisse geben einen Ausblick auf die Veränderung der Gefäßarchitektur im PDT-Behandlungsbereich. Dabei ergibt sich für zukünftige Arbeiten Bedarf, die beobachteten Effekte zu quantifizieren und die zugrundeliegenden molekularebiologischen Mechanismen aufzudecken. Zudem sollten die antiangiogenen Effekte mit zusätzlich auf die CAM implantierten Tumoren evaluiert und mit den bisher erhobenen Ergebnissen verglichen werden.

Limitationen dieser Arbeit ergeben sich weiterhin daraus, dass es sich um eine vorwiegend Zellkultur-basierte, explorative Studie handelt. Die eingesetzten Zelllinien bestehen aus immortalisierten, genetisch stabilen Zellen aus jeweils einem spezifischen Individuum und wurden zudem unter gleichen Bedingungen kultiviert. Der geringe Umfang an individuellen Störfaktoren und die Homogenität der einzelnen Zellmodelle erlaubt die Erhebung von Ergebnissen mit hoher interner Validität bei Einsatz verhältnismäßig niedrigen Versuchswiederholungen. Dabei können

grundsätzliche molekularbiologische Mechanismen und Effekte der Behandlung im zelllinienspezifischen Modellversuch beleuchtet werden und für die klinische Anwendung zukunftsweisende tumorphysiologische Erkenntnisse gewonnen werden. Trotzdem ist in dieser explorativen Arbeit, mit mindestens drei durchgeführten Versuchswiederholungen, nur ein Aufzeigen von Tendenzen möglich. Diese müssen in weiterführenden Studien überprüft und gegebenenfalls genauer quantifiziert werden. Außerdem sind die *in vitro*-Ergebnisse nur eingeschränkt auf einen komplexen tierischen oder menschlichen Organismus übertragbar. Dennoch kann eine solche explorative Forschungsarbeit den Grundstein für die weiterführende Optimierung der photodynamischen Tumorthherapie von gastrointestinalen Tumoren wie dem Cholangio- oder Ösophaguskarzinom legen. Sie kann sogar als Voraussetzung für die weitere Untersuchung experimenteller Tumorthérapien und -therapeutika, wie die PDT, angesehen werden. Mithilfe der gewonnenen *in vitro*-Daten können für zukünftige, weiterführende *in vivo*-Versuche beispielsweise die nötigen Effektstärken abgeschätzt werden, was eine a priori-Poweranalyse und damit sinnvolle tierexperimentelle Versuchsplanung ermöglicht.

6. Conclusio

In der vorliegenden Arbeit konnte das außerordentliche Potenzial des Zink-substituierten Metallophthalocyanins ZnPc als neuer Photosensibilisator für die photodynamische Therapie von Cholangio- und Ösophaguskarzinomen *in vitro* und in ersten *in vivo*-Versuchen ermittelt werden. Dabei zeigte sich neben einem ROS-vermittelten direkten zytotoxischen Effekt die Induktion von mitochondrialer/intrinsischer Apoptose, phasenspezifische Zellzyklusarresten sowie eine effektive Wachstumsinhibition durch die ZnPc-PDT. Zudem offenbarte sich im Anschluss an die PDT mit ZnPc ein nachhaltiger antiangiogener Effekt mit einer Hemmung der Neoangiogenese. Sein vorteilhaftes Wirkungsprofil macht ZnPc damit zu einem ausgesprochen vielversprechenden Photosensibilisator für die PDT des Ösophagus- und Cholangiokarzinom.

Die PDT mit Pc32 bewirkte innerhalb des untersuchten Cholangiokarzinom-Zellmodells nur in EGI-1 Zellen eine effektive Wachstumsinhibition, welche jedoch im Vergleich zur ZnPc-PDT nur bei höheren Konzentrationen erreicht werden konnte. Außerdem offenbarte sich eine vergleichsweise schwächere Aufnahme, eine weniger prominente Entstehung von ROS und eine geringer ausgeprägte direkte Zytotoxizität nach der PDT mit Pc32. Darüber hinaus wurde kein nennenswerter antiangiogener Effekt beobachtet. Demnach stellt Pc32 keinen geeigneten Kandidaten für die PDT des Cholangiokarzinoms dar.

Zukünftige Untersuchungen könnten sich auf eine mögliche synergistische Kombination der ZnPc-PDT mit klinisch relevanten Tumortherapien wie beispielsweise der Chemo- und Radiotherapie oder Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Cetuximab fokussieren. Aus den Resultaten dieser Arbeit ergibt sich zudem die Notwendigkeit der Erforschung von tumorzellspezifischen Behandlungsprotokollen. Zudem sollte ein Fokus auf die Wirkmechanismen der ZnPc-PDT vor dem Hintergrund der individuellen genetischen Eigenschaften und Aberrationen der Tumorzellen gelegt werden. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse in Bezug auf ZnPc erscheint es außerdem sinnvoll, weitere *in vivo*-Untersuchungen bezüglich des antitumoralen Effekts, aber auch möglicher Nebenwirkungen unter der photodynamischen Therapie in Tiermodellen durchzuführen.

7. Referenzen

1. American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. Atlanta, Georgia; 2015.
2. Lee HH, Choi M, Hasan T. Application of photodynamic therapy in gastrointestinal disorders: an outdated or re-emerging technique? *Korean J Intern Med.* 2017;1–10.
3. Agostinis P, Berg K, Cengel K a, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowiz D, Piette J, Willson BC, Golab J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *Am Cancer Soc.* 2011;61:250–81.
4. Moeno S, Krause RWM, Ermilov EA, Kuzyniak W. Synthesis and characterization of novel zinc phthalocyanines as potential photosensitizers for photodynamic therapy of cancers. 2014;963–70.
5. Schmidt J, Kuzyniak W, Berkholz J, Steinemann G, Ogbodu R, Hoffmann B, Nouailles G, Gürek AG, Nitzsche B, Höpfner M. Novel zinc- and silicon-phthalocyanines as photosensitizers for photodynamic therapy of cholangiocarcinoma. *Int J Mol Med.* 2018;42:534–46.
6. Moole H, Tathireddy H, Dharmapuri S, Moole V, Boddireddy R, Yedama P. Success of photodynamic therapy in palliating patients with nonresectable cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2017;23(7):1278–88.
7. Ortner MEJ, Caca K, Berr F, Liebetruith J, Mansmann U, Huster D, Voderholzer W, Schachschal G, Mo J, Lochs H. Successful Photodynamic Therapy for Nonresectable Cholangiocarcinoma: A Randomized Prospective Study. *Gastroenterology.* 2003;5085(03):1355–63.
8. Pennathur A, Gibson MK, Jobe BA, Luketich JD. Oesophageal carcinoma. *Lancet.* 2013;381(9864):400–12.
9. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J. Global Cancer Statistics , 2012. *Cancer J Clin.* 2015;65(2):87–108.
10. Heier SK, Rothman KA, Heier LM, Rosenthal WS. Photodynamic Therapy for Obstructing

- Esophageal Cancer: Light Dosimetry and Randomized Comparison With Nd:YAG Laser Therapy. *Gastroenterology*. 1995;109:63–72.
11. Lightdale CJ, Heier SK, Marcon NE, Mccaughan JS, Gerdes H, Overholt BF, Sivak M V, Stiegmann G V, Nava HR. Photodynamic therapy with porfimer sodium versus thermal ablation therapy with Nd:YAG laser for palliation of esophageal cancer: a multicenter randomized trial. *Gastrointest Endosc*. 1995;42(6):507–12.
 12. Lindenmann J, Matzi V, Neuboeck N, Anegg U, Baumgartner E, Maier A, Smolle J, Smolle-juettner FM. Individualized, Multimodal Palliative Treatment of Inoperable Esophageal Cancer: Clinical Impact of Photodynamic Therapy Resulting in Prolonged Survival. *Lasers Surg Med*. 2012;44:189–98.
 13. Yano T, Hatogai K, Morimoto H, Yoda Y, Kaneko K. Photodynamic therapy for esophageal cancer. 2014;2(3):29.
 14. Zhang J, Jiang C, Paulo J, Longo F, Bentes R, Zhang H, Alexandre L. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2018;8(2):137–46.
 15. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;14(3):380–7.
 16. Allison RR, Sibata CH, Brody T, Medicine R, Jenkins LW. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010;7(2):61–75.
 17. Zoepf T, Jakobs R, Rosenbaum A, Apel D, Arnold JC, Riemann JF. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid is not effective in bile duct cancer. *Gastrointest Endosc*. 2001;54(6):763–6.
 18. Ochsner M. Light scattering of human skin: A comparison between zinc(II)—phthalocyanine and photofrin II®. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1996;32(1–2):3–9.
 19. Büyükekşi SI, Durmuş M, Atilla D. Photophysical and photochemical properties of novel peripherally triethyleneoxysulfanyl substituted monomeric and Si–Si bonded dimeric silicon phthalocyanines. *J Porphyr Phthalocyanines*. 2016;20:1426–37.

20. Kuzyniak W, Ermilov EA, Atilla D, Gürek AG, Nitzsche B, Derkow K, Hoffmann B, Steinemann G, Ahsen V, Höpfner M. Tetra-triethyleneoxysulfonyl substituted zinc phthalocyanine for photodynamic cancer therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016;13:148–57.
21. Atilla D, Saydan N, Durmuş M, Gürek AG, Khan T, Rück A, Walt H, Nyokong T, Ahsen V. Synthesis and photodynamic potential of tetra- and octa-triethyleneoxysulfonyl substituted zinc phthalocyanines. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2007;186(2–3):298–307.
22. Kuzyniak W, Schmidt J, Glac W, Berkholz J, Steinemann G, Hoffmann B, Ermilov E, Gürek A, Ahsen V, Nitzsche B, Höpfner M. Novel zinc phthalocyanine as a promising photosensitizer for photodynamic treatment of esophageal cancer. *Int J Oncol.* 2017;953–63.
23. Nitzsche B, Gloesenkamp C, Schrader M, Ocker M, Preissner R, Lein M, Zakrzewicz A, Hoffmann B, Höpfner M. Novel compounds with antiangiogenic and antiproliferative potency for growth control of testicular germ cell tumours. *Br J Cancer.* 2010;103(1):18–28.
24. Cai Y, Xia Q, Su Q, Luo R. mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces apoptotic, not autophagic cell death, in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Mol Med.* 2013;31:904–12.
25. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci.* 2002;1(1):1–21.
26. Nowak-Sliwinska P, van Beijnum JR, van Berkel M, van der Bergh H, Griffioen AW. Vascular regrowth following photodynamic therapy in the chicken embryo chorioallantoic membrane. *Angiogenesis.* 2010;13:281–92.
27. Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* 2012;66(2):105–43.
28. Krysko D V, Vanden T, Herde KD, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods.* 2008;44:205–21.
29. Whitacre CM, Feyes DK, Satoh T, Grossmann J, Mulvihill JW, Mukhtar H, Oleinick NL.

- Photodynamic Therapy with the Phthalocyanine Photosensitizer Pc 4 of SW480 Human Colon Cancer Xenografts in Athymic Mice. *Clin Cancer Res.* 2000;6(May):2021–7.
30. Mfouo-Tynga I, Abrahamse H. Cell death pathways and phthalocyanine as an efficient agent for photodynamic cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2015;16(5):10228–41.
 31. Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S, Reddi E. Photosensitization with Zinc (II) Phthalocyanine as a Switch in the Decision between Apoptosis and Necrosis. *Cancer Res.* 2001;61:7495–500.
 32. Tynga I, Houreld N, Abrahamse H. The primary subcellular localization of Zinc phthalocyanine and its cellular impact on viability, proliferation and structure of breast cancer cells (MCF-7). *J Photochem Photobiol B Biol.* 2013;120:171–6.
 33. Yslas IE, Rivarola V, Durantini EN. Synthesis and photodynamic activity of zinc (II) phthalocyanine derivatives bearing methoxy and trifluoromethylbenzyloxy substituents in homogeneous and biological media. *Bioorg Med Chem.* 2005;13:39–46.
 34. Shao J, Xue J, Dai Y, Liu H, Chen N, Jia L, Huang J. Inhibition of human hepatocellular carcinoma HepG2 by phthalocyanine photosensitiser PHOTOCYANINE: ROS production, apoptosis, cell cycle arrest. *Eur J Cancer.* 2012;48(13):2086–96.
 35. Grimm S, Mvondo D, Grune T, Breusing N. The outcome of 5-ALA-mediated photodynamic treatment in melanoma cells is influenced by vitamin C and heme oxygenase-1. *BioFactors.* 2011;37(1):17–24.
 36. Höpfner M, Maaser K, Theiss A, Lenz M, Sutter AP, Kashtan H, Lampe B Von, Riecken EO, Zeitz M, Scherübl H. Hypericin activated by an incoherent light source has photodynamic effects on esophageal cancer cells. *Int J Color Dis.* 2003;18:239–47.
 37. Machacek M, Cidlina A, Novakova V, Svec J, Rudolf E, Miletin M, Simunek T, Zimcik P. Far-Red-Absorbing Cationic Phthalocyanine Photosensitizers: Synthesis and Evaluation of the Photodynamic Anticancer Activity and the Mode of Cell Death Induction. *J Med Chem.* 2015;58:1736–49.
 38. Shao J, Dai Y, Zhao W, Xie J, Xue J, Ye J, Jia L. Intracellular distribution and mechanisms of actions of photosensitizer Zinc (II)-phthalocyanine solubilized in Cremophor EL against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cancer Lett.* 2013;330(1):49–56.

39. Velazquez FN, Miretti M, Baumgartner MT, Caputto BL, Tempesti TC, Prucca CG. Effectiveness of ZnPc and of an amine derivative to inactivate Glioblastoma cells by Photodynamic Therapy: an in vitro comparative study. *Sci Rep.* 2019;9:1–15.
40. Weijer R, Broekgaarden M, Golen RF Van, Bulle E, Nieuwenhuis E, Jongejan A, Moerland PD, Kampen AHC Van, Gulik TM Van, Heger M. Low-power photodynamic therapy induces survival signaling in perihilar cholangiocarcinoma cells. *BMC Cancer.* 2015;1–17.
41. Xu L, Hausmann M, Dietmaier W, Kellermeier S, Pesch T, Stieber-Gunckel M, Lippert E, Klebl F, Rogler G. Expression of growth factor receptors and targeting of EGFR in cholangiocarcinoma cell lines. *BMC Cancer.* 2010;10:302.
42. Lo PC, Huang JD, Cheng DYY, Chan EYM, Fong WP, Ko WH, Ng DKP. New amphiphilic silicon(IV) phthalocyanines as efficient photosensitizers for photodynamic therapy: Synthesis, photophysical properties, and in vitro photodynamic activities. *Chem - A Eur J.* 2004;10(19):4831–8.
43. Challa S, Chan FKM. Going up in flames: Necrotic cell injury and inflammatory diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(19):3241–53.
44. Hodgkinson N, Kruger CA, Hodgkinson N, Kruger CA, Mokwena M, Abrahamse H. Cervical cancer cells (HeLa) response to photodynamic therapy using a zinc phthalocyanine photosensitizer. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2017;177:32–8.
45. Manoto S, Africa S, Sekhejane PR, Houreld NN, Abrahamse H. Localization and phototoxic effect of zinc sulfophthalocyanine photosensitizer in human colon (DLD-1) and lung (A549) carcinoma cells (in vitro). *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2012;9:52–9.
46. Valli F, García Vior MC, Roguin LP, Marino J. Oxidative stress generated by irradiation of a zinc(II) phthalocyanine induces a dual apoptotic and necrotic response in melanoma cells. *Apoptosis.* 2019;24:119–34.
47. Crescenzi E, Chiaviello A, Canti G, Reddi E, Veneziani BM, Palumbo G. Low doses of cisplatin or gemcitabine plus Photofrin/photodynamic therapy: Disjointed cell cycle phase-related activity accounts for synergistic outcome in metastatic non-small cell lung cancer cells (H1299). *Mol Cancer Ther.* 2006;5(3):776–85.
48. Park S, Hong SP, Oh TY, Bang S, Chung JB, Song SY. Paclitaxel augments cytotoxic effect

- of photodynamic therapy using verteporfin in gastric and bile duct cancer cells. *Photochem Photobiol Sci.* 2008;7(7):769–74.
49. Caca K, Feisthammel J, Klee K, Tannapfel A, Witzigmann H, Wittekind C, Mössner J, Berr F. Inactivation of the INK4a/ARF locus and p53 in sporadic extrahepatic bile duct cancers and bile tract cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2002;97(4):481–8.
 50. Wang L, Yang W, Read P, Larner J, Sheng K. Tumor cell apoptosis induced by nanoparticle conjugate in combination with radiation therapy. *Nanotechnology.* 2010;21(47).
 51. Ichikawa K, Takeuchi Y, Yonezawa S, Hikita T. Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) using Visudyne causes effective suppression of tumor growth. *Cancer Lett.* 2004;205:39–48.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Till Jacob Valentin Schmidt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel **Neue Ansätze zur Photodynamischen Therapie von gastrointestinalen Tumoren - Novel Approaches for Photodynamic Therapy of Gastrointestinal Tumors** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Till Jacob Valentin Schmidt hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Jacob Schmidt**, Weronika Kuzyniak, Janine Berkholz, Gustav Steinemann, Racheal Ogbodu, Björn Hoffmann, Geraldine Nouailles, Bianca Nitzsche und Michael Höpfner. Novel zinc- and silicon-phthalocyanines as photosensitizers for photodynamic therapy of cholangiocarcinoma. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 42(1), 534-546.

IF: 2,784

Beitrag im Einzelnen: Projektplanung; Umgang mit der Zellkultur; Gewinnung und Analyse der Daten (PDT-Behandlung, Proliferationsstudie, Nachweis apoptotischer Veränderungen z.B. Caspase-3-Aktivität, Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie, Western Blotting, Nachweis der Bildung freier Radikale, Konfokalmikroskopie), Schreiben des Textes und Erstellen der Abbildungen, Einreichen der Publikation

Publikation 2: Weronika Kuzyniak, **Jacob Schmidt**, Glac Wojciech, Janine Berkholz, Gustav Steinemann, Björn Hoffmann, Eugeny A. Ermilov, Ayşe Gül Gürek, Vefa Ahsen, Bianca Nitzsche und Michael Höpfner. Novel zinc phthalocyanine as a promising photosensitizer for photodynamic treatment of esophageal cancer. International Journal of Oncology, 2017, 50: 953-963.

IF: 3,333

Beitrag im Einzelnen: Hilfe bei der Konzeption und Experimentplanung der Proliferationskinetikuntersuchungen, Umgang mit der Zellkultur, Durchführung von Experimenten zur Proliferationskinetik, Analyse der Proliferationsdaten

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers Michael Höpfner

Unterschrift des Doktoranden Till Jacob Valentin Schmidt

Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **“MEDICINE, RESEARCH and EXPERIMENTAL”**
 Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 133 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
58	ADVANCES IN THERAPY	2,616	3.085	0.005380
59	American Journal of Translational Research	3,677	3.061	0.008470
60	WOUND REPAIR AND REGENERATION	5,625	2.952	0.006310
61	DISEASE MARKERS	3,183	2.949	0.007020
62	CELL TRANSPLANTATION	5,255	2.885	0.009420
62	Journal of Diabetes Research	2,650	2.885	0.008780
64	CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE	1,134	2.787	0.001970
65	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE	8,674	2.784	0.014320
66	NEUROMODULATION	2,148	2.774	0.004860
67	Clinical Trials	1,965	2.707	0.008110
68	CURRENT MEDICAL RESEARCH AND OPINION	7,244	2.665	0.010960
69	Contemporary Clinical Trials	3,177	2.658	0.011740
70	Nucleic Acid Therapeutics	741	2.623	0.003260
71	Biomed Research International	31,694	2.583	0.103050

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **“ONCOLOGY”** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 222 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
93	ACTA ONCOLOGICA	7,207	3.473	0.013060
94	CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS	3,506	3.455	0.004330
94	PSYCHO-ONCOLOGY	10,201	3.455	0.019830
96	INTERNATIONAL JOURNAL OF HYPERTHERMIA	3,350	3.440	0.004040
97	AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY- CANCER CLINICAL TRIALS	4,247	3.424	0.005470
98	ONCOLOGY-NEW YORK	2,317	3.398	0.003800
99	UROLOGIC ONCOLOGY- SEMINARS AND ORIGINAL INVESTIGATIONS	4,787	3.397	0.013310
100	CANCER BIOLOGY & THERAPY	7,577	3.373	0.008280
101	GENES CHROMOSOMES & CANCER	5,116	3.362	0.006970
102	Journal of Geriatric Oncology	895	3.359	0.003320
103	Journal of Gynecologic Oncology	957	3.340	0.002260
104	INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY	15,493	3.333	0.022360

Publikationsliste

1. **Schmidt J**, Kuzyniak W, Berkholz J, Steinemann G, Ogbodu R, Hoffmann B, Nouailles G, Gürek AG, Nitzsche B, Höpfner M. Novel zinc- and silicon-phthalocyanines as photosensitizers for photodynamic therapy of cholangiocarcinoma. *Int J Mol Med*. 2018;42:534–46.
2. Kuzyniak W, **Schmidt J**, Glac W, Berkholz J, Steinemann G, Hoffmann B, Ermilov EA, Görek AG, Ahsen V, Nitzsche B, Höpfner M. Novel zinc phthalocyanine as a promising photosensitizer for photodynamic treatment of esophageal cancer. *Int J Oncol*. 2017;50(3).
3. Steinemann G, Dittmer A, **Schmidt J**, Josuttis D, Fähling M, Biersack B, Beindorff N, Jolante Koziolk E, Schobert R, Brenner W, Müller T, Nitzsche B, Höpfner M. Antitumor and antiangiogenic activity of the novel chimeric inhibitor animacroxam in testicular germ cell cancer. *Mol Oncol*. 2019;13(12):2679–96.

Druckexemplar der Originalpublikation 1

Schmidt J, Kuzyniak W, Berkholz J, Steinemann G, Ogbodu R, Hoffmann B, Nouailles G, Gürek AG, Nitzsche B, Höpfner M. Novel zinc- and silicon-phthalocyanines as photosensitizers for photodynamic therapy of cholangiocarcinoma. *Int J Mol Med.* 2018;42:534–46.

<https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3620>

Druckexemplar der Originalpublikation 2

Kuzyniak W, **Schmidt J**, Glac W, Berkholz J, Steinemann G, Hoffmann B, Ermilov EA, Görek AG, Ahsen V, Nitzsche B, Höpfner M. Novel zinc phthalocyanine as a promising photosensitizer for photodynamic treatment of esophageal cancer. *Int J Oncol.* 2017;50(3).

<https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3854>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner
Dissertationsarbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

- In der elektronischen Form der Dissertation entfernt -