Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Verstärkung der zellzytotoxischen Wirkung von Gemcitabin auf Harnblasenkarzinomzellen durch Bestrahlung mit blauem Licht in Kombination mit Riboflavin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sofia Sturm

2021

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

gez.: Sofia Sturm

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Christoph V. Suschek

Zweitgutachter: Prof. Dr. Günter R. Niegisch

Anfangs wollt ich fast verzagen, Und ich glaubt' ich trüg' es nie, Und ich hab' es doch getragen, – Aber frag mich nur nicht, wie?

Heinrich Heine

Gewidmet jenen,

die mich auf dieser Reise

begleitet haben.

Zusammenfassung

Das nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinom ist ein häufiger Tumor bei Männern und Frauen. Die Behandlung besteht aus einer transurethralen Resektion, an die sich eine intravesikale Instillationstherapie mit einem Chemotherapeutikum oder Bacille-Calmette-Guérin (BCG) anschließt. Bei der Behandlung kann es allerdings zu Nebenwirkungen, Resistenzen und Rezidiven kommen. Bei Patienten, die gegen die BCG Behandlung resistent sind, kann statt der erneuten BCG Gabe Gemcitabin als Off-Label-Blaseninstillationstherapie eingesetzt werden. Hierbei zeigte Gemcitabin in einigen Studien eine bessere Effektivität als BCG sowie ein besseres Nebenwirkungsprofil und höhere Wirksamkeit im Vergleich zur konventionellen Therapie mit Mitomycin C. Gemcitabin könnte daher eine Alternative zur bisherigen Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomes sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit blaues Licht der Wellenlänge 453 nm zusammen mit Riboflavin die zellzytotoxische Wirkung von Gemcitabin auf drei hier ausgewählte Harnblasenkarzinomzelllinien (BFTC-905, RT-112, SW-1710) erhöhen kann. Blaues Licht (453 nm) hat einen zytotoxischen Effekt auf Harnblasenkarzinomzellen, was zuvor durchgeführte Studien zeigten. Durch Zugabe von Riboflavin, welches bei 453 nm ein Absorptionsmaximum aufweist, erhofften wir uns eine weitere Verstärkung der zytotoxischen Wirkung durch die zusätzliche Generierung reaktiver Sauerstoffspezies. Die gemeinsame Wirkung von Gemcitabin, Riboflavin und blauem Licht (453 nm) auf die Zellviabilität sollte näher untersucht werden. Des Weiteren war es von Interesse, die molekularen Wirkmechanismen zu analysieren. Hierzu wurden die für die Steuerung des apoptotischen Zelltodes relevanten Proteine Bcl2 und Bax sowie γ H2AX, ein Marker für DNA-Schäden, untersucht.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Zellzytotoxizität von Gemcitabin durch die Kombination mit Riboflavin und blauem Licht innerhalb aller verwendeten Zelllinien signifikant verstärkt werden konnte. Die Zellviabilität war durch die verwendete Kombinationsbehandlung im Vergleich zu der allein mit Gemcitabin behandelten Kontrolle signifikant verringert. Zudem zeigen meine Ergebnisse, dass bei Kombination von Gemcitabin mit blauem Licht und Riboflavin die wirksame Gemcitabindosis in wesentlichem Maße reduziert werden konnte. Die reduzierte Gemcitabindosis bewirkte in der verwendeten Kombination mit Riboflavin und blauem Licht die gleiche oder zum Teil bessere zelltoxische Wirkung im Vergleich zur alleinigen Gemcitabingabe in doppelt so hoher Dosierung. Bei der Untersuchung der zugrundeliegenden molekularen Wirkmechanismen konnten wir beobachten, dass das Maß der DNA-Schädigung, hier detektiert in Form einer erhöhten Expression des Histonproteins yH2AX, in den drei Zelllinien durch die Kombinationsbehandlung höher war. Dieser Anstieg war begleitet von einer erhöhten Proteinexpression des proapoptotischen Proteins Bax sowie einer verminderte Proteinexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl2, was auf eine erhöhte Apoptoserate bei Anwendung der Kombinationsbehandlung mit Gemcitabin, Riboflavin und blauem Licht hinweist. Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen wurde zudem deutlich, dass die verwendeten Zelllinien unterschiedlich auf die Behandlung reagierten, wobei BFTC-905 und RT-112 sensibler reagierten als SW-1710.

Auf die klinische Praxis übertragen zeigen meine Ergebnisse, dass im Rahmen eines lokalen Therapieansatzes durch die kombinierte Anwendung mit Riboflavin und blauem Licht die Wirkungsdosis von Gemcitabin stark reduziert werden könnte, was helfen würde, die Nebenwirkungen für den Patienten drastisch zu verringern. Darüber hinaus kann die Erkenntnis über das unterschiedliche Ansprechen der verschiedenen Zelllinien auf die Kombinationstherapie ein wichtiger Hinweis für das Verwenden dieser im klinischen Alltag sein. In-vivo-Studien sollten durchgeführt werden, um diese Behandlungsmethode weiter zu erforschen. Ferner könnte die Erkenntnis über das Bestehen verschiedener Ansatzpunkte dieser Behandlung hilfreich für weitere pharmakologische Forschung sein. Es bleibt insgesamt zu hoffen, dass diese Ergebnisse zu einer Verbesserung der Therapie des nichtmuskelinvasiven Harnblasenkarzinoms beitragen könnten.

Summary

Non-muscle-invasive bladder cancer is a common tumor in men and women. The treatment is a transurethral resection followed by intravesical instillation therapy with a chemotherapeutic agent or Bacille-Calmette-Guérin. However, the treatment can lead to side effects, resistance and recurrence. In patients who are resistant to the BCG treatment, gemcitabine can be used as an off-label bladder instillation therapy, where in some studies gemcitabine showed better efficacy than BCG. Furthermore, gemcitabine has a better side effect profile and a higher efficacy compared to the conventional therapy with mitomycin C. Gemcitabine could therefore be an alternative to the current therapy of non-muscle invasive bladder carcinoma.

The aim of this work is to investigate if blue light with a wavelength of 453 nm in combination with riboflavin increases the cell cytotoxic effect of gemcitabine on the three bladder carcinoma cells lines (BFTC-905, RT-112, SW-1710) selected here. Blue light (453 nm) has a cytotoxic effect on bladder carcinoma cells, as previously conducted studies have shown. By adding riboflavin, which has an absorption maximum at 453 nm, we hoped to further enhance the cytotoxic effect through the additional generation of reactive oxygen species. The combined effect of gemcitabine, riboflavin and blue light (453 nm) on cell viability and metabolism needed to be further investigated. Furthermore, it was of interest to analyze the mode of action in more detail. For this purpose, the proteins Bcl2 and Bax which are relevant in apoptotic cell death, as well as γ H2AX, a marker for DNA damage, were examined.

This work shows that the cell cytotoxicity of gemcitabine was significantly enhanced by the combination with riboflavin and blue light within all used cell lines. Cell viability was significantly decreased by the used combination treatment compared to the control. In addition, the results underline that if gemcitabine was combined with blue light and riboflavin, the effective dose of gemcitabine could be reduced to a substantial extent. The reduced gemcitabine dose in combination with riboflavin and blue light resulted in the same or in some cases in a better cell toxic effect than the sole administration of gemcitabine at a higher dose. Investigating the underlying molecular mechanisms of action, we observed that the level of DNA damage, determined by measuring increased expressions of the yH2AX protein, was higher in the three cell lines due to the combination treatment. This increase was accompanied by increased protein expression of the proapoptotic protein Bax as well as decreased protein expression of Bcl2 indicating an increased rate of apoptosis when the combination of gemcitabine, riboflavin, and blue light was applied. In the context of the studies presented here, it also became clear that the cell lines used responded differently to the treatment whereas BFTC-905 and RT-112 responded more sensitive than SW-1710.

Applied to clinical practice my results show that in the context of a local therapy approach the combined use of riboflavin and blue light could greatly reduce the effective dose of gemcitabine, which would help to drastically reduce the side effects for the patient. In addition, the knowledge about the different responses of the different cell lines to the combination therapy may be an important indication for use in clinical practice. In vivo studies should be performed to further explore this treatment opportunity. Furthermore, the knowledge of the existence of different targets of this treatment could be helpful for further pharmacological research. Overall, it can be hoped that these results may contribute to an improvement in the treatment of non-muscle invasive bladder cancer.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
2-NA	2-Naphtylamine
А	Ampere
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung(en)
ATG	Autophagy-related gene
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
AU	Arbitrary unit
Bax	Bcl-2-assoziiertes X Protein
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
Bcl2	B-Zell-Lymphom-Protein 2
Bestr.	Bestrahlt
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CIS	Carcinoma in situ
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
СТ	Computertomografie
СТВ	CellTiter-Blue
dCK	Desoxycytidinkinase
dCTP	Desoxycytidinphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fetal Calf Serum
FMN	Flavinmononucleotid
g	Gramm
g	Mittlere Erdbeschleunigung, Angegeben als Vielfaches für die Zentrifugalbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Gem.	Gemcitabin
h	Stunde(n)
H2AX	Histon H2AX
HIFiP	Homogenous Irradiation Fiber Probe
H ₂ O	Wasser
IFN-γ	Interferon-y
IL	Interleukin
IL-2	Interleukin-2
IL-10	Interleukin-10
in vitro	unter kontrollierten Bedingungen (hier: Zellkultur)
in vivo	im lebenden Organismus
J	Joule
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase
kDa	Kilodalton
KF	Kontrollfasersonde
kg	Kilogramm
L	Liter
LED	Light-Emitting Diode
LMWPTP	Low molecular weight protein tyrosine phosphatase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MIBC	Muscle invasive bladder cancer
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMC	Mitomycin C
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	(akt)-Mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbro- mid
mol	Mol
mW	Milliwatt
n	Anzahl der gezählten Zellen/ Mittelwert der Zellen pro Quadranten; Zellzahlbestimmung mittels Neubauer- Zählkammer
n	Anzahl durchgeführter Versuche
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Reduzierte Form von NAD

NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	Reduzierte Form von NADP
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMIBC	Non muscle invasive bladder cancer
NMN	Nicotinamidmononukleotid
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (non small cell lung carcinoma)
P/S	Penicillin und Streptomycin
PARP	Poly (ADP-Ribose) -Polymerase
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PDT	photodynamische Therapie
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
RB	Retinoblastom-Protein
Ribo.	Riboflavin
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Sek.	Sekunde(n)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
ΤΝFα	Tumornekrosefaktor-alpha
TNM-Klassifikation	Klassifikation zum Staging von Tumoren
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TURB	Transurethrale Blasenresektion
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
WLC	White light cystoscopy
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μΜ	Mikromolar
µmol	Mikromol
γΗ2ΑΧ	Phosphorylierte Form des Histon H2AX

Inhaltsverzeichnis

ZusammenfassungI		
Summa	ry	. 11
Abkürzu	ungsverzeichnis	111
Inhaltsv	erzeichnis	VI
Abbildu	ngsverzeichnis	IX
Tabeller	nverzeichnis	XI
1	Einleitung	.1
1.1	Anatomie der Harnblase	. 1
1.2 1 2 1	Das Harnblasenkarzinom	. 2
1.2.1	Diagnostik	. 2 . 2
1.2.3	Entstehung und Staging	. 3
1.3	Therapie des NMIBC	. 4
1.3.1	TURB	. 4
1.3.2	MMC und BCG	.5 6
1 1		. 0
1.4.1	Figenschaften und Wirkungsweise	. 7
1.4.2	Flavine und blaues Licht	. 8
1.4.3	Antiinflammatorische Wirkung und klinische Anwendung	. 9
1.5	Riboflavin	10
1.5.1	Eigenschaften	10
1.5.2	Interaktion mit blauem Licht und ROS- Bildung	10
1.5.3	Toxische Wirkung von Riboflavin auf verschiedene Karzinome und Perspektiven für die klinische Anwendung	: 10
1.6	Zelltodmechanismen	11
1.6.1	Apoptose	11
1.6.2	Autophagie und Nekrose	12
1.6.3	Expression von Bax und Bcl2	13
1.7	DNA-Schädigung -yH2AX Expression	14
1.8	Zellatmung	14
1.9	Harnblasenkarzinomzelllinien BFTC-905, RT-112 und SW-1710	16
1.9.1	BFTC-905	16
1.9.2	RT-112	17
1.9.3	SW-1/10	1/
1.10	Aufgabenstellung und Ziele der Arbeit	17
2	Material	19
2.1	Verbrauchsmaterialien	19
2.2	Labormaterialien	19

2.3	Geräte
2.4	Substanzen und Lösungen
2.5	Antikörper 22
2.6	Medien, Lösungen und Puffer 22
2.7	Software
3	Methoden
3.1	Zellkultur
3.1.1	Zelllinien
3.1.2	Kulturbedingungen
3.1.3	Zellzahlbestimmung
2.1.4	
3.2	Zell-Splitting
3.3	Kryokonservierung der Harnblasenkarzinomzellen
3.4	Auftauen der Harnblasenkarzinomzellen
3.5	Blaulichtbestrahlung bei 453 nm
3.6	Chemotherapie - Gemcitabin
3.7	Riboflavin
3.8	Experimenteller Aufbau
3.9	Bestimmung der Vitalität mittels CellTiter-Blue® Assay
3.10	MTT Assay
3.11	Zellen Ernten zur Proteinbestimmung
3.12	Proteinbestimmung
3.13	Western Blot Analyse
3.14	Statistische Auswertung
4	Ergebnisse
4.1	Vorversuche
4.1.1	Dosisfindung von Riboflavin
4.1.2	Dosisfindung von Gemcitabin
4.2	Hauptversuche
4.2.1	Einflüsse von Gemcitabin, blauem Licht, Ribotlavin und der Kombination aller drei Substanzen auf die Zellviabilität: Messung mittels CTB Assay
4.2.2	Einflüsse von Gemcitabin, blauem Licht, Riboflavin und der Kombination aller drei Substanzen auf
	die Zellviabilität; Messung mittels MTT Assay
4.2.3	Ermittlung der Proteinexpressionen von Bax, Bcl2 und vH2AX mittels Western Blot Analyse 54
4.2.4	die Zellschädigung
4.2.5	Einflüsse von Gemcitabin, blauem Licht, Riboflavin und der Kombination aller drei Substanzen auf
	die Apoptose61
5	Diskussion
5.1	Wirkung der Behandlung mit Gemcitabin, blauem Licht und/oder Riboflavin
5.1.1	Untersuchung der Zellviabilität mittels CTB Assay
5.1.2	Untersuchung der Zellviabilität mittels MTT Assay
5.2	Zellschädigende Wirkung von Gemcitabin, blauem Licht und Riboflavin auf Harnblasenkarzinomzellen

5.3	Wirkung der Kombinationsbehandlung auf die Apoptose	. 78
5.4	Unterschiedliches Ansprechen der Zelllinien auf die Kombinationsbehandlung und verschiedene Wirkmechanismen dieser	. 80
5.5	Riboflavin und Gemcitabin als Photosensibilisatoren	. 83
5.6	Resistenzen innerhalb der Zelllinien	. 84
5.7	Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse	. 85
5.8	Umsetzung in die klinische Praxis	. 87
5.9	Schlussfolgerung	. 87
6	Literaturverzeichnis	. 89
Danksa	igung	.99

Abbildungsverzeichnis

Abb.	1: Schematische Darstellung der Invasionstiefe und entsprechende Einteilung des Harnblasenkarzinomes	. 4
Abb.	2: Schematische Darstellung von Apoptose und Nekrose	13
Abb.	3: Veranschaulichung des experimentellen Aufbaus	28
Abb.	4 a-c: Dosisfindung von Riboflavin	34
Abb.	5 a-c: Differenz von bestrahlten und unbestrahlten Zellen	36
Abb.	6 a-c: Dosisfindung von Gemcitabin	38
Abb.	7 a-c: Effekt von blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin auf die relative Anzahl lebender Zelle; gemessen mittels CTB Assay	40
Abb.	8 a-c: Effekt von 10, 25 und 50 ng/ml Gemcitabin auf die relative Anzahl lebender Zellen	43
Abb.	9 a-c: Vergleich der relativen Anzahl lebender Zellen bei Gabe von blauem Licht un Riboflavin mit oder ohne Gemcitabin gegenüber der alleinigen Gemcitabingabe gemessen mittels CTB Assay	nd ; 46
Abb.	10 a-c: Effekt der jeweiligen Kombinationen mit blauem Licht und Riboflavin mit od ohne Gemcitabin auf die relative Anzahl lebender Zellen; gemessen mittels CT Assay	er B 47
Abb.	11 a-c: Effekt von blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin auf die relative Anzahl lebender Zellen; gemessen mittels MTT Assay	49
Abb.	12 a-c: Vergleich der relativen Anzahl lebender Zellen bei Gabe von blauem Licht und Riboflavin mit oder ohne Gemcitabin gegenüber der alleinigen Gemcitabingabe; gemessen mittels MTT Assay	51
Abb.	13 a-c: Effekt der jeweiligen Kombinationen mit blauem Licht und Riboflavin mit od ohne Gemcitabin auf die relative Anzahl lebender Zellen; gemessen mittels MT Assay	er T 53
Abb.	14 a-c: Expression von Bcl2, Bax und γH2AX	55
Abb.	15 a-c: Expression von γH2AX im Vergleich von alleiniger Riboflavingabe zur Kombination mit blauem Licht mit und ohne Gemcitabin	57
Abb.	16 a-c: Expression von γH2AX im Vergleich von alleiniger Riboflavingabe zur Kombination aus blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin	58
Abb.	17 a-c: Expression von γH2AX im Vergleich der Kontrolle zur Kombination aus blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin	60
Abb.	18 a-c: Expression von Bax	62
Abb.	19 a-c: Expression von Bcl2	63

Abb. 20 a-c: Expression von Bax gegenüber Bcl2	65
Abb. 21: Bax/Bcl2-Index der SW-1710 Zelllinie	66
Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung	74
Abb. 23: Vereinfachte Darstellung des Interaktionsmechanismus von blauem Licht im Rahmen der Zellatmung	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 2: Verwendete Labormaterialien	19
Tabelle 3: Verwendete Geräte	20
Tabelle 4: Verwendete Substanzen und Lösungen	21
Tabelle 5: Verwendete Antikörper	22
Tabelle 6: Verwendete Medien, Lösungen und Puffer	22
Tabelle 7: Verwendete Software	23

1 Einleitung

1.1 Anatomie der Harnblase

Die Harnblase ist ein subperitoneal liegendes Hohlorgan, welches sich hinter dem Os pubis im kleinen Becken befindet. Mit ihrer Funktion der Speicherung und Ausscheidung von Urin ist sie ein wichtiger Bestandteil des Urogenitalsystems [1-3]. Dabei werden Kontinenz und Miktion durch ein komplexes neuronales System gesteuert. Dieser Miktionschaltkreis, welcher sich durch Verbindungen zwischen Frontalhirn, Hirnstamm und Rückenmark zusammensetzt und die Funktion der Blase steuert, ist noch nicht vollständig erforscht [1, 4, 5]. Die Harnblase ist im leeren Zustand pyramidenförmig und befindet sich bei Frauen vor dem Uterus und bei Männern vor dem Rektum. Der Corpus vesicae, der Fundus vesicae, die Cervix vesicae und der Apex vesicae bilden die verschiedenen Bereiche der Harnblase. Am Fundus vesicae bzw. an der Cervix vesicae liegt das Trigonum vesicae, ein glattwandiger Schleimhautbereich, an dessen oberen Ecken die Ureteren von dorsal-lateral einmünden, welche die Verbindungen zu den Nieren herstellen. Im unteren Bereich des Trigonum vesicae entspringt die Urethra, welche bei Männern eine Länge von ca. 17-20 cm und bei Frauen ca. 3-5 cm aufweist. Die Blasenwand ist in verschiedene Schichten unterteilt. Von außen umgibt die Tunica adventitia die Harnblase. Darauf folgen die Tunica muscularis und die Tunica mucosa mit der Lamina propria, der Basalmembran und dem Urothel. Der Musculus detrusor vesicae bildet die Tunica muscularis. Er besteht aus dreischichtig angeordneten glatten Muskelfasern, welche sehr dehnbar sind. Bei Füllung wird dadurch kein Druck auf die Blase ausgeübt. Dieser Muskel kontrahiert außerdem im Rahmen der Blasenentleerung. Zum Kontinenzerhalt tragen außerdem zwei Schließmuskel bei, welche im Gegensatz zum Musculus detrusor vesicae bei der Miktion entspannen. Den inneren nicht willkürlich steuerbaren Schließmuskel bildet der Musculus sphincter vesicae. Er besteht aus Ringen glatter Muskulatur. Der Musculus sphincter urethrae hingegen ist der äußere willkürlich steuerbare Schließmuskel, welcher einen Teil des Beckenbodens darstellt und aus glattmuskulären sowie guergestreiften Anteilen besteht [1-3].

Von innen wird die Harnblase vom mehrschichtigen Urothel ausgekleidet. Dies ist ein Übergangsepithel, welches durch seinen speziellen Aufbau mit den Deckzellen (*Umbrella cells*) die Dehnungsfähigkeit der Blase ermöglicht. Das Urothel findet sich in den gesamten ableitenden Harnwegen wieder. Es kleidet das Nierenbecken, die Ureteren, die Harnblase und den oberen Teil der Harnröhre aus [1-3].

1

1.2 Das Harnblasenkarzinom

Das Urothelkarzinom kann sich am Urothel sowohl idiopathisch als auch durch verschiedene Risikofaktoren begünstigt entwickeln. In den meisten Fällen ist das Urothelkarzinom in der Harnblase lokalisiert. Das Nierenbecken, der Ureter oder die Urethra sind mit 5-10% insgesamt sehr viel seltener betroffen. Zu über 90% ist das Harnblasenkarzinom ein Urothelkarzinom, jedoch können auch Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome oder kleinzellige Tumore auftreten [6].

1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Harnblasenkarzinom ist ein häufiger Tumor des Urogenitaltraktes mit rund 550.000 Neuinfektionen und 200.000 Todesfällen pro Jahr [7]. Die Inzidenz pro 100.000 ist bei Männern ungefähr dreimal so hoch wie bei Frauen. Die höchsten Inzidenzen beider Geschlechter finden sich in Südeuropa, Westeuropa und Nordafrika [7, 8]. Als größter Risikofaktor des Harnblasenkarzinoms wird Nikotin beschrieben [9]. 2014 konnten in den USA ungefähr die Hälfte der Harnblasenkarzinomfälle mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Zigarettenrauchen zurückgeführt werden [10]. Weiterhin spielen u.a. Übergewicht [11], chronische Blasenentzündungen [12], höheres Alter [13] und 2-Naphthylamine (2-NA) Exposition [14, 15] eine Rolle. Eine 2-NA Exposition ist über 2-NA-haltige Dämpfe sowie durch den Kontakt mit speziellen Farbstoffen und Haarfärbemitteln möglich. Außerdem kann die Exposition gegenüber 2-NA durch eine unvollständige Verbrennung von organischen Substanzen entsteht. Es wurde beispielsweise in den Dämpfen von Speiseöl beim Erhitzen nachgewiesen [16].

Frühsymptome des Harnblasenkarzinoms können schmerzlose Makrohämaturie [17], irritative Symptome wie Harndrang, Pollakisurie und Dysurie sowie rezidivierende Urogenitalinfekte sein [18, 19]. Im Spätstadium hingegen sind Harnstauungsnieren, Flankenschmerzen, Knochenschmerzen und Gewichtsverlust zu beobachten [6, 19].

1.2.2 Diagnostik

Die Diagnostik des Harnblasenkarzinoms beinhaltet eine Urinzytologie sowie eine Zystoskopie. Zum Staging sollte eine transurethrale Resektion der Harnblase (TURB) mit, falls möglich, Entfernung des Tumors durchgeführt werden. Hierbei ist eine sichere Entnahme im Gesunden sowie die Mitentnahme des Musculus detrusor vesicae aus dem betroffenen Bereich von besonderer Bedeutung. Zur Beurteilung des oberen Urogenitaltraktes sollten außerdem bildgebende Verfahren wie Urographie, Computertomographie oder ein retrogrades Urethrogramm durchgeführt werden. Bei fortgeschrittenen Tumoren, wie beispielsweise muskelinvasiven oder *high grade* Tumoren, sollte ein CT oder MRT von Abdomen und Thorax durchgeführt werden um Metastasen und vergrößerte Lymphknoten zu detektieren [6].

1.2.3 Entstehung und Staging

Die Entstehung des Harnblasenkarzinoms geschieht auf zwei unterschiedlichen Wegen die entweder zum nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinom (NMIBC) oder zum muskelinvasiven Harnblasenkarzinom (MIBC) führen. Dabei entsteht das NMIBC durch flache oder papilläre urotheliale Hyperplasien und das MIBC über flache Dysplasien oder ein Carcinoma in Situ (CIS) [20].

Der Großteil, ungefähr 75%, sind nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinome [21, 22]. Hier wird die Tunica muscularis nicht durchbrochen und der Tumor ist auf die Lamina propria begrenzt. Zu den nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen gehören daher Tumore, die das subepitheliale Bindegewebe infiltrieren (T1) sowie das nicht-invasive papilläre Karzinom (Ta) und das CIS, bei welchem die Basalmembran noch intakt ist. T1 und CIS sind zwar seltener als Ta Tumore, stellen aber high grade Tumore dar. Dies bedeutet, dass sie schlecht bis nicht differenzierte Gewebe aufweisen und in einem höheren Ausmaß vom Ursprungsgewebe abweichen [6, 23]. Damit haben das CIS sowie T1 Tumore eine höhere Wahrscheinlichkeit in ein muskelinvasives Harnblasenkarzinom überzugehen als Ta Tumore [6]. Aus diesem Grund wurden Studien über eine weitere Subeinteilung für die T1 Klassifikation durchgeführt. Hierbei wurden diese u.a. weiter in T1m (micro invasiv) und T1e (extensiv invasiv) eingeteilt. Dies soll zur besseren Prognose und Tumoreinschätzung beitragen sowie das Erstellen individueller Therapiekonzepte besser ermöglichen [24-27]. Insgesamt haben Patienten mit nicht-muskelinvasivem Harnblasenkarzinom aber eine gute Prognose mit einem geringen Metastasierungsrisiko sowie einer 5-Jahres Überlebensrate von über 90% bei NMIBCs, die nicht über die Basalmembran (CIS) hinaus wachsen [6, 28].

25% der Harnblasenkarzinome sind muskelinvasiv, sie durchdringen also die Lamina muscularis der Harnblasenwand und gegebenenfalls noch weiteres Gewebe. Dabei dringen T2 Tumore oberflächlich (T2a) oder tief (T2b) in die Muscularis propria ein. Eine tiefere Invasion in das perivesikale Weichteilgewebe wird als T3 kategorisiert. Hierbei wird nochmals in mikroskopisch (T3a) und makroskopisch (T3b) differenziert. Eine transmurale Invasion durch die Blasenwand bei der das Prostatastroma, Samenbläschen, der Uterus oder die Vagina betroffen sind, bezeichnet man als T4a und bei Beteiligung von Beckenwand oder der Abdominalwand als T4b [23, 29]. Eine Ausnahme bei dieser Kategorisierung bildet das Urothelkarzinom, welches die prostatische Harnröhre befällt und von dort in die Prostata wächst. Hierbei liegt ein primärer Harnröhrentumor vor und kein Harnblasenkarzinom, welches daher nicht als T4 sondern als T2 niedriger einzustufen ist [30]. Des Weiteren wird nach der TNM-Klassifikation die Anzahl der befallen Lymphknoten und das Vorhandensein von Metastasen berücksichtigt. Insgesamt sind die höheren Stadien mit einer schlechten Prognose verbunden [23, 29]. Die beschriebenen Tumorstufen sind in Abb. 1 dargestellt.

Um das Progression- und Rezidivrisiko eines Harnblasenkarzinoms abzuschätzen spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Hierzu zählen die Größe des Tumors, die Anzahl der Tumore, die bisherige Rezidivrate, der Grad der TNM-Klassifikation, der histologische Differenzierungsgrad sowie das Vorhandensein eines CIS. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren kann die individuelle Therapie zusammen mit dem Patienten besser geplant werden [31].



Abb. 1: Schematische Darstellung der Invasionstiefe und entsprechende Einteilung des Harnblasenkarzinomes

Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms nach Invasionstiefe mit Verbildlichung der einzelnen Schichten der Harnblasenwand; die Bezeichnungen CIS, Ta und T1-4 sind im Text ausführlich erläutert; eigene Darstellung

1.3 Therapie des NMIBC

1.3.1 TURB

Diese Promotionsarbeit bezieht sich auf die Optimierung der Therapie des NMIBC, daher wird sich im Folgenden nur auf diese bezogen. Die leitliniengerechte Therapie des nichtmuskelinvasiven Harnblasenkarzinoms ist die TURB [21, 23]. Hierbei wird standardgemäß zunächst eine *White Light Cystoscopy* (WLC) zur Detektion der auffälligen Bereiche verwendet, wobei eine Hinzunahme von blauem Licht als *"hexaminolevulinate blue light cystoscopy"* vielversprechende Ergebnisse zeigte und die Detektionsrate des NMIBC erhöhte [32]. Die Blaulicht-Fluoreszenz-Zystoskopie wurde in die neuesten Leitlinien miteingeschlossen [21, 23]. Im Anschluss an die Zystoskopie werden, bei der konventionellen TURB, neoplastische Bereiche des Urothels mithilfe einer Elektroschlinge durch das Zystoskop entfernt. Größere Tumore können zunächst fragmentiert und anschließend entfernt werden [33]. Hierbei ist beim Entfernen des neoplastischen Bereichs auf das Vorhandensein von Detrusormuskulatur im histopathologischen Präparat zu achten. Außerdem sollte das Präparat im Gesunden entfernt werden. Diese Aspekte sind besonders wichtig für eine niedrige Rezidivrate des Krankheitsverlaufes [34]. Die Komplikationsrate der TURB ist mit 0,7% als niedrig einzustufen. Meistens handelt es sich bei den Komplikationen um Blasenperforationen und Harnröhrenstrikturen [33].

Die in den letzten Jahren vermehrt erprobte bipolare *En-bloc*-Resektion stellt eine mögliche Alternative zur konventionellen TURB dar. Einige Studien zeigten hierzu vielversprechende Ergebnisse u.a. bei der Verwendung von Elektroschlingen [35-37], einer Kombination aus monopolarer Elektrode und dem sogenannten *"Hybrid Knife"* [38, 39] oder mit Anwendung von Lasern [40, 41]. Durch diese präziseren Tumorentfernungen soll das histologische Staging verbessert und die Tumoraussaat minimiert werden [35]. Außerdem wird durch das Einsetzen von Lasern eine verbesserte Hämostase sowie verringerte Blutverluste im Vergleich zur konventionellen TURB beschrieben [40].

1.3.2 MMC und BCG

Im Rahmen der konventionellen TURB kann postoperativ eine Chemotherapie-Frühinstillationstherapie mit Epirubicin, Mitomycin C (MMC), Doxorubicin, Thiotepa oder Pirarubicin durchgeführt werden [23, 42]. Bei Tumoren die sich im Anschluss an die TURB als highrisk Tumore darstellen oder wenn kein Muskel im Primärresektat vorhanden war, wird eine Nachresektion mittels TURB nach 6 Wochen empfohlen. Ob im Anschluss auf die TURB eine adjuvante Instillationstherapie folgt hängt vom Tumorstadium ab. Bei low-risk Tumoren wird im Anschluss keine adjuvante Instillationstherapie vorgenommen. Eine adjuvante Instillationstherapie wird hingegen bei intermediate-risk Tumoren durchgeführt. Hierbei wird entweder ein Chemotherapeutikum oder Bacille-Calmette-Guérin (BCG) verwendet. Im Unterschied hierzu wird bei high-risk Tumoren, bei denen keine Früh-Zystektomie empfohlen ist, ausschließlich die adjuvante Instillationstherapie mit BCG empfohlen [6, 23]. Allgemein senkt die Instillationstherapie das Rezidiv- und Progressionsrisiko [42-44]. Nennenswert ist hier noch, dass beim CIS statt der oben genannten Verfahren auch eine Zystektomie erwogen werden kann. Dies ist dadurch begründet, da es sich beim CIS um eine aggressive Neoplasie des Urothels handelt. Daher kann die Zystektomie vor allem beim Vorliegen einer BCG Resistenz eine Alternative darstellen [6, 23].

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit BCG geringere Rezidivraten aufweist als die Therapie mit MMC [44-46]. Allerdings zeigt die Therapie mit BCG im Vergleich zu der mit MMC mehr Nebenwirkungen [45-47]. Hierbei kann es bei der Instillationstherapie mit dem Chemotherapeutikum MMC zu Zystitis ähnlichen Symptomen wie verstärktem Harndrang, erhöhter Miktionsfrequenz und Dysurie kommen. Außerdem können allergische Hautreaktionen und Reaktionen der Harnblasenwand auftreten [47, 48]. Im Vergleich dazu kann es bei der Therapie mit BCG ebenfalls zu Zystitis ähnlichen Symptomen aber auch zu hohem Fieber [47], Leukozyturie [49], granulomatöser Prostatitis und Tuberkulose-ähnlichen Symptomen [48] kommen. Diese Nebenwirkungen können zu einer geringeren *Compliance* führen sowie zum Beenden der Therapie [47, 50]. Hinzukommt, dass MMC [51, 52] und BCG [53, 54] nicht bei allen Patienten wirkungsvoll sind und einige Patienten durchaus Resistenzen zeigen. Außerdem sind trotz ausgeschöpfter Therapie Rezidive nach einer TURB häufig und Progressionen in ein muskelinvasives Karzinom mit der Zeit nicht selten [55, 56]. Aus diesen Gründen ist es wichtig eine alternative Therapie zu etablieren.

1.3.3 Gemcitabin

Gemcitabin gehört zu der Chemotherapeutika-Gruppe der Antimetaboliten und ist ein Cytosin-Analogon. Es hemmt die DNA Synthese durch seinen Einbau [57]. Gemcitabin wurde zuerst von Larry W. Hertel in den Lilly Research Laboratories hergestellt. Das Ziel war es, durch die Fluorierung von D-Ribose und Nukleosiden, Verbindungen mit antineoplastischen sowie antiviralen Effekten zu erforschen. Durch die Synthese von 2-Desoxy-2,2-difluor-Dribose, gefolgt von der Synthese einer Reihe von 1-(2-Desoxy-2,2-difluoribofuranosyl) Pyrimidinnuekleoside, entstand 2',2'-difluorodeoxycytidine, welches Gemcitabin genannt wurde [58-60]. Dieses wurde zunächst als potentielles Virostatikum verwendet und zeigte eine gute Wirksamkeit gegen DNA- sowie RNA-Viren *in vitro*. Dies konnte später auch *in vivo* bestätigt werden [60, 61]. Unter Leitung von Gerald B. Grindey wurde der Effekt von Gemcitabin als Krebsmittel erforscht, wobei Gemcitabin *in vitro* wie auch *in vivo* als ein potentes Mittel gegen Leukämiezellen beschrieben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass 1 ng/ml Gemcitabin das Wachstum der menschlichen Leukämiezelllinie CCRF-CEM um 50% hemmte [60].

Der Wirkmechanismus von Gemcitabin beruht auf dem Einbau von Gemcitabin Nukleotiden in die DNA. Dabei konkurriert Gemcitabin mit anderen Nukleotiden, vor allem mit Desoxycytidintriphosphat (dCTP), um den Einbau in die DNA [58]. Der Einbau von Nukleotiden in die DNA geschieht durch die DNA-Polymerase. Auf diesem Weg wird u.a. der DNA-Strang verlängert und die DNA kann dupliziert werden. Die Verlängerung des DNA-Strangs wird jedoch nach Einbau des Gemcitabin Nukleotides abgebrochen und die DNA-Duplikation somit verhindert. In einer Studie von Peng Huang et al. mit der T-Zell-Leukämie Zelllinie CCRF-CEM konnte allerdings gezeigt werden, dass der Vorgang nicht direkt nach dem Einbau von Gemcitabin abgebrochen wird. Es wird noch ein weiteres Desoxynukleotid, wie Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxythymidin oder Desoxycytidin, eingebaut und im Anschluss daran die DNA-Polymerase gestoppt. Diese ist dann nicht mehr in der Lage weitere Nukleotide einzubauen [62]. Der Einbau von Gemcitabin in die DNA verhindert somit die Zellvermehrung und ist der antineoplastische Wirkmechanismus von Gemcitabin. Messbar ist der Einbau von Gemcitabin in die DNA durch die Abnahme der zellulären dCTP-Konzentration [58, 62].

Im klinischen Alltag zeigt Gemcitabin, bisher hauptsächlich als intravenöse Therapie, gute antineoplastische Wirkung auf verschiedene Tumorzellen [57]. Hierzu gehören das Lungenkarzinom, Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom, Mammakarzinom und Harnblasenkarzinom [57, 63]. Für Patienten mit BCG Resistenz kann Gemcitabin bereits als off-label Instillationstherapie verwendet werden [23, 64, 65]. Außerdem zeigte Gemcitabin in Studien bereits vielversprechende Ergebnisse als primäre Instillationstherapie. So wurde eine gute Tumor-Ansprechrate sowie eine geringere Toxizität und zugleich bessere Wirksamkeit im Vergleich zu MMC beschrieben [66, 67]. Gemcitabin zeigt, ähnlich wie MMC und BCG, bei der Anwendung als Instillationstherapie allerdings einige Nebenwirkungen. Zu diesen gehören Dysurie, suprapubischer Schmerz, Hämaturie, Zystitis, und Hautreaktionen [67]. Wenngleich diese Nebenwirkungen als schwächer im Vergleich zu denen von MMC oder BCG beschrieben wurden, sollten sie minimiert werden [67, 68]. Ferner zeigte Gemcitabin im Rahmen von in-vitro- und in-vivo-Studien bereits gute Wirksamkeit als Radiosensibilisator [69]. Insgesamt könnte Gemcitabin gute Wirkung innerhalb einer Phototherapie des Harnblasenkarzinomes zeigen und wurde daher in unserer Studie näher untersucht. Für die Photosensibilisierung von Gemcitabin verwendeten wir blaues Licht mit der Wellenlänge 453 nm in Kombination mit Riboflavin.

1.4 Blaues Licht

1.4.1 Eigenschaften und Wirkungsweise

Blaues Licht hat eine Wellenlänge von 400-500 nm [70] und eine Eindringtiefe ins Gewebe von ca. 1 mm [71, 72]. Die Wirkungsstärke von blauem Licht ist dabei wellenlängen- und intensitätsabhängig; außerdem spielt die Bestrahlungszeit eine entscheidende Rolle [73-76]. Der genaue Wirkmechanismus von blauem Licht auf die Zellen konnte noch nicht vollends erforscht werden [70]. Blaues Licht ist aber bekannt als ein Einflussfaktor auf die zirkadiane Rhythmik [77, 78]. Dabei konnte in einer Studie von Scott S. Campbell und Patricia

J. Murphy aus dem Jahr 1998 gezeigt werden, dass selbst außerhalb der visuellen Aufnahme blaues Licht Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik hat [79].

Um absorbiert zu werden und somit einen Effekt zu erzeugen benötigt blaues Licht Photoakzeptoren oder Photosensibilisatoren [70, 80]. Als Photoakzeptoren dienen zum Beispiel Pigmentzellen wie retinale Ganglienzellen [81]. Hierbei spielt das Melanopsin [82, 83] eine große Rolle und ist weitestgehend erforscht. Des Weiteren wurden in nicht-pigmentierten Zellen vier verschiedene Photosensibilisatoren erfasst. Diese umfassen die Flavine [84], Porphyrine [85, 86], Opsine [87] und nitrosierte Proteine [88].

1.4.2 Flavine und blaues Licht

In dieser Studie sind vor allem die Eigenschaften der Flavine von zentraler Bedeutung, daher werden diese im folgenden Abschnitt näher erklärt.

Flavine sind N-heterozyklische Verbindungen. Sie teilen einen gemeinsamen Isoalloxazinring und sind nicht nur bei Menschen sondern auch bei Tieren und Pflanzen von Bedeutung [84], da sie an einer Vielzahl biochemischer Prozesse beteiligt sind. Hierbei sind sie Bestandteil wichtiger Enzyme wie der Succinat- und NADH-Dehydrogenase, der Xanthinoxidase-Dehydrogenase und der Stickstoffoxidmonoxid-Synthase [89]. Flavoproteine finden sich außerdem im endoplasmatischen Retikulum als NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase und NADH-Cytochrom b5-Reduktase, welche eine Ein-Elektronen-Reduktion katalysieren. Auch im Zytosol finden sich flavinhaltige Enzyme wie die NADPH-Chinon-Oxidoreduktase, welche eine Zwei-Elektronen-Reduktion katalysiert und als zellulärer Protektor gegen den oxidativen Stress angesehen wird [90]. Flavine sind außerdem an verschiedenen lichtinitiierten Reaktionen beteiligt. Innerhalb ihrer elektronischen Eigenschaften verändern sich die Flavine im Rahmen der Lichtreaktion. Diese Veränderungen finden größtenteils im Isoalloxazinring statt [84, 89]. Durch die Bestrahlung mit blauem Licht werden Flavine in einen angeregten Zustand überführt, wodurch das Flavin als Oxidationsmittel an Bedeutung gewinnt. In diesem durch Bestrahlung mit blauem Licht angeregtem Zustand kann das Flavin Moleküle oxidieren, was als Typ-1-Photooxidation bezeichnet wird und zur Bildung von Wasserstoffperoxid und Derivaten führt. Ebenfalls besitzen die durch Licht aktivierten Flavine die Fähigkeit Energie auf Sauerstoff zu übertragen, was als Typ-II-Photooxidation bezeichnet wird und zu Singulett-Sauerstoffgenerierung (¹O₂) führt [84, 91]. Bei der Photoreaktion werden also durch Redoxreaktionen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet. ROS spielen allgemein bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse eine Rolle und sind bei unterschiedlichen Erkrankungen beteiligt, da sie Zellschäden verursachen [92, 93]. Über die Bildung dieser ROS innerhalb der Photoreaktion kann in den Mitochondrien die Apoptose eingeleitet werden, wobei der verursachte oxidative Stress nicht nur zur Apoptose führt, sondern auch zur Schädigung von Nukleinsäuren und Proteinen führen kann. Des Weiteren nimmt auch die Autophagie in den bestrahlten Zellen zu [94].

1.4.3 Antiinflammatorische Wirkung und klinische Anwendung

Wenn blaues Licht auf Zellen einwirkt kann dadurch auch eine antiinflammatorische Wirkung ausgelöst werden. Dies konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, bei denen nach Blaulichtexposition die verminderte Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Zytokine, wie IL-10, IL-2, IFN- γ und TNF- α beobachtet wurde [95]. Eine verminderte Aktivierung dendritischer Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden [95]. Diese antiinflammatorischen Effekte scheinen durch Sickstoffmonoxid (NO) und im Speziellen durch S-Nitrosylierung unterschiedlicher Signalproteine gesteuert zu sein. Blaues Licht erhöht also nicht nur die Bildung von ROS [85], sondern auch die Bildung von NO [88].

Blaues Licht wird bereits in der Therapie von Icterus neonatosus [96, 97], von Zahnbehandlungen [98] sowie von entzündungsbedingten Hauterkrankungen wie Akne [99, 100], akinetischer Keratose [99], atrophischer Dermatitis [101] und Plaque Psoriasis [102, 103] verwendet. Ebenfalls konnte die proliferationshemmende und antiinflammatorische Wirkung von blauem Licht für die Therapie von Keloiden [74, 104] und Candida Vaginitis [105] in Studien nachgewiesen werden.

Durch die antiinflammatorische und proliferationshemmende Wirkung von blauem Licht ist die Behandlung mit solchem bei den genannten Hauterkrankungen besonders von Vorteil. Hierbei zeigten sich bis auf leichte Hyperpigmentierungen, welche sich nach der Behandlung aber wieder zurück bildeten, keine Nebenwirkungen durch die dermatologische Behandlung mit blauem Licht [106]. Um Hautschäden zu vermeiden ist es allerdings wichtig, dass die maximale Bestrahlungsstärke nicht über die maximal mögliche Erhitzung der Haut hinaus geht [70]. Allgemein gilt als Nebenwirkung von blauem Licht, dass es Schäden an der Retina verursacht [107], was beispielsweise als mögliche Ursache für Makuladegeneration beschrieben wurde [108, 109].

Die therapeutische Relevanz des proliferationshemmenden Effektes von blauem Licht wurde bereits an verschiedenen Tumorarten getestet. Hierzu gehören das Fibrosarkom [110], die Leukämie [111], das maligne Melanom [112] und das Colon Karzinom [110, 113]. Weiterhin konnte dieser Effekt von blauem Licht auch an unterschiedlichen Gewebearten nachgewiesen werden. Hierzu gehören Keratinozyten [75], Endothelzellen [75] und Fibroblasten [104, 114].

1.5 Riboflavin

1.5.1 Eigenschaften

Um die Produktion von ROS durch blaues Licht zusätzlich zu verstärken, können Photosensibilisierer wie die bereits erwähnten Flavine verwendet werden [80]. Die Interaktion von blauem Licht mit Flavinen hat, wie im Vorfeld beschrieben, Auswirkungen auf den Zellmetabolismus. Diesen Effekt wollen wir in unserer Studie durch die Hinzunahme von Riboflavin nutzen, denn Riboflavin ist bei vielen Redoxreaktionen ein wichtiger Co-Faktor [70, 80, 115]. Riboflavin gehört zum Vitamin B Komplex und ist Bestandteil von Flavin-Adenine-Dinucleotiden (FAD) der Atmungskette [116]. Außerdem ist es Bestandteil vieler weiterer Flavinmoleküle [89, 116]. Diese befinden sich in den Mitochondrien [117], Peroxisomen [118] und im Zytosol [80]. Somit spielt Riboflavin eine essenzielle Rolle im menschlichen Organismus. Weiterhin wurde Riboflavin bereits als effektiver Photosensibilisierer beschrieben [116].

1.5.2 Interaktion mit blauem Licht und ROS- Bildung

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Verbindung von blauem Licht mit Riboflavin zur verstärkten Bildung von ROS führt [119-121]. Dieser Effekt könnte einen zentralen Einfluss auf die Therapie des Harnblasenkarzinoms haben, denn wie oben angeführt führen ROS zu DNA-Schäden, was wiederum zu erhöhten Zelltodraten führt [122, 123]. Die Empfindlichkeit gegenüber ROS scheint in Zellen allgemein allerdings unterschiedlich zu sein. So beschreibt eine Studie von Daniel B. Lockwood et al., dass die Zellen eines Plattenepithelkarzinoms deutlich höhere ROS Werte zeigen als normale Keratinozyten nach Bestrahlung mit blauem Licht [124]. Dies liegt an der Resistenzfähigkeit der Zellen gegenüber ROS. So ist die Wirkung von ROS abhängig vom Verhältnis der zellulären Radikalfänger wie Thioredoxinen, Peroxiredoxinen und Glutaredoxinen und der Höhe der entstandenen ROS. Ist der oxidative Stress höher, steigt die Zelltodrate, da das antioxidative System nicht mehr in der Lage ist genügend Radikale abzufangen [122, 125].

1.5.3 Toxische Wirkung von Riboflavin auf verschiedene Karzinome und Perspektiven für die klinische Anwendung

Der apoptotische Effekt von Riboflavin in Kombination mit Bestrahlung wurde für verschiedene Krebszellen dargelegt. Hierzu gehören Leukämiezellen (HL60) [126, 127], Prostatakarzinomzellen (PC3) [128], Melanomzellen (B16F10) [129] und Nierenzellkarzinomzellen (786-O). Bei den Nierenzellkarzinomzellen wurde eine verminderte Expression von Caveolin-1, LMWPTP und VEGFR-2 beobachtet, welche Nierenkrebs-Aggressivitätsmarker sind. Außerdem beobachtete man einen Caspase-abhängigen Zelltod durch Aktivierung von Caspase 3 und Spaltung von Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) [130]. *In vivo* Versuche konnten die Wirksamkeit von blauem Licht in Verbindung mit Riboflavin zeigen. Hierbei wurde die Wirkung von Flavinmononucleotid (FMN) als wasserlösliche Form von Riboflavin in Kombination mit blauem Licht mit einer Intensität von 5 J/cm² auf Mäuse mit malignem Melanom untersucht. Eine Tumorregression von bis zu 90% konnte im Verlauf beobachtet werden [131]. Des Weiteren zeigen Krebszellen, im Gegensatz zu gesundem Gewebe, eine erhöhte Absorption von Riboflavin und reagieren sehr empfindlich auf ROS [123, 132]. Dies würde für eine tumorgezielte Therapie und wenig Kollateralschaden im gesunden Gewebe bei der Therapie mit blauem Licht und Riboflavin sprechen. Weiter könnte es durch eine gezielte Bestrahlung mithilfe von Lasern gelingen, die Gewebeschäden weitestgehend zu minimieren, da der Laser die Lichtquelle direkt auf das Tumorgewebe lenkt. Außerdem ist durch diese Art der Anwendung eine effektive Therapie ohne systemische Wirkungen gewährleistet [133].

1.6 Zelltodmechanismen

Beim Zelltod handelt es sich um einen essentiellen Mechanismus des menschlichen Körpers zum Erhalt des zellulären Gleichgewichtes [134]. Er wird hauptsächlich in die Apoptose, Nekrose und Autophagie unterteilt. Daneben gibt es allerdings noch zahlreiche weitere Zelltodmechanismen [135, 136].

1.6.1 Apoptose

Die Apoptose wurde zunächst von John F. R. Kerr (1971) et al. als "shrinkage necrosis" bezeichnet [137] und wird primär über zwei Signalwege gesteuert. Zum einen über den extrinsischen Weg, welcher über einen TNF-Rezeptor, oder auch Todesrezeptor genannt, gesteuert wird. Dieser wird durch Interaktion von Liganden wie beispielsweise dem Fas Ligand, TRAIL oder dem Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) aktiviert. Hierdurch werden Caspase 8 oder Caspase 10 stimuliert und so die Apoptose eingeleitet [138, 139]. Zum anderen wird die Apoptose über einen intrinsischen Weg eingeleitet. Dieser wird über die Freisetzung von Cytochrom-C aus der Intermembran der Mitochondrien aktiviert. Über Cytochrom-C wird dann Caspase 9 aktiviert und die Apoptose eingeleitet [140]. In beiden Signalwegen spielen Caspasen eine wichtige Rolle in der Signalweiterleitung. Nach Aktivierung der Caspase 9 im intrinsischen Weg und nach Aktivierung der Caspasen 8 und 10 im extrinsischen Weg verschmelzen diese beiden Wege und die Effektorcaspasen 3, 6 oder 7 werden daraufhin aktiviert, um die Zelle in den Zelltod zu leiten [141]. Auch kann es v.a. in Tumorzellen einen zusätzlichen Weg mit Wachstumsfaktorrezeptoren geben. Hierbei spielen Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K), Proteinkinase B und (Akt)-Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) sowie Signal Transducer und Aktivator der Transkription 3 (STAT3) eine wichtige Rolle. Über die B-Zell-Lymphom-Protein 2 (Bcl-2) Familie wird die Apoptose

reguliert [139, 142]. Dies dient dazu, ein unkontrolliertes Zellwachstum zu verhindern und geschädigte Zellen zu eliminieren [134, 143, 144].

1.6.2 Autophagie und Nekrose

Die Autophagie dient der Energiebereitstellung und wird durch Nährstoffmangel oder Hypoxie ausgelöst. Durch diese Mangelzustände werden Autophagie bezogene Gene (ATGs) induziert und die Autophagie eingeleitet. So kann die Energiebereitstellung durch den Abbau überflüssiger zytoplasmatischer Komponenten erhöht werden. Hierbei wird das abzubauende Organell vom Endoplasmatischem Retikulum (ER) komplett umschlossen, sodass das Autophagosom entsteht. Dieses wird anschließend durch ein Lysosom abgebaut und die Energie dem Körper bereit gestellt [145]. Außerdem spielt die Autophagie u.a. eine Rolle bei der Tumorsuppression, Langlebigkeit von Zellen und bei der zellulären *Clearance* [145, 146].

Während Apoptose und Autophagie zu den programmierten und somit physiologischen Zelltodmechanismen gehören ist die Nekrose pathologisch, nicht programmiert und führt nach Ausschüttung des Zellinhaltes in das umliegende Gewebe zu einer inflammatorischen Reaktion. Sie wird durch schädigende Einflüsse auf die Zelle, wie Gifte oder Sauerstoffmangel, ausgelöst. Bei der Apoptose und Autophagie werden die Zellen mitsamt Zellorganellen und Zellkernen fragmentiert und die Chromosomen kondensiert, sodass deren Funktionen erhalten bleiben können. Durch diesen Prozess entsteht keine Entzündungsreaktion. Bei der Nekrose hingegen löst sich die Zelle vollständig auf. Dabei schwillt die Zelle zunächst an und platzt anschließend. Hierbei werden die Zellkomponenten freigesetzt [147, 148]. Diese Unterschiede sind in Abb. 2 dargestellt.

Der Übergang von Apoptose in Nekrose wird als sekundäre Nekrose oder apoptotische Nekrose bezeichnet. Hierbei können zellschädigende Substanzen in niedrigen Dosen zur Apoptose führen und in höheren Dosen zur Nekrose. Auch können in derselben Zelle Merkmale der Apoptose und Nekrose nebeneinander beobachtet werden. Außerdem kann in Zellkulturen sekundäre Apoptose stattfinden, da dort die normale Phagozytose nicht existiert. All diese Gegebenheiten werden als sekundäre Nekrose beziehungsweise apoptotische Nekrose bezeichnet [148-150].



Abb. 2: Schematische Darstellung von Apoptose und Nekrose

Einzelne Phasen von Apoptose und Nekrose; die einzelnen Zellbestandteile sind in hellblau = Mitochondrien, schwarz = Zellkern und Zelle, rot = Golgi-Apparat, gelb = Endoplasmatisches Retikulum, weiß = Zytosol, violett = Lysosomen und schwarz = Zellmembran verbildlicht; eigene Darstellung

1.6.3 Expression von Bax und Bcl2

Die Kenntnisse über diese verschiedenen Zelltodmechanismen sind von Bedeutung, um den Wirkmechanismus der zellzytotoxischen Therapie mit Gemcitabin, blauem Licht und Riboflavin besser nachvollziehen zu können. Das Wissen über die genauen Reaktionen der Tumorzellen auf diese Therapie kann ferner auch für mögliche pharmazeutische Therapiealternativen von Bedeutung sein.

Bax und Bcl2 gehören beide zur Bcl2-Proteinfamilie und dienen wie bereits erwähnt der Regulierung der Apoptose. Dabei gilt Bcl2 als Repressor und Bax als Induktor des programmierten Zelltodes. Bcl2, welches sich in der Innenmembran der Mitochondrien befindet, führt zu keiner Ausschüttung von Cytochrom-C, was einen anti-apoptotischen Effekt bewirkt [151-153]. Bax hingegen führt zu einer Ausschüttung von Cytochrom-C und leitet die Apoptose ein. Das Verhältnis der beiden Proteine zueinander ist von entscheidender Bedeutung. Eine höhere Bax Expression wirkt apoptotisch, während eine höhere Bcl2 Expression anti-apoptotisch wirkt [144, 154]. Außerdem konnten Wechselwirkungen zwischen Bcl2 und Bax beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Überexpression von Bcl-2 dieses mit Bax konkurriert und umgekehrt. Dies führt auch dazu, dass bei einer Überexpression von Bax der anti-apoptotischen Wirkung von Bcl-2 entgegenwirkt wird [154]. Durch die Messung der Expression von Bax und Bcl2 kann also auf die Apoptose als möglicher Zelltodauslöser zurückgeschlossen werden.

1.7 DNA-Schädigung -yH2AX Expression

Nicht nur gezielte Zelltodmechanismen, sondern auch direkte Schädigungen der DNA können die Vermehrung von Zellen stoppen. Hierbei ist vH2AX ein wichtiger Marker für erhöhten Zellschaden. H2AX gehört zu den Histonen, welche zur Stabilisierung der DNA beitragen, indem sie in Verbindung mit Nukleosomen und weiteren Proteinen die Verpackung der DNA bilden [155, 156]. Die DNA-Stabilität kann allerdings u.a. durch Bestrahlung gestört werden. Bestrahlung führt u.a. zu Doppelstrangbrüchen (DSB) der DNA, was wiederum zur Phosphorylierung von H2AX an Serin139 führt. Durch diese Phosphorylierung entsteht yH2AX. Insgesamt kommt es daher bei DSB zur vermehrten Bildung von yH2AX, weshalb dieses als Marker für DSB fungiert [156, 157]. Allerdings kann die Phosphorylierung von H2AX auch unabhängig von DSB stattfinden, wie zum Beispiel bei der Therapie mit Gemcitabin [158]. Hierbei steht diese Phosphorylierung in Verbindung mit der induzierten Hemmung der DNA-Synthese, wohingegen bei Bestrahlung die Phosphorylierung im Zusammenhang mit DSB steht [156, 158]. Somit steht der Nachweis von vH2AX allgemein für DNA-Schäden. Die Messung der Expression von yH2AX kann also weitere Aufschlüsse über die Wirkmechanismen der Therapie mit Gemcitabin, blauem Licht und Riboflavin bringen [159].

1.8 Zellatmung

Zusätzlich zur Betrachtung der Zelltodmechanismen und der DNA-Schädigung sollte es in dieser Arbeit darum gehen, wie die Therapie mit Gemcitabin in Kombination mit blauem Licht und Riboflavin Einfluss auf die Zellviabilität der Harnblasenkarzinomzellen nimmt. Für die Lebensfähigkeit von Zellen spielt u.a. die Zellatmung eine entscheidende Rolle, denn hierbei gewinnen die Zellen Energie in Form von ATP. Zu den Prozessen der Zellatmung gehören die Glykolyse, der Citratzyklus und die Atmungskette, auf welche im Folgenden näher eingegangen wird.

Die Atmungskette befindet sich an der mitochondrialen Innenmembran und besteht aus vier Komplexen sowie u.a. dem Protein Cytochrom-C. Die Atmungskette dient dazu einen Protonengradienten aufzubauen und aufrecht zu halten. Über diesen Protonengradienten kann dann durch die ATP-Synthase ATP gebildet werden, welches essentiell für die Lebensfähigkeit von Zellen ist.

Die Komplexe I, III und IV fungieren als Protonenpumpen, welche über NADH zur Atmungskette gelangende Elektronen als Energie nutzen. Ein Molekül NADH gibt dabei 2 Elektronen an die Atmungskette ab, welche zuvor über den Abbau von Nahrung gewonnen wurden. Die Elektronen werden durch den Komplex IV schließlich auf Sauerstoff übertragen. Zusammen mit den aufgenommenen Protonen entstehen am Ende aus jedem Molekül Sauerstoff zwei H₂O Moleküle. Über den Komplex II, der Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus, gelangen die Elektronen nicht über NADH, sondern über FADH2 zur Atmungskette. Auch diese Elektronen dienen dazu den Protonengradienten aufrecht zu erhalten, um ATP herstellen zu können, wobei der Komplex II selbst nicht als Protonenpumpe fungiert.

Auf die Komplexe I und II wird im Folgenden näher eingegangen, da diese durch die beteiligten flavinhaltigen Moleküle Ansatzpunkte für blaues Licht sein könnten. Der Komplex I wird auch als NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase bezeichnet. Über NADH werden je 2 Elektronen aufgenommen und auf das Molekül Ubichinon übertragen. Dabei wird die Übertragung u.a. durch das Molekül FMN vermittelt. Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus, überträgt ebenfalls Elektronen auf Ubichinon, wobei dieser allerdings keine Protonenpumpe ist. Die Elektronen werden durch die Umwandlung von Succinat zu Fumarat gewonnen und durch FAD auf Ubichinon übertragen. Vorarbeiten konnten zeigen, dass blaues Licht mit flavinhaltigen Molekülen wie FMN und FAD interagiert [121, 136, 160, 161].

Nicht nur über den indirekten Weg der Atmungskette, sondern auch über den zweiten Abschnitt der Glykolyse gewinnen Zellen ATP. Die Glykolyse läuft im Zytosol der Zelle ab und dient dem Abbau von Kohlenhydraten zu Pyruvat, wobei zwei Abschnitte unterschieden werden. Im ersten Abschnitt wird zunächst ATP verbraucht, um die Glukose so zu verändern, dass sie für den zweiten Abschnitt verwendet werden kann. In diesem wird dann die modifizierte Glukose in Form von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Pyruvat abgebaut, wobei doppelt so viel ATP gewonnen wird wie vorab verbraucht wurde. Des Weiteren wird bei diesen Vorgängen NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert. Dieses kann dann seine frei aufgenommenen Elektronen im Rahmen der Atmungskette wie oben beschrieben weiter zu ATP verwerten [136, 160, 161].

Das durch die Glykolyse gewonnene Pyruvat wird im Rahmen des Citratzyklus weiter verwertet. Dabei wird ein Acetylrest auf Oxalacetat übertragen, wodurch Citrat entsteht. Dieses wird durch den Zyklus wieder zu Oxalacetat umgewandelt und dieser beginnt erneut. Hierbei wird Citrat zu Isocitrat und Isocitrat unter Entstehung von NADH/H⁺ zu α -Ketoglutarat umgewandelt. α -Ketoglutarat wird anschließend zu Succinyl-CoA umgewandelt, welches wiederum zu Succinat umgewandelt wird. Das Succinat reagiert darauf folgend durch die Succinatdehydrogenase, dem Komplex II der Atmungskette, zu Fumarat. Hierbei entsteht FADH₂ wodurch wie bereits beschrieben der Quereinstieg von Elektronen zur Atmungskette ermöglicht wird. Fumarat wird dann zu Malat umgewandelt, welches unter Entstehung von NADH/H⁺ zu Oxalacetat umgewandelt wird. Die im Citratzyklus entstandenen Elektronen gelangen über NADH und FADH₂ zur Atmungskette. Der Citratzyklus dient also der indirekten ATP Gewinnung u.a. durch die Atmungskette und durch die Umwandlung von GTP, wobei im Citratzyklus selbst kein ATP gebildet wird [136, 160, 161].

1.9 Harnblasenkarzinomzelllinien BFTC-905, RT-112 und SW-1710

Allgemein wird, wie bereits beschrieben, davon ausgegangen, dass sich das NMIBC u.a. durch urotheliale Hyperplasien und das MIBC durch das CIS oder Dysplasien entwickelt [20]. Allerdings haben aus biologischer Sicht NMIBCs, bei denen es zu einer Progression in muskelinvasive Zellen kommt, ähnliche molekulare Veränderungen wie Zellen des MIBC. Beispiele für ähnliche molekulare Veränderungen sind p53 Mutationen [162], RB1 Verlust und CDKN2A-Deletion [20]. So zeigt sich beispielweise eine verstärkte Expression des MDM2-Gens zu 3% im NMIBC und zu 4-5% im MIBC. Dies führt bei beiden Tumorkategorien zu einer verminderten Aktivität des Tumorsupressorgens p53 [20, 163].

Es zeigt sich insgesamt ein umfangreicheres Bild verschiedener molekularer Unterklassen des Harnblasenkarzinomes, welche über die Einteilung in nicht-muskelinvasiv und muskelinvasiv hinaus geht. Diese Erkenntnis ist wichtig für die Therapie und den individuellen Krankheitsverlauf von Menschen mit Harnblasenkarzinom [20]. Durch die ähnlichen molekularen Veränderungen beim NMIBC und MIBC und dadurch, dass MIBC besser isolierbar sind, haben wir in unseren Versuchen primär fortgeschrittene Harnblasenzelllinien verwendet.

Die verwendeten Harnblasenkarzinomzelllinien waren BFTC-905, RT-112 und SW-1710, welche in Form adhärenter Monolayer wachsen. Die folgenden Informationen bezüglich dieser drei Zelllinien wurden, wenn nicht weiter spezifiziert, der Webseite der German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH entnommen¹.

1.9.1 BFTC-905

Die Zelllinie BFTC-905 geht von einem papillären Übergangszellkarzinom Grad III der Harnblase eines Patienten aus Taiwan hervor [164]. Diese Zellen wachsen in Form von Inselgruppen und ihre Verdopplungszeit beträgt etwa 60 bis 70 Stunden. Sie wurde bereits in

¹ https://www.dsmz.de/collection/catalogue/human-and-animal-cell-lines/catalogue

einer Studie verwendet bei der die Wirkung von Gemcitabin in Kombination mit Sepantronium Bromide, einem niedermolekularen Survivin-Inhibitor, getestet wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass diese Kombination eine hohe Toxizität auf die Harnblasenkarzinomzellen hat. BFTC-905 wurde hier allerdings als Gemcitabin resistente Zelllinie beschrieben [164].

1.9.2 RT-112

Die Zelllinie RT-112 wurde aus dem Karzinom einer Frau mit einem unbehandelten primären Harnblasenkarzinom mit Differenzierungsgrad G2 exzidiert. Diese Zellen haben eine Verdopplungszeit von etwa 35 Stunden. In einer Studie, bei der der Energie- und Redox-Stoffwechsel der Zelllinien RT-112 und 5637 untersucht wurde, stellte sich heraus, dass RT-112 Zellen mehr ATP durch Glykolyse und oxidative Phosphorylierung bilden im Vergleich zur Zelllinie 5637. Außerdem sind diese Zellen wenig empfindlich gegenüber ernährungsbedingten Störungen [165]. In einer Studie über die Mechanismen der Radiosensibilisierung von niedrig dosiertem Gemcitabin (100 mg/kg) in Blasenkrebs-Zelllinien wurden die RT-112 Zellen als Gemcitabin resistent beschrieben. Es zeigten sich bei den Gemcitabin resistenten Zellen erniedrigte dCK-Expressions Level, wobei die Zellen auf die Gemcitabin-Radiotherapie ansprachen [69].

1.9.3 SW-1710

SW-1710 wurde aus einem Blasentumor mit einem histologischen Grad G3 gewonnen. Diese Zelllinie hat ein längliches Zellwachstum und ihre Verdopplungszeit liegt bei etwa 25 bis 32 Stunden. In einer Studie, bei der die Antitumorwirkung von Gemcitabin und dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A in menschlichen Blasenkrebszellen untersucht wurde, stellte sich heraus, dass Trichostatin A die apoptotische Wirkung von Gemcitabin auf Harnblasenkarzinomzelllinien wie SW-1710 potenziert. Hierbei zeigte sich die SW-1710 Zelllinie sensibel und nicht resistent gegenüber Gemcitabin [166].

1.10 Aufgabenstellung und Ziele der Arbeit

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit sollte überprüft werden, ob blaues Licht in Kombination mit Riboflavin die toxische Wirkung von Gemcitabin verstärkt. Dabei sollte die Wirkung der einzelnen Substanzen und deren Kombinationen auf die Vitalität bzw. Toxizität von drei Harnblasenkarzinomzelllinien analysiert werden. Um die phototherapeutische Wirkung der eingesetzten Substanzen zu charakterisieren, haben wir blaues Licht der Wellenlänge 453 nm in einer nicht toxischen Dosis von 110 J/cm2 verwendet, Gemcitabin in den Konzentrationen 10, 25 oder 50 ng/ml eingesetzt und Riboflavin in einer Konzentration von 10 μ M angewendet. Die hierzu verwendeten Zelllinien waren RT-112, BFTC-905 und SW- 1710. Untersucht wurde die Vitalität bzw. der Grad der induzierten Toxizität der drei Zellkulturen, aber auch einige relevante Parameter des apoptotischen Zelltodes.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Reaktionsgefäße (Safe-Lock TubesTM 1,5 ml)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
12-well-Platte (12-well CELLSTAR® Tissue Cul- ture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Ös- terreich
2 ml Reaktionsgefäße (Safe-Lock TubesTM 2,0 ml)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
50 ml Falcons	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Ös- terreich
96-well-Platte (GREINER 96-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Ös- terreich
Handschuhe (Micro-Touch® Nitra-Tex®)	Ansell GmbH; München; Deutschland
Kryogefäße (Cryo.sTM 2 ml)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Ös- terreich
Nitrocellulose <i>Blotting</i> -Membran Porengröße 0,2µm	peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen; Deutschland
Petrischalen 100 x 20 mm	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Ös- terreich
Sterilfilter (Millex®-GS 0,22 µm)	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Stripetten (10 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Stripetten (25 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Stripetten (5 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
T75er Flaschen	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 75 cm2 red filter cap
T175er Flaschen	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 175 cm2 red filter cap
Whatman Papier	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Zellschaber (28 cm)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Ös- terreich

2.2 Labormaterialien

Tabelle 2: Verwendete Labormaterialien

Becherglas (50 / 100 / 250 ml)	Schott AG; Mainz; Deutschland
Casting Frames	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Casting Stands	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Flaschen (250 / 500 / 1000 ml)	Schott AG; Mainz; Deutschland
Glasplatten (1 mm) mit Spacer	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland

Kämme (10er/ 15er)	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Neubauer Zählkammer	LO Laboroptik; Friedrichsdorf; Deutschland
Zylinder (500 / 100 / 50 ml)	VWR®; Darmstadt; Deutschland
Zylinder (Kunststoff; 1000 ml)	VITLAB GmbH; Grossostheim, Deutschland

2.3 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Abzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG; Wangen; Deutschland
Blotter	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Eisschrank Revco Ultima	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Eppendorf Research® fix 10 - 100 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Eppendorf Research® fix 100 - 1000 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Eppendorf Research® fix 0,5 - 10 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Geldokumentationsanlage = <i>ChemiDoc™MP Ima-</i> <i>ging System</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Heizblock	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Kryo-Einfriergerät	Schmidt Laborgeräte GJM Handel und Ser- vice GmbH; Wien; Österreich
Kühlschrank	Nalge Nunc International; Rochester (NY); Vereinigte Staaten
LED-Array (453 nm)	Philips GmbH Innovative Technologies; Aachen; Deutschland
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG; Staufen; Deutschland
Mikroskop Zeiss Axiovert 40	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland
Multiplattenlesegerät VICTORTM V Multilabel Counter model 1420	Perkin Elmer; Waltham; Vereinigte Staaten
Pipettboy accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG; Wertheim; Deutschland
Power supplier Power Pac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Sonifiziergerät	Hielscher Ultrasonics GmbH; Berlin; Deutschland
Taumelrollenmischer RM5-V 1750; RM5-V80 1752	Labortechnik Fröbel GmbH; Lindau; Deutschland
Vortexer Art. No 444-1372	VWR®; Darmstadt; Deutschland
Waage (Kern 440; ABJ-N)	Kern & Sohn GmbH; Balingen; Deutschland
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Werkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Zentrifuge (groß) Heraeus Megafuge 16 R	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland

2.4 Substanzen und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Substanzen und Lösungen

1 % Sodium Pyruvate	Life Technologies Ltd.; Paisley, UK
1 g Glucose/L	Life Technologies Ltd.; Paisley, UK
2-Mercaptoethanol (M7154 for electrophoresis)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Deutsch- land
CellTiter-Blue Reagenz	Promega Corporation; CellTiter-Blue®; Madi- son; USA
DMSO Dimethyl sulfoxide D2650 - Hybri- MaxTM, sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma, ≥99.7 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
DPBS (Dulbecco`s phosphate buffered saline with- out Calcium and Magnesium)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Entwickler-Lösung (ClarityTM Western ECL Sub- strate #170-5060; LuminataTM Forte Western HRP Substrate #WBLUF0100)	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
FCS (Fetal Bovine Serum Gold)	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Deutsch- land
Gemcitabine (40 mg/ml)	Hexal AG; Holzkirchen; Deutschland
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltet- razoliumbromid)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
PBS	Biochrom GmbH; Berlin; Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutsch- land
Ponceau S	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidel- berg; Deutschland
Riboflavin (376,36 g/Mol)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
RIPA-Puffer nach Abcam	Abcam plc; Cambridge; Großbritannien
RPMI 1640 medium	Life Technologies Ltd.; Paisley, UK
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %) in PBS, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom GmbH; Berlin; Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland

2.5 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Sekundärantikörper: Polyklonal Ziege anti-Maus Immunoglobulins/HRP (#P0447);	Agilent Technologies; Santa Clara; Verei- nigte Staaten
Polyklonal Ziege anti-Kaninchen Immunoglobu- lins/HRP (#D0487)	Agilent Technologies; Santa Clara; Verei- nigte Staaten
Mouse anti Bcl-2 monoclonal antibody	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Mouse anti Bax monoclonal antibody	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Rabbit anti γH2AX polyclonal antibody	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Mouse anti GAPDH polyclonal antibody	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland

2.6 Medien, Lösungen und Puffer

Tabelle 6: Verwendete Medien, Lösungen und Puffer

Zellkulturmedium	RPMI 1640 medium 1 g Glucose/L 5 % FCS 1 % Natriumpyruvat 1 % Penicillin / Streptomycin
RIPA-Puffer für die Proteinlysate nach Abcam La- gerung bei 4 °C Gelöst in Aqua dest.	50 mM Tris pH=8 150 mM NaCl 1 % NP-40 0,5 % Na-deoxycholat 0,1 % SDS Vor Gebrauch werden dem Puffer Phopatas- einhibitor und Proteinaseinhibitor zugesetzt
Transferpuffer gelöst in Aqua dest.	25 mM Tris-Base, pH 8,0 - 10,5 192 mM Glycin
Elektrophoresepuffer gelöst in Aqua dest. =Laufpuffer	25 mM Tris, pH 8,3 - 8,8 192 mM Glycin 0,1 % SDS
<i>Blotting</i> -Puffer gelöst in Aqua dest.	Für 4 Minigele: 60 ml 10x Transferpuffer 750 ml H20 75 ml Methanol
TBS	7,7 mM Tris, pH 7,5 150 mM NaCl
Waschpuffer TBS-T	TBS/0,1% Tween 20
Laemmli-Puffer Lagerung bei 4 °C Gelöst in Aqua dest.	250 mM Tris-HCI, pH 6,8 40 % Glycerol 8 % SDS 0,1 % Bromphenolblau Vor Gebrauch 20 % Mercaptoethanol zu- setzten
5% BSA- Mischung	5% BSA, TBS-T
2.7 Software

Tabelle 7: Verwendete Software

ImageLab[™]6.0 für die Western Blot-Analyse
GraphPad Prism 5.0 für Datenauswertung und statistische Analyse
Wallac 1420 Workstation für photometrische Messungen des CTB Assay
Workout 2.0 für photometrische Messungen für Proteinbestimmung
Microsoft Office 2021 für die Datenauswertung
EndNote X9 für das Literaturverzeichnis

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinien

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um Harnblasenkarzinomzelllinien, welche aus drei verschiedenen Harnblasenkarzinomen gewonnen wurden und über die American Type Culture Collection (ATCC) erworben werden konnten. Bei den drei Zelllinien handelt es sich um BFTC-905, RT-112 und SW-1710. Ein Ethikvotum war nicht erforderlich.

3.1.2 Kulturbedingungen

Das RPMI 1640-Medium, das wir zur Kultivierung der Zelllinien verwendeten, bestand aus 1 g Glukose/L, ergänzt mit 1% Penicillin/Streptomycin, 5% *fetal calf serum* (FCS), und 1% Natriumpyruvat. Die Zellen wurden als adhärente *Monolayer* in T175-Kulturflaschen kultiviert und in einem Brutschrank bei 37 °C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO² herangezüchtet. Die Zellen wurden täglich mit einem Lichtmikroskop inspiziert und etwa dreimal pro Woche separiert. Unter Verwendung der Neubauer-Kammer wurden die Zellzahlen bestimmt. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt und einmal im Monat wurde ein Teil der Zellen kryokonserviert.

3.1.3 Mediumwechsel

Für eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen wurde alle zwei bis drei Tage das Medium gewechselt. Hierfür wurde zunächst neues Medium zubereitet und anschließend im Wasserbad mit 37 °C erwärmt. Die Zellsuspension der Harnblasenkarzinomzellen, welche in T175-Kulturflaschen kultiviert waren, wurde abgesaugt und verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 20 - 30 ml des frischen Mediums in die Kulturflaschen gefüllt.

3.1.4 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden zunächst die Zellen der T175-Kulturflasche mit PBS gewaschen, trypsiniert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit Medium resuspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurden danach entnommen und auf ein Well einer 96-Well Platte pipettiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Trypanblau gelangt durch die Zellmembran in die Zellen. Vitalen Zellen gelingt es den Farbstoff wieder heraus zu transportieren. Sie erscheinen aufgrund dessen weiß im Lichtmikroskop. Geschädigten und toten Zellen hingegen gelingt es nicht den Farbstoff wieder heraus zu transportieren unter dem Lichtmikroskop blau. Mittels Neubauer-Zählkammer konnte anschließend die Zellzahl bestimmt werden. Hierfür ist es notwendig ein Deckglas leicht anzufeuchten, um es danach auf die Zählkammer schieben zu können. Bleibt es fest an ihr haften und sind Newton'sche Ringe erkennbar kann das vorbereitete Gemisch aus Zellsuspension und Trypanblaulösung unter das Deckglas pipettiert werden. Durch Kapillarkräfte gelangt das Gemisch zwischen Deckglas und Kammer. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden unter dem Mikroskop alle vier Felder der Zählkammer ausgezählt. Gezählt wurden lediglich vitale Zellen. Aus der bestimmten Zellzahl wurde anschließend der Mittelwert gebildet. Dieser wurde mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor multipliziert. Dieser beträgt 10⁴, da eine Kammer ein Volumen von 0,1 µl fasst. Das Ergebnis ist die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension.

Berechnung:

Lebendzellzahl/ml = $n * 10^4 * Verd$ ünnungsfaktor der Zellsuspension 10⁴= Kammerfaktor n= Anzahl der gezählten Zellen / 4 = Mittelwert der gezählten Zellen pro Quadranten

3.2 Zell-Splitting

Die Zellen wurden täglich mit einem Lichtmikroskop inspiziert und beim Erreichen einer hohen Konfluenzrate etwa dreimal wöchentlich separiert. Zunächst wurden hierzu die adhärenten Zellen trypsiniert, um sie vom Boden zu lösen. Dies erfolgte durch die Zugabe von 10 ml Trypsinlösung (Trypsin, PBS, 1:10) pro T-175 Kulturflasche, nachdem vorab der Überstand abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen für 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 15 ml Kulturmedium pro T-175 Kulturflasche gestoppt. Danach wurden die noch am Boden anhaftenden Zellen mittels Zellschaber gelöst. Die Zellsuspension wurde je T-175 Kulturflasche in ein 50 ml Falcon überführt und über 5 min bei 300 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden mit frisch angesetztem und vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach in neue und mit 20 ml Medium vorgefüllte T175-Kulturflaschen überführt. In diesen wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 37 °C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO² herangezüchtet. Um eine bestimmte Zahl an Zellen zu separieren, konnte vorab die Zellzahl bestimmt werden. Dementsprechend wurde im Anschluss die benötigte Menge an Medium zur Resuspension sowie die Menge an zu überführender Zellsuspension bestimmt.

3.3 Kryokonservierung der Harnblasenkarzinomzellen

Für die Kryokonservierung der Harnblasenkarzinomzellen wurde ein Einfriermedium bestehend aus 90% FCS und 10% DMSO benötigt. Dieses wurde vorab frisch angesetzt, indem FCS aufgetaut und in einem Verhältnis von 1:10 mit DMSO vermengt wurde. Außerdem wurde eine Schale mit Eis vorbereitet, um zellschonend arbeiten zu können, da das Einfriermedium bei über 0 °C zytotoxisch ist. Das Medium konnte so auf dem Eis gelagert werden. Des Weiteren wurden Einfrierröhrchen mit entsprechender Zelllinie, Zellzahl, Passagezahl und dem Datum beschriftet. Die Harnblasenkarzinomzellen aus den T175-Kulturflaschen wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mittels Trypsinierung vom Boden der T175-Kulturflaschen gelöst. Die Zellsuspension wurde entnommen und in 50 ml Falcons überführt. Um 1 x 10⁶ Zellen/ml Harnblasenkarzinomzellen der jeweiligen Zelllinie in 1 ml Einfriermedium einzufrieren, wurde zunächst die Zellzahl bestimmt (s.h. 4.1.4 Zellzahlbestimmung). Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension über 5 min bei 300 g. Nachdem der Überstand abgesaugt und verworfen wurde, konnte das Zellpellet mit 1 ml Einfriermedium pro 1 x 10⁶ Zellen resuspendiert werden. Je 1 ml der Zellsuspension wurden möglichst schnell in ein Einfrierröhrchen überführt und auf Eis gelagert, bis alle Röhrchen gefüllt waren. Um anschließend eine lange Lagerung der Zellen zu ermöglichen, wurden die Zellen zunächst für 24 h bei -80 °C in einem Kryoeinfriergerät mit 100% Isopropanol gelagert, damit ein kontrolliertes Herunterkühlen der Zellen um 1 °C pro Minute möglich war. Schließlich wurde die Einfrierröhrchen in einen Behälter überführt und in Stickstoff bei -80 °C in einem Kryokühlschrank gelagert.

3.4 Auftauen der Harnblasenkarzinomzellen

Die mit Einfriermedium bei -80 °C kryokonservierten Zellen wurden zum Auftauen kurz im Wasserbad erhitzt, wobei sie möglichst nicht vollständig auftauen sollten, da das Einfriermedium bei über 0 °C zytotoxisch ist. Zur Resuspension wurde anschließend 1 ml erwärmtes Zellkulturmedium verwendet. Dieses wurde mittels einer Pipette in das Einfrierröhrchen überführt, die Zellen wurden resuspendiert und somit vollständig aufgetaut. Die Zellsuspension wurde im Anschluss in einen mit 15 ml Zellkulturmedium vorbefüllten 50 ml Falcon überführt und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt und verworfen wurde konnte das Zellpellet mit einer entsprechenden Menge an frischem Medium resuspendiert und in eine mit 15 ml frisch zubereitetem und vorgeheiztem Zellkulturmedium befüllte T-75 Zellkulturflasche überführt werden. Die Zellen wurden schließlich in einem Brutschrank bei 37 °C und einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO² herangezüchtet. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen.

3.5 Blaulichtbestrahlung bei 453 nm

Für unseren Versuchsaufbau verwendeten wir ein LED-Gerät, dessen Bestrahlungsstärke im Vorfeld kalibriert wurde. Die Lampe emittiert Licht mit einer Intensität von 453 nm. Die verwendeten LED-Arrays der Firma Philips hatten während des Bestrahlungsprozesses einen 5 cm langen Abstand zur Zelloberfläche. Die Strahlungsleistung betrug 39 mW/cm² und die Dosis mit welcher bestrahlt wurde betrug 110 J/cm². Vor der Bestrahlung der auf 12 Well-Platten wachsenden Zellen wurde das Medium abgesaugt und je nach Kondition 1 ml PBS (+ Ca²⁺; + Mg²⁺) oder 1 ml der Riboflavin/PBS-Lösung hinzugegeben. Die Bestrahlungsplatte sowie die Kontrollplatte wurden folgendermaßen behandelt: für die Bestrahlungszeit von 47 min wurde die zu bestrahlende Platte mittig unter die LED-Lampe gestellt; die Kontrollplatte wurde zeitgleich in einen 30 °C warmen gefensterten Wärmeschrank gelegt, um vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Sowohl die bestrahlte als auch die nicht bestrahlte Platte wurden nur für die Zeit der Bestrahlung mit der Riboflavin-Lösung behandelt. Danach wurde die Riboflavin/PBS-Lösung abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden je nach Kondition mit 1 ml normalem oder Gemcitabin-haltigen Medium pro Well für 24 Stunden kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden Messungen mittels CTB Assay oder MTT Assay durchgeführt oder die Zellen wurden für die Western Blot Analyse geerntet.

3.6 Chemotherapie - Gemcitabin

Gemcitabin wurde von der Apotheke der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf erworben, welcher auch das Labor zugehörig ist. Die Konzentration von Gemcitabin in der erworbenen Lösung betrug 40 mg/ml bei insgesamt 2000 mg/ 50 ml. Die molare Masse von Gemcitabin beträgt 263,198 g/Mol. Gemischt wurden 39 ml des Zellkulturmedium mit 1000 g Gemcitabin, um 1mg/ml als Anfangskonzentration zu erhalten. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe konnten wir unsere Endkonzentrationen von 10, 25 und 50 ng/ml Gemcitabin erreichen.

3.7 Riboflavin

Riboflavin lag in Pulverform vor. Die molare Masse von Riboflavin beträgt 376,36 g/Mol, daher mischten wir 37,64 mg Riboflavin mit 10 ml PBS um 10 mM Riboflavin zu erhalten. Mittels manuellen Schüttelns wurde Riboflavin in PBS aufgelöst. Von diesem Gemisch wurden 0,5 ml entnommen und mit 24,5 ml PBS mithilfe eines sterilen Filters zu 200 μ M Riboflavin als Anfangskonzentration verdünnt. Anschließend wurden über eine Verdünnungsreihe die Konzentrationen von 5, 10, 20 und 25 μ M Riboflavin erreicht. Allgemein ist darauf zu achten, dass Riboflavin mit möglichst wenig Licht exponiert wird.

3.8 Experimenteller Aufbau

Zunächst wurden die Zellen in 12-Well-Kulturplatten mit 3 x10⁴ Zellen pro Well ausplattiert. Danach wurden die Zellen für 24h bei 37 °C und 5% CO² inkubiert, um eine adhärente Zellschicht zu erhalten. Anschließend wurde, außer der Kontrolle, jedes Well mit einer Gemcitabin/Medium-Lösung von 10, 25 oder 50 ng/ml behandelt, die wie zuvor beschrieben, hergestellt wurde. Folgend wurden die Zellen erneut über Nacht bei 37 °C und 5% CO² inkubiert. Im Anschluss folgte die Bestrahlung der Zellen mit gleichzeitiger Riboflavinbehandlung. Die verwendeten Riboflavindosierungen waren für die Vorexperimente 5, 10, 20 und 25 μ M und für die Hauptexperimente 10 μ M. Hergestellt wurde die Riboflavinlösung auf die zuvor beschriebene Weise. Wir behandelten die Zellen mit Riboflavin für die Bestrahlungszeit von 47 min (110 J/cm² und 453 nm). Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erhielten erneut die Behandlung mit Gemcitabin. Schließlich wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5% CO² inkubiert, um am darauffolgenden Tag geerntet zu werden oder um die Auswertung mittels CTB Assay oder MTT Assay durchzuführen. Der experimentelle Aufbau ist schematisch in Abb. 3 dargestellt.



Abb. 3: Veranschaulichung des experimentellen Aufbaus

Schematische Darstellung des experimentellen Versuchsaufbaus, 12-Well Platte mit den Konditionen: K = Kontrolle; 10,25 oder 50 ng/ml Gemcitabin; +/- 10 μ M Riboflavin; jeweils 2 Well-Platten pro Versuch, 1 x bestrahlt (453 nm blaues Licht) und 1 x nicht bestrahlt; eigene Darstellung

3.9 Bestimmung der Vitalität mittels CellTiter-Blue® Assay

Mit dem CTB Assay können Rückschlüsse über die Lebensfähigkeit der Zellen erhoben werden. Erfasst wird dabei die Reduktion des blauen Indikatorfarbstoffes Resazurin in den

violetten Farbstoff Resorufin durch den Komplex I der Atmungskette lebender Zellen. Toten und apoptotischen Zellen hingegen gelingt diese Reduktion nicht, somit werden nur lebensfähige Zellen gemessen. Damit ist der CTB Assay ein Maß für die Zellviabilität [167, 168]. Für den CTB Assay wurden 3 x 10⁴ Zellen pro Well in einer 12-Wellplatte ausplattiert. Die Zellen wurden nach durchgeführter Versuchsreihe 60 min mit dem CTB-Reagenz unter standardmäßigen Kulturbedingungen inkubiert. Dabei wurde zunächst das CTB-Reagenz 1:20 mit Medium verdünnt und jeweils 400 µl pro Well auf die Zellen gegeben, nachdem von diesen der Überstand abgesaugt wurde. Hierbei war es wichtig einen Blank pro Wellplatte mitzuführen. Nach der Inkubationszeit von 1h wurde aus jedem Well mittels einer Pipette 2 x 100 µl der Medium/CTB-Reagenz - Lösung in eine 96 Mikrotiterplatte mit Doppelbestimmung überführt. Dabei war es wichtig die Suspension möglichst ohne Blasenbildung zu pipettieren. Das Fluoreszenzspektrometer wurde anschließend zur Messung der Zellviabilität verwendet, wobei das Fluoreszenzmaximum von Resorufin bei 590 nm liegt. Hierdurch konnten Rückschlüsse über die zytotoxische Wirkung der Kombinationsbehandlung aus Gemcitabin, blauem Licht und Riboflavin gezogen werden.

3.10 MTT Assay

Dieser Assay analysiert die Reduktion vom wasserlöslichen, gelbem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zum wasserunlöslichem blauen Formazan. Dieser Prozess findet durch die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH statt und ermöglicht u.a. Rückschlüsse über die Zellglykolyse und damit über den Stoffwechsel und die Lebensfähigkeit der Zelle [169]. Für den MTT Assay wurden 1,5x10³ Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte ausplattiert und über 2 Tage kultiviert. Am dritten Tag wurden die Zellen mit 100 µl MTT-Gebrauchslösung (5 mg/ml Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid in PBS verdünnt = MTT-Stammlösung und mit Zellkulturmedium weiter 1:10 verdünnt) behandelt, um eine Konzentration von 0,5 mg/ml MTT zu erreichen. Im Anschluss wurden die Zellen für 2 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die MTT-Lösung abgesaugt und die Zellen wurden mit 100 µl DMSO pro Well behandelt. Die Zellen wurden danach erneut für 10 min inkubiert. Nach diesem Vorgang wurde aus jedem Well 100 µl der Lösung in eine 96 Mikrotiterplatte überführt. Mit einem *Multilabel-Counter* bei einer Wellenlänge von 540 nm konnte anschließend die Extinktion und damit die Zellviabilität in den Zellen gemessen werden. Die Menge an Formazan ist dabei proportional zur Anzahl an vitalen Zellen.

3.11 Zellen Ernten zur Proteinbestimmung

Für die Durchführung der Western Blots ist das Ernten der Zellen und die anschließende Proteinisolation von Bedeutung. Nach dem beschriebenen Versuchsaufbau wurden die Zellen mit PBS gewaschen und danach trypsiniert. Anschließend wurden mithilfe eines Zellschabers die restlichen Zellen vom Boden gelöst. Die Zellsuspension aus jeweils 4 Wells, in denen für die Zellen die gleiche Behandlung erfolgte, wurde in 2 ml Kryogefäße überführt. Diese Mikrozentrifugenröhrchen wurden vorab mit der entsprechenden Zelllinie, Kondition (Kontrolle/ +-Gemcitabin/ +- Riboflavin/ +- Bestrahlung) und Datum beschriftet. Nach Zentrifugation bei 17.000 g für 30 Sek. wurde der Überstand entfernt. Anschließend wurden in jedes Reaktionsgefäß 30 µl RIPA-Puffer pipettiert. Der RIPA-Puffer diente dazu eine Auflösung der Proteine zu verhindern. In diesem Zustand können die Proteine bei -80 °C eingefroren werden, um gegebenenfalls zu einem anderen Zeitpunkt mittels BCA Protein Assay Kit die Proteinkonzentration bestimmen zu können.

3.12 Proteinbestimmung

Nach dem Auftauen der sich in RIPA befindenden Proben wurden diese jeweils zehnmal sonofiziert. Hierdurch wurden die Proteine isoliert. Die Proben wurden auf Eis gestellt, bis alle sonofiziert waren. Im nächsten Schritt wurden je 4 µl der Proben in neu beschrifteten 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit je 20 µl PBS verdünnt (1:6 Mischung) und gut vermischt. Diese verdünnten Proben wurden in einen Ständer für Reaktionsgefäße (nicht auf Eis) gestellt. In eine Mikrotiterplatte mit 96 Well wurden anschließend je 10 µl der Proben in Doppelbestimmung pipettiert. Ebenfalls wurden je 10 µl des zuvor nach Protokoll angesetzten Proteinstandards in steigender Konzentration von 0; 0,025; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 mg/ml in die 96-Well Platte pipettiert. Als nächstes wurden je 200 µl der zuvor gemischten Working Reagenz auf den Standard und die Proben pipettiert. Die Working Reagenz bestand aus Lösung A, der Biocinonsäure, und Lösung B, dem 4% igem Kupfersulfat, welche im Verhältnis von 50+1 miteinander vermengt wurden. Nachdem die Mikrotiterplatte mit einer Folie abgedeckt wurde und für kurze Zeit auf einem Schüttler platziert war, wurde sie für 30 min bei 37 °C inkubiert. Mittels Photospektrometers wurde schließlich bei 562 nm die Absorption gemessen und die Proteinkonzentration ermittelt. Schließlich wurde die benötigte H₂O Menge für 20 ng Proteine bestimmt. Die Proben konnten anschließend wieder bei -80 °C eingefroren oder direkt für die Western Blot Analyse verwendet werden.

3.13 Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse dient der Expressionsmessung ausgewählter Proteine. Dabei werden mittels gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließendem Protein-*Blotting*, die in den Proben enthaltenden Proteine aufgetrennt und auf eine Membran überführt. Der Nachweis der zu detektierenden Proteine erfolgt anschließend über Immunmarkierung. Dieses Verfahren kann Rückschlüsse über verschiedene Prozesse innerhalb der Zellen ermöglichen. In dieser Arbeit sollten die Expressionen von Bax und Bcl2 Rückschlüsse über

die Apoptoseraten der Zellen mit und ohne die Kombinationsbehandlung geben. Außerdem sollte die Expression von γH2AX die Zellschädigung näher charakterisieren.

Für die Western Blot Analyse wurden zunächst die 20 ng Protein enthaltenden Proben mit je 5 µl einer 1:5 Mischung aus 2-Mercaptoethanol und Laemmli Puffer versetzt. Folgend wurden die Proben für 1 min bei 17.000 g zentrifugiert und danach für 5 min bei 95 °C auf einem Heizblock erwärmt. Anschließend wurden die Proben für 1 min bei 17.000 g zentrifugiert und danach auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Gele vorbereitet, indem sie eingespannt und anschließend die Kämme entfernt wurden. Darauffolgend wurden jeweils 15 µl der Proben in die Taschen der Gele gefüllt, wobei in die erste Tasche 5 µl des Markers gefüllt wurden und die zweite Tasche ungefüllt blieb. Die von uns verwendeten Gele waren ein 12% iges Stapelgel und ein 3% iges Trenngel. Pro Gel wurden 400 ml Elektrophorese-Puffer angesetzt. Die Kammern wurden mit dem Elektrophorese-Puffer befüllt und mittels Gelelektrophorese wurden dann die Proteine aufgetrennt, nachdem sie auf die SDS-PAGE geladen wurden. Die Proteine liefen für ca. 20 min mit einer Spannung von 60 V durch das Trenngel und für ca. 40 min durch das Stapelgel mit einer höheren Spannung von 130 V. In der Zwischenzeit wurde der Transfer der Proteine vorbereitet. Hierzu wurde der Blotting-Puffer angesetzt (s.h. Kapitel 2.6, Tabelle 6) und in entsprechende Schalen gefüllt. Außerdem wurden die Membranen zurechtgeschnitten und mit der jeweiligen Zelllinie beschriftet. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele den Kammern entnommen und mit dem Stant-Free Programm der Geldokumentationsanlage (ChemiDoc™MP Imaging System) fotografiert. Anschließend wurden die Gele kurz in Blotting-Puffer äquilibriert. Für den Transfer der Proteine wurden dann das Blotting-Papier, die beschriftete Membran, das Gel und das Filterpapier aufeinandergestapelt. Für den anschließenden Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran verwendeten wir das Trans-Blot Turbo-Gerät von Bio Rad, das den Prozess bei 25 V und 2,5 A innerhalb von 25 min durchführen kann. Danach wurden alle Membranen in je einem 50 ml Falcon auf einen Taumelrollenmischer gelegt und für eine Stunde bei RT mit 5% BSA blockiert. Über Nacht erfolgte dann die Immunmarkierung. Hierzu wurden die Membranen mit den primären Antikörper vH2AX und Bax in 5% BSA-Mischung (5% BSA, TBS-T, 1:20), (1:1000 für Bax und 1:3000 für yH2AX) und dem primären Antikörper Bcl-2 in 5%-Milchpulvermischung (5% Milchpulver, TBS-T, 1:20) (1:1000) bei 4 °C auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen zunächst dreimal mit je 10 ml TBS-T für je 5 min gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit den Zweitantikörpern Goat Anti-Mouse Immunoglobulin und Goat Anti-Rabbit Immunoglobulin in TBS-T (1:100), im Dunkeln und bei RT, auf einem Taumelrollenmischer für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Membranen erneut dreimal mit je 10 ml TBS-T für je 5 min gewaschen. Danach wurden die Membranen in 3% BSA- Mischung (3% BSA, TBS-T, 1,5:20) mit Anti-GAPDH (1:5000) für 1 Stunde inkubiert und

anschließend erneut gewaschen. Schließlich konnten die Membranen für eine eventuelle neue Immundetektion in mit TBS gefüllten Behältern lichtgeschützt bei 4 °C gelagert werden. Mittels 2 ml Entwicklerlösung pro Membran konnten die Membranen an der Geldokumentationsanlage (ChemiDoc™MP Imaging System) visualisiert werden, wobei bei GAPDH keine Entwicklerlösung verwendet wurde. Die Proteinexpressionen konnte anschließend mithilfe der ImageLab™6.0 Software analysiert werden.

3.14 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurden die Programme *GraphPad Prism 5.0* und *Microsoft Excel* verwendet. Beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde der *Two-way* ANOVA Test mit anschließendem *Bonferroni post-Test* angewendet, wobei die Ergebnisse unter einem p-Wert von 0.05 als signifikant galten. Beim Vergleich von lediglich zwei Datensätzen wurde hingegen der *One-way* ANOVA Test durchgeführt. Vereinzelt wurde auch der t-Test angewandt. Dabei wurden die Datensätze der CTB und MTT Versuche auf 1 normiert, wobei 1 die jeweilige Kontrolle darstellt. Die Datensätze der Western Blot Analysen wurden nicht auf 1 normiert.

4 Ergebnisse

Die im folgenden Abschnitt dargestellten Grafiken zu den Ergebnissen aus den CTB und MTT Assay Versuchen sowie den Western Blot Analysen haben alle einen farblich gleichen Aufbau. Die Farbe Blau bedeutet hierbei, dass die Zellen weder mit 453 nm blauem Licht bestrahlt noch mit Riboflavin behandelt wurden. Die Farbe Orange hingegen kennzeichnet die Behandlung mit Riboflavin. Sind die Balken gestreift, so bedeutet dies die Bestrahlung der Zellen mit 453 nm blauem Licht. Somit verweisen die blau-gestreiften Balken auf die Bestrahlung mit blauem Licht ohne Riboflavin und die orange-gestreiften Balken auf die Bestrahlung mit blauem Licht bei zusätzlicher Riboflavingabe. Die jeweilige Gemcitabindosierung ist bei einem Großteil der Graphen der x-Achsenbeschriftung zu entnehmen. Weiterhin sind signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Datensätzen durch ein Sternsymbol in den Grafiken visualisiert. Bei fehlender Signifikanz ist diese meist nicht eingezeichnet oder mit der Bezeichnung "ns" (nicht signifikant) beschriftet.

4.1 Vorversuche

4.1.1 Dosisfindung von Riboflavin

Zur Dosisfindung von Riboflavin wurden in 12-Well-Kulturplatten 3 x 10⁴ Zellen pro Well mit 1 ml Kulturmedium pro Well ausplattiert. Die Zellen wurden über 24 h kultiviert und anschließend mit 110 J/cm² bei 453 nm bestrahlt. Für die Bestrahlungszeit von 47 min wurden die Zellen mit Riboflavin der Dosierungen 5, 10, 20 und 25 µM behandelt. Eine Kontrollplatte mit denselben Riboflavinbehandlungen wurde nicht bestrahlt, sondern für dieselbe Zeit in einen 33 °C warmen gefensterten Wärmeschrank gelegt, um vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Folgend wurde die Riboflavinlösung beider Platten abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit Zellkulturmedium inkubiert und am nächsten Tag der CTB Assay durchgeführt. Der CTB Assay ist ein fluorometrisches Verfahren zur Schätzung der Anzahl lebensfähiger Zellen. Bei diesem Messverfahren wird Resazurin, ein Indikatorfarbstoff zur Messung der Stoffwechselkapazität und Lebensfähigkeit von Zellen, verwendet. Lebensfähige Zellen sind in der Lage, Resazurin zu Resorufin zu reduzieren. Resorufin ist fluoreszierend und kann mithilfe eines Fluoreszenzspektrometers detektiert werden. Nicht lebensfähige Zellen sind nicht mehr in der Lage Resazurin zu Resorufin zu reduzieren, erzeugen daher kein Signal und können nicht gemessen werden [170].

Die Abb. 4 a-c zeigen die Vorversuche zur Ermittlung der Riboflavindosierung für die Zelllinien RT-112, BFTC-905 und SW-1710.





Abb. 4 a-c: Dosisfindung von Riboflavin

Graphische Darstellung des Effektes von 5, 10, 20 und 25 μ M Riboflavin auf die Zellviabilität mit und ohne Bestrahlung mit blauem Licht (453 nm), ausgewertet mittels CTB Assay; n = 8 für jede Zelllinie; * = signifikanter Unterschied der relativen Anzahl lebender Zellen; ns = nicht signifikanter Unterschied der relativen Anzahl lebender Zellen

Innerhalb aller drei Zelllinien wird deutlich, dass für die gewählten Riboflavinkonzentrationen von 5, 10, 20 und 25 µM Riboflavin im Vergleich zur Kontrolle ein nur sehr geringer und nicht signifikanter Effekt von Riboflavin auf eine verminderte Zellviabilität beobachtet werden kann. Erst in Kombination der jeweiligen Riboflavindosierungen mit Bestrahlung durch blaues Licht kann eine signifikant verminderte Zellviabilität im Vergleich zur jeweiligen Riboflavindosierung ohne die Bestrahlung mit blauem Licht beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass mit steigender Riboflavinkonzentration bei gleichbleibender Bestrahlungsintensität die Zellviabilität dosisabhängig abnimmt und somit ein reiner Riboflavineffekt zu beobachten ist. Dieser Riboflavineffekt in Form einer dosisabhängigen Verminderung der Zellviabilität ist für jede Zelllinie und innerhalb aller Riboflavinkonzentrationen beim Vergleich der bestrahlten gegenüber der unbestrahlten Zellen signifikant. Bei allen Zelllinien ist der reine Bestrahlungseffekt in Form einer Abnahme der Anzahl lebender Zellen durch Bestrahlung mit blauem Licht ohne Zugabe von Riboflavin im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant. Die Verstärkung der toxischen Wirkung von blauem Licht durch Riboflavin kann somit in unseren Vorversuchen beobachtet werden.

Um die Zunahme des zuvor beschriebenen Riboflavineffektes mit steigender Riboflavindosierung für jede Zelllinie besser zu verdeutlichen, wird in den Abb. 5 a-c die Differenz zwischen der relativen Anzahl lebender Zellen von bestrahlten und unbestrahlten Zellen für die Kontrollgruppe und für jede Riboflavinkonzentration dargestellt.

Höhere Differenzen bedeuten hier einen größeren Unterschied zwischen der relativen Anzahl lebender Zellen bei entsprechender Riboflavingabe mit und ohne Bestrahlung. Signifikant ist bei jeder Zelllinie die Differenz zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen der Kontrolle im Gegensatz zur Differenz der Riboflavinkonzentration von 25 μ M. Bei den Zelllinien SW-1710 und BFTC-905 ist diese Differenz zusätzlich im Vergleich der Kontrolle zur Riboflavinkonzentration von 20 μ M signifikant. Insgesamt zeigt sich allerdings der zuvor beschriebene Riboflavineffekt im Bereich der höchsten Riboflavindosis von 25 μ M für die Zelllinien SW-1710 und RT-112 schwächer als für die Zelllinie BFTC-905. Dies wird auch an den Mittelwerten der Differenzen der Dosierung von 25 μ M Riboflavin deutlich. So liegen diese bei SW-1710 bei ca. 0,47, bei RT-112 bei 0,42 und bei BFTC-905 bei ca. 0,57.



Differenz zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen

Abb. 5 a-c: Differenz von bestrahlten und unbestrahlten Zellen

Graphische Darstellung der Differenz zwischen der relativen Anzahl lebender Zellen der mit blauem Licht (453 nm) bestrahlten und unbestrahlten Zellen in Kombination mit 5, 10, 20 oder 25 μ M Riboflavin; untersucht mittels CTB Assay; n = 8 für jede Zelllinie; * = signifikanter Unterschied der relativen Anzahl lebender Zellen

4.1.2 Dosisfindung von Gemcitabin

In den Abb. 6 a-c sind die Vorversuche zur Dosisfindung von Gemcitabin dargestellt. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde, wie bereits bei den Vorversuchen zur Dosisfindung von Riboflavin, der CTB Assay verwendet. Auch hierfür wurden in 12-Well-Kulturplatten 3 x10⁴ Zellen pro Well ausplattiert. Allerdings wurden die Zellen über 48 h kultiviert. Die Gemcitabinbehandlung mit 10, 25, 50, 100 und 250 ng/ml erfolgte an beiden Tagen der Kultivierung.

Für die Zelllinie RT-112 zeigen sich signifikante Unterschiede bezüglich der Abnahme der Anzahl lebender Zellen für den Vergleich jeder Dosierung zur Kontrolle. Für die Zelllinien BFTC-905 und SW-1710 zeigt dieser Vergleich, bis auf die Gemcitabinkonzentration von 10 ng/ml, bei allen Konzentrationen signifikante Unterschiede in Bezug auf die Abnahme der Anzahl lebender Zellen. Werden nun die einzelnen Gemcitabindosierungen miteinander verglichen, fallen weiterhin viele Signifikanzen bezüglich der Verminderung der Zellviabilität auf (nicht in der Abb. eingetragen). Bei einer Gemcitabinkonzentration von 25 ng/ml ist lediglich bei der Zelllinie BFTC-905 die relative Anzahl lebender Zellen signifikant geringer als bei einer Gemcitabinkonzentration 10 ng/ml, jedoch nicht bei den anderen beiden Zelllinien. Die Erhöhung von 50 ng/ml Gemcitabin auf 250 ng/ml Gemcitabin macht bei den Zelllinien RT-112 und SW-1710 noch eine signifikante Steigerung der Zytotoxizität durch Gemcitabin aus, bei der Zelllinie BFTC-905 allerdings nicht mehr. Die Dosissteigerung von 100 ng/ml auf 250 ng/ml Gemcitabin hat bei keiner Zelllinie einen signifikanten Effekt auf eine gesteigerte Toxizität. Die Dosierungen von 100 und 250 ng/ml Gemcitabin zeigen somit bei allen Zelllinien sehr starke toxische Wirkungen auf die Zellviabilität. Die anderen Dosierungen zeigten hingegen eher subtoxische Wirkungen auf die Zellviabilität. Um einen Effekt in der späteren Kombination aus Gemcitabin, blauem Licht und Riboflavin beobachten zu können, verwendeten wir für die Hauptversuche nur die insgesamt weniger toxischen Dosierungen von 10, 25 und 50 ng/ml Gemcitabin. Höhere Dosierungen könnten einen zu starken zytotoxischen Effekt auf die Zellen haben, was keine Effektverstärkung durch blaues Licht und Riboflavin ermöglichen würde. 50 ng/ml Gemcitabin zeigen bei der Zelllinie BFTC-905 zwar schon eine starke Reduktion der Zellviabilität, bei der Zelllinie SW-1710 ist diese Dosierung allerdings noch subtoxisch und wurde daher zunächst in die Hauptexperimente miteingeschlossen.





Abb. 6 a-c: Dosisfindung von Gemcitabin

Graphische Darstellung des Effektes von 10, 25, 50, 100 und 250 ng/ml Gemcitabin auf die Zellviabilität; untersucht mittels CTB Assay; n = 7 für alle Zelllinien; * = signifikanter Unterschied der relativen Anzahl lebender Zellen

4.2 Hauptversuche

4.2.1 Einflüsse von Gemcitabin, blauem Licht, Riboflavin und der Kombination aller drei Substanzen auf die Zellviabilität; Messung mittels CTB Assay

Rückschlüsse über die Zellviabilität und die relative Anzahl lebender Zellen im Anschluss an die Gabe von Gemcitabin, blauem Licht, Riboflavin und der Kombination dieser drei Substanzen gelangen uns u.a. durch Verwendung des CTB Assay. Der Versuchsaufbau und die Behandlung der Zellen mit den entsprechenden Substanzen erfolgte dabei wie im Methodenteil beschrieben (s.a. Kapitel 3.8).

In den Abb. 7 a-c sind die Ergebnisse der CTB Assay Auswertungen dargestellt. Durch diese Abbildungen und Auszüge dieser werden in den nachfolgenden Unterkapiteln die Effekte der einzelnen Wirkstoffe und deren Kombination auf die Zellviabilität und die relative Anzahl lebender Zellen näher erläutert.



Abb. 7 a-c: Effekt von blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin auf die relative Anzahl lebender Zelle; gemessen mittels CTB Assay

Messung der Zellviabilität mittels CTB Assay mit Signifikanzen für den Effekt von blauem Licht, den Effekt von Riboflavin sowie dem kombinierten Effekt aus blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin auf die relative Anzahl lebender Zellen; n = 7 RT-112, n = 8 BFTC-905+ SW-1710; * = signifikanter Unterschied der relative ven Anzahl lebender Zellen

4.2.1.1 Effekt von blauem Licht

In den Abb. 7 a-c wird u.a. der reine Effekt von blauem Licht auf eine verminderte Zellviabilität innerhalb der Kontrollgruppe und der einzelnen Gemcitabinkonzentrationen deutlich. Beim Vergleich der bestrahlten Zellen ohne Riboflavin im Gegensatz zur Kontrolle beziehungsweise zur alleinigen Gemcitabingabe wird dieser Effekt sichtbar. Die relative Anzahl lebender Zellen nimmt bei Bestrahlung mit blauem Licht innerhalb aller Zelllinien stärker ab als ohne. Signifikant ist die Abnahme der Zellviabilität durch den reinen Effekt von blauem Licht jedoch lediglich bei den Zelllinien RT-112 und BFTC-905 für die Gemcitabinkonzentration von 10 ng/ml bei Bestrahlung mit blauem Licht im Vergleich zur alleinigen Gabe von 10 ng/ml Gemcitabin. Innerhalb der Kontrollgruppe ist der Effekt von blauem Licht auf eine Reduktion der Anzahl lebender Zellen sichtbar, jedoch nicht signifikant. Innerhalb der Gemcitabinkonzentrationen von 25 und 50 ng/ml gibt es für keine Zelllinie signifikante Unterschiede bezüglich einer verminderten Zellviabilität zwischen den bestrahlten und den nicht bestrahlten Zellen. Bei der Zelllinie SW-1710 ist der toxische Effekt von blauem Licht in Kombination mit Gemcitabin auf eine Reduktion der Zellzahl für keine Gemcitabinkonzentration signifikant, wobei innerhalb der Konzentration von 25 ng/ml dieser Effekt deutlich sichtbar ist.

4.2.1.2 Effekt von Riboflavin

Die Wirkverstärkung der zytotoxischen Wirkung von blauem Licht durch Riboflavin auf eine verminderte Zellviabilität wird in den Abb. 7 a-c verdeutlicht. Sichtbar wird diese Wirkverstärkung beim Vergleich der bestrahlten Zellen innerhalb der Kontrollgruppe bzw. innerhalb der Gemcitabinkonzentrationen. Hierbei zeigt sich eine verminderte Zellviabilität bei der Zugabe von Riboflavin zur Bestrahlung mit blauem Licht im Gegensatz zur Bestrahlung mit blauem Licht ohne Riboflavin. Signifikant wird dieser Effekt einer verstärkten Zytotoxizität durch Riboflavin für die Zelllinie RT-112 innerhalb der Kontrollgruppe und innerhalb der Gemcitabinkonzentration von 25 ng/ml. Für die Zelllinie BFTC-905 zeigen sich nur innerhalb der Kontrollgruppe und bei der Zelllinie SW-1710 nur innerhalb der Gemcitabinkonzentration von 25 ng/ml. Für die Zelllinie sur Vergleich zur Bestrahlung mit blauem Licht ohne Riboflavin. Betrachtet man die Abbildungen im Allgemeinen ist die durch Zugabe von Riboflavin verstärkte Reduktion der Anzahl lebender Zellen zwar nicht immer signifikant, aber deutlich sichtbar.

4.2.1.3 Effekt von blauem Licht in Kombination mit Riboflavin

Für die Kombination aus blauem Licht und Riboflavin konnte innerhalb der Kontrollgruppe und innerhalb der Gemcitabinkonzentrationen eine geringere Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle beziehungsweise im Vergleich zur alleinigen Gemcitabingabe nachgewiesen werden. Dies ist in den Abb. 7 a-c dargestellt. Signifikanzen hierfür zeigen sich für die Zelllinien BFTC-905 und RT-112 innerhalb der Kontrollgruppe und der Gemcitabinkonzentrationen von 10 und 25 ng/ml sowie für die Zelllinie SW-1710 innerhalb der Gemcitabinkonzentration von 25 ng/ml.

Der Interaktionseffekt von Riboflavin und blauem Licht wird außerdem deutlich, wenn man innerhalb der Kontrollgruppe bzw. innerhalb der einzelnen Gemcitabinkonzentrationen die Kontrolle oder die alleinigen Gemcitabingaben mit der Gabe von Riboflavin ohne die zusätzliche Bestrahlung mit blauem Licht vergleicht. Hierbei ist kein sichtbarer Unterschied der relativen Anzahl lebender Zellen zwischen der Kontrolle oder der alleinigen Gemcitabingabe und der Gabe von Riboflavin sichtbar. Wird Riboflavin allerdings mit blauem Licht kombiniert kommt es zu einem verstärkt toxischen Effekt auf die Zellen im Vergleich zur alleinigen Gabe von Riboflavin mit oder ohne Gemcitabin. Der Vergleich zwischen der relativen Anzahl lebender Zellen bei alleiniger Riboflavingabe mit oder ohne Gemcitabin im Gegensatz zu der zusätzlichen Behandlung mit blauem Licht ist für die Zelllinien BFTC-905 innerhalb der Kontrollgruppe und der Gemcitabinkonzentrationen von 10 und 25 ng/ml signifikant. Für die Zelllinie RT-112 ist dieser Vergleich innerhalb der Kontrollgruppe und der Gemcitabinkonzentration von 10 ng/ml signifikant und für die Zelllinie SW-1710 innerhalb der Gemcitabinkonzentration von 25 ng/ml.



Abb. 8 a-c: Effekt von 10, 25 und 50 ng/ml Gemcitabin auf die relative Anzahl lebender Zellen

Messung der Zellviabilität mittels CTB Assay; Auszug der Abb. 7 a-; n = 7 RT-112, n = 8 BFTC-905 + SW-1710; * = signifikanter Unterschied der relativen Anzahl lebender Zellen

4.2.1.4 Effekt von Gemcitabin

Der toxische Effekt der alleinigen Gemcitabinbehandlung ohne Bestrahlung mit blauem Licht und ohne Gabe von Riboflavin auf die relative Anzahl lebender Zellen wird sichtbar beim Vergleich der jeweiligen Gemcitabinkonzentrationen mit der Kontrolle. Dieser Vergleich ist in den Abb. 8 a-c, ein Auszug aus Abb. 7 a-c, für jede Zelllinie dargestellt.

Innerhalb der Zelllinien BFTC-905 und SW-1710 ist der toxische Effekt der alleinigen Gemcitabinbehandlung auf eine Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle für alle Gemcitabindosierung außer der von 10 ng/ml signifikant. Bei der Zelllinie RT-112 ist dieser Vergleich für jede Gemcitabinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle signifikant. Insgesamt zeigt sich für jede der drei Zelllinien eine sinkende Zellviabilität mit steigender Gemcitabindosis. Dies wird deutlich, da für alle Zelllinien bei höheren Gemcitabinkonzentrationen signifikant weniger lebensfähige Zellen messbar sind im Vergleich zu den jeweils niedrigeren Dosierungen (Signifikanzen nicht eingetragen in den Grafiken aus Abb. 8 a-c). Beim Vergleich der jeweiligen Gemcitabinkonzentrationen untereinander fällt auf, dass die relative Anzahl lebender Zellen bei 50 ng/ml im Vergleich zu 10 ng/ml Gemcitabin um mehr als das Doppelte sinkt. Dieser Effekt ist für alle drei Zelllinien sichtbar und signifikant (Signifikanzen nicht eingetragen in den Grafiken aus Abb. 8 a-c).

4.2.1.5 Effekt der Kombination aller drei Substanzen

In den Abb. 9 a-c ist der Vergleich zwischen der Gabe von blauem Licht und Riboflavin mit oder ohne Gemcitabin zur alleinigen Gemcitabingabe für jede Zelllinie abgebildet (1+2+3). Diese Abbildungen sind ein Auszug der Abb. 7 a-c. Vergleicht man innerhalb der einzelnen Zelllinien die alleinige Gabe von 10 ng/ml Gemcitabin mit der Gabe von Riboflavin und blauem Licht ohne Gemcitabin (1) fällt auf, dass die Kombination von Riboflavin und blauem Licht einen ähnlich starken Effekt auf eine Reduktion der Zellviabilität hat wie die alleinige Gabe von 10 ng/ml Gemcitabin. Beim Vergleich der alleinigen Gabe der nächsthöheren Dosis von 25 ng/ml Gemcitabin mit der Kombination aus blauem Licht, Riboflavin und 10 ng/ml Gemcitabin (2) zeigt sich ein ähnlicher Effekt. Die Kombination von Riboflavin, blauem Licht und 10 ng/ml Gemcitabin hat einen ähnlich starken Effekt auf eine verminderte Zellviabilität wie die alleinige Gabe von 25 ng/ml Gemcitabin. Eine um 60% geringere Gemcitabindosis kann mithilfe der Kombination aus blauem Licht und Riboflavin nahezu genauso stark auf eine Reduktion der Zellviabilität wirken wie die alleinige Gabe von Gemcitabin. Ebenfalls lässt sich eine ähnlich starke Abnahme der Zellviabilität beim Vergleich der alleinigen Gabe von 50 ng/ml Gemcitabin gegenüber der Kombination aus blauem Licht, Riboflavin und 25 ng/ml Gemcitabin beobachten. Hierbei beträgt die Reduktion der Gemcitabindosis etwa 50% (3).

Die Abb. 10 a-c sind ebenfalls ein Auszug der Abb. 7 a-c und veranschaulichen die Kombinationen aus blauem Licht und Riboflavin mit oder ohne Gemcitabin für jede Gemcitabinkonzentration. Für alle Zelllinien zeigt die Kombination aus blauem Licht, Riboflavin und 25 ng/ml oder 50 ng/ml Gemcitabin einen signifikant abnehmenden Effekt auf die Zellviabilität im Gegensatz zur Konzentration von 10 ng/ml Gemcitabin in der Verbindung mit blauem Licht und Riboflavin. Ebenfalls zeigt die Kombination aus blauem Licht, Riboflavin und 25 ng/ml oder 50 ng/ml Gemcitabin innerhalb jeder Zelllinie eine signifikante Abnahme der relativen Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur selben Kombination ohne Gemcitabin. Lediglich bei der Zelllinie RT-112 zeigt die Gabe von blauem Licht und Riboflavin mit 10 ng/ml Gemcitabin eine signifikant geringere relative Anzahl lebender Zellen im Kontrast zur Gabe von blauem Licht und Riboflavin ohne Gemcitabin. Die Gabe von 25 oder 50 ng/ml Gemcitabin jeweils mit Blaulichtbestrahlung und Gabe von Riboflavin zeigen keinen signifikanten Unterschied zueinander.



Abb. 9 a-c: Vergleich der relativen Anzahl lebender Zellen bei Gabe von blauem Licht und Riboflavin mit oder ohne Gemcitabin gegenüber der alleinigen Gemcitabingabe; gemessen mittels CTB Assay

Messung der Zellviabilität mittels CTB Assay; Auszug der Abb. 7 a-c; n = 7 RT-112, n = 8 BFTC-905+ SW-1710; 1 = Ribo. + Bestr. vs. 10 ng/ml Gem.; 2 = Ribo. + Best. + 10 ng/ml Gem. vs. 25 ng/ml Gemcitabin; 3=Ribo. + Best. + 25 ng/ml Gem. vs. 50 ng/ml Gemcitabin



Abb. 10 a-c: Effekt der jeweiligen Kombinationen mit blauem Licht und Riboflavin mit oder ohne Gemcitabin auf die relative Anzahl lebender Zellen; gemessen mittels CTB Assay

Messung der Zellviabilität mittels CTB Assay; Auszug der Abb.7 a-c; n = 7 RT-112, n = 8 BFTC-905 + SW170, * = signifikanter Unterschied der relativen Anzahl lebender Zellen

4.2.2 Einflüsse von Gemcitabin, blauem Licht, Riboflavin und der Kombination aller drei Substanzen auf die Zellviabilität; Messung mittels MTT Assay

Der MTT Assay misst, ebenso wie der CTB Assay, die Zellviabilität. Dabei wird von den metabolisch aktiven Zellen der Farbstoff MTT zu Formazan umgewandelt [169]. Um die toxische Wirkung der Behandlung mit Gemcitabin, blauem Licht, Riboflavin und der Kombination aller drei Substanzen auf die drei Harnblasenkarzinomzelllinien zu untersuchen, wurde der Versuchsaufbau wie im Vorfeld beschrieben durchgeführt (s.h. Kapitel 3.8).

Die Ergebnisse des MTT Assay, zu sehen in den Abb. 11 a-c, zeigen die toxische Wirkung der vorgestellten Kombinationsbehandlung auf die Zellviabilität, was zu einer verminderten Anzahl lebender Zellen führt. Allerdings wurde hier die Gemcitabindosis von 50 ng/ml nicht verwendet, da diese, wie in den CTB Experimenten herausgefunden wurde, einen zu starken zytotoxischen Effekt hat. Somit wäre eine signifikante Verstärkung der zytotoxischen Wirkung von 50 ng/ml Gemcitabin durch blaues Licht und Riboflavin nicht möglich.



Abb. 11 a-c: Effekt von blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin auf die relative Anzahl lebender Zellen; gemessen mittels MTT Assay

Messung der Zellviabilität mittels MTT Assay mit Signifikanzen für den Effekt von blauem Licht, den Effekt von Riboflavin sowie dem kombinierten Effekt aus blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin auf die Zellviabilität; n = 6 für alle Zelllinien; * = signifikanter Unterschied der relativen Anzahl lebender Zellen

Die Ergebnisse unterstreichen zum einen die verstärkte zytotoxische Wirkung von blauem Licht durch Riboflavin und zum anderen die Potenzierung der zytotoxischen Wirkung von Gemcitabin durch blaues Licht und Riboflavin. Im Vergleich zu den Ergebnissen des CTB Assay sind insgesamt bei den Ergebnissen des MTT Assay für jede Zelllinie mehr signifikante Effekte bezüglich einer Reduktion der Zellviabilität zu beobachten. Aus diesem Grund werden im Folgenden lediglich Effekte in Form einer verminderten Zellviabilität beschrieben, welche im CTB Assay keine Signifikanzen zeigten und somit im MTT Assay neu auftraten. Bei der Zelllinie BFTC-905 zeigt die alleinige Bestrahlung mit blauem Licht eine signifikante Reduktion der relativen Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Außerdem ist innerhalb der Gemcitabinkonzentration von 10 ng/ml der Vergleich zwischen den bestrahlten Zellen, also der Effekt von Riboflavin auf eine Reduktion der Zellviabilität, signifikant. Bei der Zelllinie RT-112 kommt es zusätzlich zu den signifikanten Verminderungen der Zellviabilität, die bereits für den CTB Assay beschrieben wurden, zu einer signifikant geringeren Zellviabilität durch Bestrahlung mit blauem Licht innerhalb der Kontrollgruppe und für die Gemcitabinkonzentration von 25 ng/ml im Vergleich zur Kontrolle bzw. zur alleinigen Gabe von 25 ng/ml Gemcitabin. Für die Zelllinie SW-1710 zeigen sich in den Ergebnissen des MTT Assay die signifikanten Verminderungen der Zellviabilität, welche sich bei den Ergebnissen des CTB Assay nur innerhalb der Gemcitabinkonzentration von 25 ng/ml zeigten, auch für die Kontrollgruppe und die Gemcitabinkonzentration von 10 ng/ml. Weiterhin zeigt die alleinige Bestrahlung mit blauem Licht eine signifikant verringerte Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings ergibt sich für die Zelllinie SW-1710 keine signifikante Reduktion der Zellviabilität beim Vergleich der bestrahlten Zellen innerhalb der Gemcitabinkonzentration von 25 ng/ml.

In den Abb. 12 a-c, einem Ausschnitt der Abb. 11 a-c, ist der Vergleich zwischen der relativen Anzahl lebender Zellen bei Gabe von blauem Licht und Riboflavin mit oder ohne Gemcitabin gegenüber der alleinigen Gemcitabingabe für jede Zelllinie abgebildet (1+2). Dieser Vergleich wurde für die Ergebnisse des CTB Assay bereits in den Abb. 9 a-c beschrieben.



Keine Bestrahlung kein Riboflavin

Abb. 12 a-c: Vergleich der relativen Anzahl lebender Zellen bei Gabe von blauem Licht und Riboflavin mit oder ohne Gemcitabin gegenüber der alleinigen Gemcitabingabe; gemessen mittels MTT Assay

Messung der Zellviabilität mittels MTT Assay; Auszug der Abb. 11 a-c; n = 6 für alle Zelllinien; 1 = Ribo. + Bestr. vs. 10 ng/ml Gem.; 2 = Ribo. + Best. + 10 ng/ml Gem. vs. 25 ng/ml Gemcitabin; * = signifikanter Unterschied der relativen Anzahl lebender Zellen

In den Ergebnissen des MTT Assay wird deutlich, dass die Bestrahlung mit blauem Licht bei zusätzlicher Gabe von Riboflavin ohne Gemcitabin im Vergleich zur alleinigen Gabe von 10 ng/ml Gemcitabin die Zellviabilität signifikant vermindert. Dies lässt sich für alle drei Zelllinien zu beobachten (1). Ein ähnlicher Effekt kann gezeigt werden, wenn man die Gabe von 10 ng/ml Gemcitabin, blauem Licht und Riboflavin mit der alleinigen Gabe von 25 ng/ml Gemcitabin vergleicht (2). Bei der Zelllinie RT-112 wird die Zellviabilität durch die Applikation von 10 ng/ml Gemcitabin, kombiniert mit Riboflavin und blauem Licht signifikant stärker reduziert als bei alleiniger Applikation der mehr als doppelt so hohen Gemcitabindosis von 25 ng/ml (2). Dieser Effekt ist auch bei den anderen beiden Zelllinien BFTC-905 und SW-1710 deutlich sichtbar, allerdings nicht signifikant (2). Außerdem verdeutlicht der Vergleich des relativen Anteils lebender Zellen innerhalb der Kombinationsbehandlung aus blauem Licht, Riboflavin und 10 ng/ml Gemcitabin zwischen der Zelllinie RT-112 und den anderen beiden Zelllinien das bessere Ansprechen der RT-112 Zelllinie auf die Kombinationsbehandlung. Bei der Zelllinie RT-112 liegt der Anteil lebender Zellen für die Kombinationsbehandlung aus blauem Licht, Riboflavin und 10 ng/ml Gemcitabin bei 0.17 und ist damit niedriger als bei der Zelllinie BFTC-905 und SW-1710 mit jeweils einem Anteil lebender Zellen von 0.29 für BFTC-905 und von 0.22 für SW-1710.

Im Rahmen der Ergebnisse des MTT Assay lässt sich für keine Zelllinie ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Kombinationen mit blauem Licht und Riboflavin auf die Zellviabilität feststellen. Dieser Vergleich ist für die drei Zelllinien in den Abb. 13 ac, ein Ausschnitt der Abb. 11a-c, dargestellt und wurde für die Ergebnisse des CTB Assay in Abb. 10 a-c bereits beschrieben.





Abb. 13 a-c: Effekt der jeweiligen Kombinationen mit blauem Licht und Riboflavin mit oder ohne Gemcitabin auf die relative Anzahl lebender Zellen; gemessen mittels MTT Assay

Messung der Zellviabilität mittels MTT Assay; Auszug der Abb. 11 a-c; n = 6 für alle Zelllinien

Die Kombination aus blauem Licht und Riboflavin ohne Gemcitabin im Vergleich zur Kombination aus blauem Licht, Riboflavin und 10 ng/ml oder 25 ng/ml Gemcitabin zeigt keinen signifikanten Unterschied bezüglich einer Abnahme der relativen Anzahl lebender Zellen zueinander. Genauso wenig zeigt die Kombination aus blauem Licht, Riboflavin und 10 ng/ml eine signifikant geringere Zellviabilität zur gleichen Kombination mit 25 ng/ml. Es scheint keine signifikante Effektverstärkung der Zytotoxizität von blauem Licht und Riboflavin durch Gemcitabin mehr möglich zu sein.

4.2.3 Ermittlung der Proteinexpressionen von Bax, Bcl2 und γH2AX mittels Western Blot Analyse

Die im folgendem dargestellten Graphen zeigen die Einflüsse von blauem Licht mit einer Wellenlänge von 453 nm, 10 μ M Riboflavin und 25 ng/ml Gemcitabin sowie deren Kombination auf die Expression von γ H2AX, Bax und Bcl2. Für die Ermittlung der Expression alle drei Proteine wurde dabei die Western Blot Analyse verwendet. Für die Untersuchung der γ H2AX Expression war für die Zelllinie RT-112 die Versuchsanzahl n = 6, für die Zelllinie BFTC-905 n = 4 und für die Zelllinie SW-1710 n = 5. Für die Expression von Bax war bei der Zelllinie RT-112 n= 4 und bei den Zelllinie BFTC-905 und SW170 n = 3. Bei der Untersuchung der Bcl2 Expression war für die Zelllinie RT-112 n=5, für die Zelllinie BFTC-905 n=6 und für die ZW-1710 n=4.

In den Abb. 14 a-c sind beispielhaft für die Zelllinie SW-1710 die einzelnen Proteinexpressionen sowie Ausschnitte der zugehörigen Membranen und GAPDH (Glycerinaldehyd-3phosphat-Dehydrogenase) dargestellt. Sichtbar wird der Anstieg von Bax und γH2AX sowie der Abfall von Bcl2 mit steigender Dosis von Gemcitabin sowie mit der Zugabe von blauem Licht (453 nm) und Riboflavin.



Abb. 14 a-c: Expression von Bcl2, Bax und YH2AX

Beispielhaft für die Zelllinie SW-1710 sind die Diagramme und jeweiligen Blots zur Bcl2, Bax und γ H2AX Expression im Vergleich zur GAPDH Expression veranschaulicht; im Diagramm nicht dargestellt ist die jeweilige Proteinexpression der alleinigen Bestrahlung bzw. Bestrahlung + Gemcitabin von Bcl2, Bax und γ H2AX; untersucht mittels Western Blot Analyse; für Bcl2 n = 5, für Bax n = 3 und für γ H2AX n = 6

4.2.4 Einflüsse von Gemcitabin, blauem Licht, Riboflavin und der Kombination aller drei Substanzen auf die Zellschädigung

Um zu untersuchen, ob die Kombinationsbehandlung sowie die einzelnen Substanzen alleine DNA-Schäden verursachen, wurde die Expression von γH2AX mittels Western Blot Analyse untersucht. Hierzu wurde eine Dosis von 25 ng/ml Gemcitabin gewählt, da die Ergebnisse der Vorversuche sowie die Ergebnisse der CTB und MTT Assay im Rahmen Hauptversuche zeigen konnten, dass diese Dosis für alle Zelllinien eine subtoxische Wirksamkeit zeigte, ohne dabei die Zellen zu stark zu schädigen.

In den Abb. 15 a-c ist zu sehen, dass zum einen die Bestrahlung durch blaues Licht in Kombination mit der Gabe von Riboflavin im Vergleich zur alleinigen Riboflavingabe die Expression von γH2AX in einem nicht signifikanten, aber sichtbaren Maße erhöht. Zum anderen wird sichtbar, dass die Bestrahlung durch blaues Licht in Kombination mit der Gabe von Riboflavin und 25 ng/ml Gemcitabin im Vergleich zur Gabe von Riboflavin und Gemcitabin ohne Bestrahlung die Expression von γH2AX ebenfalls in einem nicht signifikanten, aber sichtbaren Maße erhöht. Beides unterstreicht den verstärkenden Effekt von blauem Licht auf eine erhöhte Zellschädigung und damit auf ein erhöhtes Zellsterben. Außerdem zeigen diese Abbildungen, dass durch Zugabe von Gemcitabin die zellschädigende Wirkung von blauem Licht und Riboflavin verstärkt wird.



Abb. 15 a-c: Expression von γ H2AX im Vergleich von alleiniger Riboflavingabe zur Kombination mit blauem Licht mit und ohne Gemcitabin

Untersucht mittels Western Blot Analyse; n = 6 RT-112, n = 4 BFTC-905 n = 5 SW170



Abb. 16 a-c: Expression von γ H2AX im Vergleich von alleiniger Riboflavingabe zur Kombination aus blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin

Untersucht mittels Western Blot Analyse; n = 6 RT-112 + SW170, n = 4 BFTC-90; * = signifikanter Unter-schied des Expressionslevels
In den Abb. 16 a-c ist der Vergleich zwischen der γH2AX Expression bei alleiniger Riboflavingabe und bei Gabe aller drei Substanzen zusammen dargestellt.

Hierbei lässt sich für die Zelllinie RT-112 ein signifikanter Unterschied bezüglich einer erhöhten γH2AX Expression bei Gabe aller drei Substanzen im Gegensatz zur alleinigen Riboflavingabe bestimmen, nicht jedoch für die anderen beiden Zelllinien. Bei diesen ist dieser Unterschied nur sichtbar, jedoch nicht signifikant. Diese Ergebnisse unterstreichen die Effektverstärkung von Riboflavin durch die Kombination mit Gemcitabin und blauem Licht.

Die Abb. 17 a -c zeigen den direkten Vergleich der Kontrolle zur kombinierten Gabe aller drei Substanzen für die jeweiligen Zelllinien.

Bei der Zelllinie SW-1710 zeigte sich eine signifikant erhöhte vH2AX Expression bei Anwendung aller drei Substanzen im Vergleich zur Kontrolle. Für die Zelllinie RT-112 ist die erhöhte vH2AX Expression bei Anwendung aller drei Substanzen im Vergleich zur Kontrolle auch sichtbar, allerdings schwächer als bei der Zelllinie SW-1710 und im Gegensatz zu dieser nicht signifikant. Nichtsdestotrotz ist ein Unterschied sichtbar. Die Zellschädigung durch die Kombinationstherapie auf die Zelllinien SW-1710 und RT-112 wird somit unterstrichen. Bei der Zelllinie BFTC-905 ist die Expression von vH2AX innerhalb der Kontrolle allerdings höher als bei der Anwendung der Kombinationstherapie.



Abb. 17 a-c: Expression von γ H2AX im Vergleich der Kontrolle zur Kombination aus blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin

Untersucht mittels Western Blot Analyse; n = 6 RT-112 + BFTC-905, n = 5 SW170; * = signifikanter Unter-schied des Expressionslevels

4.2.5 Einflüsse von Gemcitabin, blauem Licht, Riboflavin und der Kombination aller drei Substanzen auf die Apoptose

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem Tod der Krebszellen durch die Behandlung mit blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin um Apoptose handelt, wurde die Expression von Bax und Bcl2 mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Ergebnisse der Bax Expression sind in den Abb. 18 a-c dargestellt.

Die Expression von Bax zeigt innerhalb der BFTC-905 und SW-1710 Zelllinie in Abb. 18 b und c einen kontinuierlichen Anstieg mit Zunahme der für die Zellen toxischen Substanzen und der Bestrahlung mit 453 nm blauem Licht. Beim Vergleich der alleinigen Gabe von Riboflavin im Gegensatz zur Gabe von Riboflavin und blauem Licht fällt kein sichtbarer Unterschied bezüglich der Höhe der Bax Expression auf (Abb. 18 b 1 und 18 c 1). Bei der zusätzlichen Gabe von 25 ng/ml Gemcitabin wird allerdings die höhere Bax Expression bei Behandlung mit Gemcitabin, blauem Licht und Riboflavin im Gegensatz zur Gabe von Riboflavin und Gemcitabin ohne Bestrahlung mit blauem Licht, vor allem für die Zelllinie SW-1710, deutlich (Abb. 18 b 2 und 18 c 2). Für die Zelllinie RT-112 sind die Western Blot Ergebnisse der Bax Expression in Abb. 18 a dargestellt. Die Ergebnisse sind insgesamt ähnlich denen der BFTC-905 und SW-1710 Zelllinie. Die Kontrolle zeigt allerdings eine größere Bax Expression als die alleinige Riboflavin kombiniert mit der Bestrahlung mit 453 nm blauem Licht. Ohne Gemcitabin zeigt sich bei den Zelllinien RT-112 und SW-1710 kaum ein Anstieg der Bax Expression, bei der Zelllinie BFTC-905 hingegen schon.



Abb. 18 a-c: Expression von Bax

Untersucht mittels Western Blot Analyse; 1 = Vergleich zwischen alleiniger Riboflavingabe und der Gabe von Riboflavin zusammen mit blauem Licht; <math>2 = Vergleich zwischen alleiniger Riboflavingabe und der Gabe von Riboflavin zusammen mit blauem Licht und 25 ng/ml Gemcitabin; <math>n = 4 RT-112, n = 3 BFTC-905 + SW170



Abb. 19 a-c: Expression von Bcl2

Untersucht mittels Western Blot Analyse; n = 5 RT-112+ SW170, n = 6 BFTC-905

In den Abb. 19 a-c sind die Western Blot Ergebnisse zur Bcl2 Expression für jede Zelllinie dargestellt.

Vergleicht man die Bcl2 Expression der Kontrolle mit der Kombination aus blauem Licht, Riboflavin und 25 ng/ml Gemcitabin ist ein deutlicher Abfall von Bcl2 für alle drei Zelllinien sichtbar. Dabei zeigt sich für die Zelllinie SW-1710 der insgesamt deutlichste Abfall der Bcl2 Expression mit Zunahme der für die Zellen toxischen Substanzen und der Bestrahlung mit 453 nm blauem Licht. Für diese Zelllinie lassen sich also nicht nur für die Bax Expression, sondern auch für die Bcl2 Expression die deutlichsten Ergebnisse hinsichtlich eines Anstiegs von Bax und eines Abfalles von Bcl2 zeigen.

Bei den Ergebnissen für die Bcl2 Expression zeigte sich für die Zelllinie BFTC-905 insgesamt eine Abnahme der Bcl2 Expression mit Zunahme der für die Zellen toxischen Substanzen und der Bestrahlung mit 453 nm blauem Licht. Allerdings kommt es bei der alleinigen Riboflavingabe zu einem stärkeren Abfall der Bcl2 Expression als bei Bestrahlung mit blauem Licht und Gabe von Riboflavin.

Um den Effekt der Kombinationsbehandlung auf die Apoptose deutlicher darzustellen und besser differenzieren zu können, sind in Abb. 20 a-c die Vergleiche zwischen den jeweiligen Kontrollen und der Kombinationsbehandlung in einer direkten Gegenüberstellung für Bax und Bcl2 dargestellt.







b

а

BFTC-905







Untersucht mittels Western Blot Analyse; Vergleich zwischen Kontrolle und der Kombination aller drei Substanzen; für Bax: n = 4 RT-112, n = 3 BFTC-905 + SW170, für Bcl2: n = 5 RT-112 + SW170, n = 6 BFTC-905; * = signifikanter Unterschied des Expressionslevels

Für jede Zelllinie wird der Anstieg von Bax durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur Kontrolle deutlich, jedoch ist dieser Anstieg für keine Zelllinie signifikant. Der Abfall von Bcl2 durch die Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Kontrolle ist hingegen bei den Zelllinien BFTC-905 und SW-1710 signifikant.

Um den deutlichen Abfall von Bcl2 und den starken Anstieg von Bax innerhalb der SW-1710 Zelllinie noch besser zu veranschaulichen, wurde der Bax/Bcl2-Index gebildet, welcher in Abb. 21 dargestellt ist. Der Index gibt die Relation von Bax zur Basis von Bcl2 an.



SW-1710 - Bax/Bcl2 - Index

Abb. 21: Bax/Bcl2-Index der SW-1710 Zelllinie

Untersucht mittels Western Blot Analyse mit Signifikanzen für den Vergleich zwischen Kontrolle bzw. alleiniger Gemcitabingabe zur Kombinationsbehandlung; n=3; * = signifikanter Unterschied des Expressionslevels

Im Unterschied zu den Abb. 18 a-c und 19 a-c ist hier auch die Bestrahlung mit blauem Licht ohne Riboflavin abgebildet. Dies soll verdeutlichen, dass der Index durch die Zugabe von Riboflavin ansteigt. Beim Vergleich der Kontrolle zur Bestrahlung mit blauem Licht in Kombination mit der Gabe von Gemcitabin und Riboflavin wird die signifikant höhere Expression von Bax in Relation zu Bcl2 sichtbar. Dies spricht für eine verstärkte Apoptose durch die Kombinationstherapie aus blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin im Vergleich

zur Kontrolle. Der Index steigt allerdings nur innerhalb der Gemcitabin Kombinationen im Gegensatz zu allen Kombinationen ohne Gemcitabin an. Dies deutet auf eine Effektverstärkung von blauem Licht und Riboflavin durch Gemcitabin hin. Betrachtet man die Höhe der Bax Expression in Relation zu Bcl2 innerhalb der Gemcitabingruppe fällt auf, dass durch die Kombination aller drei Substanzen die Apoptoserate im Gegensatz zu den restlichen Kombinationen potenziert wird. Dies zeigt eine signifikant höhere Apoptoserate bei der Gabe aller drei Substanzen im Vergleich zur alleinigen Gemcitabingabe. Blaues Licht allein scheint keine Effektsteigerung von Gemcitabin auf eine erhöhte Apoptoserate zu erzeugen, wohingegen die Kombination von Riboflavin mit Gemcitabin, aber ohne blaues Licht, die Apoptose steigert.

Insgesamt unterstreicht der Bax/Bcl2-Index für die Zelllinie SW-1710 den verstärkten apoptotischen Effekt der gemeinsamen Gabe von Gemcitabin, blauem Licht und Riboflavin, da ein deutlicher Anstieg der Bax Expression in Relation zur Bcl2 Expression sichtbar ist.

5 Diskussion

Die Behandlung von Krebserkrankungen ist zum aktuellen Stand der Forschung ein Abwägen zwischen Lebensverlängerung und Lebensqualität. Das liegt vor allem an den Nebenwirkungen der Therapien, welche Komplikationen nach Operationen oder toxische Nebenwirkungen der Chemotherapie sein können [47, 48, 63, 67]. Dies stellt große Hürden bei der Therapieplanung und -durchführung dar. Um diesen Konflikt zu reduzieren ist es wichtig Therapieoptionen zu finden, die für den Patienten weniger toxisch sind. Eine Kombinationstherapie könnte dabei eine Alternative zu den konventionellen Behandlungen sein. Diese besteht aus einer Kombination von für den menschlichen Körper toxischen und nicht toxischen Substanzen. Dabei sind jedoch alle Komponenten für die Krebszellen toxisch. Durch die Kombinationstherapie könnte die Dosierung der für den menschlichen Körper toxischen Substanz reduziert werden. Die unerwünschten Nebenwirkungen für den Patienten würden hierdurch verringert werden.

In unserer Studie haben wir daher neben Gemcitabin auch blaues Licht und Riboflavin eingesetzt. Riboflavin ist als Teil des Vitamin B-Komplexes und u.a. als Teil der Atmungskette ein natürlicher Bestandteil des Stoffwechsels und damit für den menschlichen Körper essenziell. Allerdings wurde im Rahmen einer Studie bei hohen Dosierungen von 200 und 400 µmol/L Riboflavin nach 72 h der Exposition ein signifikant erhöhtes Wachstum von Lungenkrebszellen beobachtet [171]. In der erwähnten *in-vitro*-Studie wurde der Effekt vierer verschiedener Riboflavindosierungen (50, 100, 200 und 400 µmol/L) auf drei verschiedene nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzelllinien (NSCLC) (A549, H3255 und Calu-6) sowie eine nicht karzinomatöse Lungenzelllinie (humane Lungenfibroblasten) untersucht. Um dies näher zu charakterisieren wurden u.a. die Invasions-, Proliferations- und Migrationsraten analysiert sowie die Höhe von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Glutathion bestimmt. Auffällig war hierbei, dass Riboflavin in den Dosierungen von 200 und 400 µmol/L signifikant die Proliferation, Invasion und Migration in den drei NSCLC-Zelllinien förderte. Lediglich auf das Niveau von ROS und Glutathion hatten alle verwendeten Testdosierungen keinen Einfluss [171].

Auch wenn die verwendeten Zellen dieser Arbeit Harnblasenkarzinomzellen waren, wurden möglichst niedrige Dosierung von Riboflavin verwendet. In möglichen zukünftigen klinischen Studien sollen so jegliche Nebenwirkungen vermieden werden. Allerdings war die zytotoxische Wirkung von Riboflavin dosisabhängig; daher galt es in den Vorversuchen eine möglichst geringe, aber in Kombination mit den anderen Faktoren dennoch die Toxizität steigernde, Dosis von Riboflavin zu ermitteln. Hinzukommt, dass die Wirkung von Riboflavin lichtabhängig ist. In niedriger Dosierung oder ohne die Kombination mit blauem Licht hat es dementsprechend keine oder nur eine geringe Wirkung [172]. Dies zeigte sich auch in den Ergebnissen unserer Vorversuche, dargestellt in den Abb. 4 a-c.

Gemcitabin ist als Chemotherapeutikum die dritte Komponente unserer Therapie. Es führt durch seinen Einbau in die DNA zu Zellschäden [58, 62, 158]. Hierbei konnten wir in unseren Vorversuchen einen klaren dosisabhängigen zytotoxischen Effekt auf die verwendeten Harnblasenkarzinomzelllinien RT-112, BFTC-905 und SW-1710 beobachten, was in den Abb. 6 a-c ersichtlich wird.

Die Therapie mit Gemcitabin wurde jedoch nicht nur gewählt, weil sie insgesamt ein gutes Ansprechen der Zelllinien zeigte, sondern auch weil sie Vorteile im Nebenwirkungsprofil und eine bessere Wirksamkeit im Vergleich zur Standard-Installationstherapie mit MMC aufweist [66, 67]. In einer randomisierten Phase-III-Studie wurde die therapeutische Wirksamkeit und Toxizität der intravesikalen Instillationstherapie mit Gemcitabin gegenüber MMC bei Patienten mit einem rezidivierten NMIBC untersucht. Bei 109 untersuchten Patienten bekamen 54 Gemcitabin und 55 MMC. Bei den mit Gemcitabin behandelten Patienten blieben 39 von 54 rezidivfrei, was 72 % entspricht. Bei den mit MMC behandelten Patienten blieben 33 von 55 rezidivfrei, was lediglich 61 % entspricht. Die Inzidenz einer Zystitis war ebenfalls bei den mit MMC behandelten Patienten statistisch höher als bei solchen, die mit Gemcitabin behandelt wurden. Insgesamt konnte diese Studie zeigen, dass Gemcitabin eine bessere Wirksamkeit und geringere Toxizität als MMC aufweist [67]. Auch gegenüber der intravesikalen Gabe von BCG kann Gemcitabin Vorteile zeigen. Bei Patienten, die resistent gegen die BCG Behandlung sind, wird Gemcitabin bereits als Off-Label-Blaseninstillationstherapie eingesetzt [21, 23, 64]. Dies ist darin begründet, dass nach Versagen der BCG Therapie Gemcitabin Vorteile in der Wirksamkeit gegenüber der erneuten BCG Gabe zeigt. In einer multizentrischen, prospektiven und randomisierten Phase-II-Studie mit 80 Teilnehmern wurde dies untersucht [64]. Bei dieser Studie von Di Lorenzo et al. wurde nach Versagen der BCG Therapie die Effektivität von intravesikalem Gemcitabin im Vergleich zur wiederholten Verabreichung von BCG bei high-risk NMIBC untersucht. Bei der Hälfte der Teilnehmer wurde intravesikales Gemcitabin in einer Dosis von 2000 mg/50 ml und bei der anderen Hälfte wurde intravesikales BCG in einer Dosis von 81mg/50 ml verabreicht. Nur 52,5% der Patienten mit intravesikaler Gemcitabintherapie entwickelten ein Krankheitsrezidiv gegenüber 87,5% der Patienten mit BCG Therapie. Außerdem erlitten 33% der Patienten nach Gemcitabingabe und 37,5% der Patienten nach BCG Gabe eine Krankheitsprogression und unterzogen sich einer radikalen Zystektomie. Insgesamt sprechen diese Daten für Gemcitabin als Zweittherapie nach Versagen der Therapie mit BCG [64]. Dies konnte auch in einer Studie von Hurle et al. bestätigt werden, bei welcher nach einem dreijährigen Follow-Up die Ergebnisse intravesikaler Gemcitabingabe bei Patienten mit NMIBC untersucht wurden. Die Patienten hatten auf die vorherige BCG Therapie nicht angesprochen und sich einer radikalen Zystektomie nicht unterziehen wollen [65]. Darüber hinaus zeigen die klinischen Daten, dass Gemcitabin bei mehrfacher Anwendung im Gegensatz zur einmaligen Applikation ein besseres Tumoransprechen hat [173].

Aus diesen Gründen könnte die intravesikale Gemcitabintherapie nach TURB eine gute Alternativtherapie des NMIBC darstellen. Der Nachteil ist, dass auch die Instillationstherapie mit Gemcitabin einige Nebenwirkungen wie Dysurie, suprapubische Schmerzen, Hämaturie, chemische Zystitis und Hautreaktionen aufweisen kann. Auch wenn diese als weniger gravierend als die Nebenwirkungen von MMC und BCG beschrieben werden, sollten sie minimiert werden [66-68]. Um dies zu ermöglichen haben wir Gemcitabin mit blauem Licht und Riboflavin kombiniert.

5.1 Wirkung der Behandlung mit Gemcitabin, blauem Licht und/oder Riboflavin

5.1.1 Untersuchung der Zellviabilität mittels CTB Assay

Die Ergebnisse der CTB Assay unterstreichen die Wirkung der Behandlung der Harnblasenkarzinomzellen mit Gemcitabin, blauem Licht und/oder Riboflavin auf eine verminderte Zellviabilität. Dies wird in den Abb. 7 a-c bis 10 a-c anhand der relativen Anzahl lebender Zellen veranschaulicht.

In den Abb. 7 a-c ist zum einen der Effekt von blauem Licht in Form einer Abnahme der Zellviabilität sichtbar. Eine signifikant verminderte Zellviabilität durch die Bestrahlung mit blauem Licht zeigte sich allerdings nur für die Zelllinien BFTC-905 und RT112 im Vergleich zur alleinigen Gabe von 10 ng/ml Gemcitabin. Zum anderen ist der gemeinsame Effekt von Riboflavin und blauem Licht mit oder ohne Gemcitabin in Form einer Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle bzw. der alleinigen Gabe von Gemcitabin den Abb. 7 a-c zu entnehmen. Eine signifikante Abnahme der relativen Anzahl lebender Zellen durch die Bestrahlung der Zellen mit blauem Licht bei zusätzlicher Riboflavingabe mit oder ohne Gemcitabin im Vergleich zur Kontrolle bzw. alleinigen Gemcitabinbehandlung zeigte sich für die Zelllinien BFTC-905 und RT-112 innerhalb der Kontrollgruppe sowie innerhalb der Gemcitabinkonzentrationen von 10 und 25 ng/ml und für die Zelllinie SW-1710 innerhalb der Gemcitabinkonzentration von 25 ng/ml. Die zusätzliche Gabe von Riboflavin zur Bestrahlung mit blauem Licht führte dementsprechend zu einer stärkeren Abnahme der relativen Anzahl lebender Zellen und unterstreicht somit die Verstärkung der Wirkung von blauem Licht auf einer Reduktion der Zellviabilität durch Riboflavin. Besonders deutlich wurde dies für alle Zelllinien bei der Gemcitabinkonzentration von 25 ng/ml. Diese Dosis an Gemcitabin hat bereits bei alleiniger Gabe eine starke zytotoxische Wirkung, was eine

signifikante Verminderung der Zellviabilität durch blaues Licht und Riboflavin im Vergleich zur alleinigen Gemcitabingabe erschwerte. Durch blaues Licht allein ist dies nicht möglich, aber in Kombination mit Riboflavin ließ sich eine signifikant verminderte relative Anzahl lebender Zellen nach Zugabe von Riboflavin zur Bestrahlung mit blauem Licht im Vergleich zur alleinigen Gemcitabingabe beobachten. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Ergebnisse früherer Studien die zeigen, dass Riboflavin mit blauem Licht interagiert und dessen zytotoxische Wirkung verstärkt [119-121, 131]. Allerdings war in unseren CTB Ergebnissen der Effekt von Riboflavin in Form einer stärkeren Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Bestrahlung mit blauem Licht mit oder ohne Gemcitabin, welcher sich für jede Zelllinie innerhalb der Kontrollgruppen und der einzelnen Gemcitabinkonzentrationen beobachten ließ, nicht immer signifikant. Dies könnte zum einen durch eine unterschiedlich starke toxische Wirkung von Riboflavin auf die verschiedenen Zelllinien bedingt sein und zum anderen mit der gewählten Lichtintensität und Riboflavinkonzentration zusammenhängen. Eventuell wäre bei einer geringeren Lichtintensität und einer höheren Riboflavinkonzentration der verstärkende Effekt von Riboflavin auf eine stärkere Abnahme der relativen Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur Bestrahlung mit blauem Licht ohne Zugabe von Riboflavin deutlicher geworden.

In den Abb. 9 a-c wird der Vergleich der Anzahl lebender Zellen bei alleiniger Gemcitabingabe gegenüber der Bestrahlung mit blauem Licht und zusätzlicher Riboflavingabe mit oder ohne Gemcitabin veranschaulicht. Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass die Kombination von 10 ng/ml oder 25 ng/ml Gemcitabin mit Riboflavin und der Bestrahlung mit 453 nm blauem Licht zu einer geringeren benötigten Dosis von Gemcitabin führte, um denselben Effekt auf eine Abnahme der Zellviabilität zu erzielen wie die alleinige Gabe der nächsthöheren Dosis von 25 ng/ml oder 50 ng/ml Gemcitabin. Dies verdeutlicht die Verstärkung der zytotoxischen Wirkung von Gemcitabin durch blaues Licht und Riboflavin. Für den klinischen Alltag könnte durch die beschriebene Kombination eine deutliche Reduktion der Toxizität von Gemcitabin und der damit verbundenen Nebenwirkungen für den Patienten erzielt werden. Des Weiteren zeigen diese Ergebnisse, dass die Gabe von blauem Licht mit Riboflavin ohne Gemcitabin einen ähnlich zytotoxischen Effekt auf die Zellen ausübte, wie die alleinige Gabe von 10 ng/ml Gemcitabin. Dies bedeutet, dass durch die Gabe zweier für den menschlichen Körper nicht toxischen Substanzen eine nahezu gleiche Zellzytotoxizität erreicht werden kann wie bei der Applikation von 10 ng/ml Gemcitabin. Für den klinischen Alltag könnte somit, bei gelungener Übertragbarkeit, eine Therapie ohne systemische Nebenwirkungen auf den menschlichen Körper ermöglicht werden. Hierzu wären genauere Studien nötig, welche speziell diesen Effekt untersuchen.

5.1.2 Untersuchung der Zellviabilität mittels MTT Assay

Die Ergebnisse des MTT Assay unterstreichen ebenfalls die Wirkung der Behandlung der Harnblasenkarzinomzellen mit Gemcitabin, blauem Licht, Riboflavin und aller Substanzen zusammen auf eine Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle. Allgemein zeigen die Ergebnisse des MTT Assay sehr ähnliche Effekte auf die Anzahl lebender Zellen wie die des CTB Assay, was die Hypothese der verstärkten zellzytotoxischen Wirkung von Gemcitabin auf Harnblasenkarzinomzellen durch blaues Licht und Riboflavin unterstreicht. Allerdings zeigen sich ein paar Unterschiede, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Insgesamt unterschieden sich die Ergebnisse der MTT Assay von denen der CTB Assay darin, dass die Wirkung der Behandlung mit Gemcitabin, blauem Licht, Riboflavin und allen Substanzen zusammen in Form einer verminderten Zellviabilität im Rahmen der Ergebnisse der MTT Assay stärker erschien als im Rahmen der der CTB Assay. Dies unterstrich der insgesamt stärkere Abfall lebensfähiger Zellen innerhalb der Ergebnisse der MTT Assay im Vergleich zu denen der CTB Assay. Dieser Unterschied wird vor allem beim Vergleich der Abb. 7 a-c mit den Abb. 11 a-c deutlich.

Weiterhin kann dieser Aspekt beim Vergleich zwischen den jeweiligen Kombinationen mit blauem Licht und Riboflavin verdeutlicht werden, da es hier für die Ergebnisse der CTB Assay im Gegensatz zu denen der MTT Assay zu einer signifikanten Abnahme der relativen Anzahl lebender Zellen beim Vergleich der jeweiligen Gemcitabinkonzentrationen mit der Kontrolle bzw. teilweise auch mit der jeweils höheren Gemcitabinkonzentration kam. Dies wird in den Abb. 10 a-c und 13 a-c dargestellt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der MTT Assay sprachen die der CTB Assay für die benötigte zusätzliche Gabe von 25 oder 50 ng/ml Gemcitabin zu blauem Licht und Riboflavin, um den zytotoxischen Effekt noch weiter signifikant steigern zu können. Beim Betrachten der Ergebnisse der MTT Assay hingegen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Gabe von blauem Licht und Riboflavin ohne zusätzliche Gabe von Gemcitabin ausreicht, um eine zytotoxische Wirkung zu erzielen, die durch Gemcitabin nicht weiter signifikant gesteigert werden kann. Für die klinische Praxis würde dies eine Möglichkeit darstellen, Patienten mit NMIBC zu therapieren ohne dabei Substanzen mit systemischer Toxizität verwenden zu müssen. Diese Beobachtung sollte allerdings in weiteren Studien näher untersucht werden, da sie in dieser Studie lediglich aus den Ergebnissen der MTT Assay hervor geht.

Ferner zeigen sich deutliche Unterschiede innerhalb der Ergebnisse der CTB und MTT Assay beim Vergleich zwischen der Gabe von blauem Licht und Riboflavin mit oder ohne Gemcitabin gegenüber der alleinigen Gabe der nächsthöheren Gemcitabinkonzentration. Dieser Vergleich ist für die Messungen mittels CTB Assay in den Abb. 9 a-c und für die Messungen mittels MTT Assay in den Abb. 12 a-c dargestellt. Im Rahmen der Ergebnisse der MTT Assay war mithilfe der Kombinationsbehandlung bei allen Zelllinien die Anzahl lebender Zellen deutlich geringer als bei der alleinigen Gemcitabingabe einer nächsthöheren Dosis. Dies war bei den Ergebnissen des CTB Assay nicht der Fall, da hier bei diesem Vergleich die relative Anzahl lebender Zellen lediglich gleich hoch war. Die Kombination aus der für den menschlichen Körper nicht toxischen Substanz Riboflavin und blauem Licht hatte dementsprechend eine höhere zytotoxische Wirkung mit einer stärkeren Abnahme der Zellviabilität zufolge der Ergebnisse der MTT Versuche.

Die beschriebenen Unterschiede zwischen den Ergebnissen der CTB und MTT Assay erscheinen paradox, da beide Assay die Zellviabilität messen und daher identische Ergebnisse zeigen sollten. Der MTT Assay lässt generell Rückschlüsse über die Glykolyserate [169] und der CTB Assay über die Aktivität der Atmungskette innerhalb der Zellen zu, allerdings kam es im Falle der gewählten zytotoxischen Substanzen und blauem Licht zum Absterben der Zellen und somit zum Erliegen von Atmungskette und Glykolyse. Dies konnten Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie nahelegen. Die Abb. 22 a und b zeigen plakativ die deutliche Reduktion der Anzahl von Harnblasenkarzinomzellen durch die Kombinationsbehandlung anhand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Die durch Hoechst blau gefärbten Zellen zeigen alle vorhandenen Zellen. Die mit Propidiumjodid (PJ) angefärbten, rot erscheinenden Zellen zeigen die nekrotischen Zellen und die mit Fluoresceindiacetat (FDA), grün gefärbten Zellen zeigen die vitalen Zellen. Die Aufnahmen veranschaulichen eine klare Reduktion der Anzahl vitaler Zellen durch die Kombinationsbehandlung (Abb. 22 b) im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung (Abb. 22a). Dies ließe schlussfolgern, dass es nicht zu einer reduzierten Aktivität von Atmungskette und Glykolyse bei noch lebenden Zellen kam, sondern zum Absterben der Zellen und damit zum Erliegen von Atmungskette und Glykolyse. Die Wirkung der Kombinationstherapie mit blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin wäre somit zytotoxisch. Diesen Beobachtungen zufolge müssten die Ergebnisse aus CTB und MTT Assay allerdings annähernd gleich sein.





Bestrahlung mit 453 nm blauem Licht, kein Riboflavin, kein Gemcitabin



Bestrahlung mit 453 nm blauem Licht, Behandlung mit 10 μ M Riboflavin und 25 ng/ml Gemcitabin

Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung

Gesamtzahl an Zellen (blau), tote Zellen (rot), lebende Zellen (grün) und überlappende Darstellung (bunt); alleinige Bestrahlung (a) und Behandlung mit Riboflavin und Gemcitabin sowie Bestrahlung mit blauem Licht (b); Vergrößerung: 10x

b

а

Die insgesamt stärkere zytotoxische Wirkung durch die Bestrahlung mit blauem Licht und durch die Behandlung mit Gemcitabin oder Riboflavin sowie der gemeinsamen Kombinationsbehandlung auf eine verminderte Zellviabilität innerhalb der Ergebnisse der MTT Versuche im Vergleich zu denen der CTB Versuche konnten durch eine rein zytotoxische Wirkung der Kombinationstherapie allerdings nicht vollständig nachvollzogen werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten daher auch auf eine Interaktion von blauem Licht mit Enzymen der Atmungskette zurückzuführen sein. Durch flavinhaltige Moleküle der Atmungskette kann es mit blauem Licht zu Wechselwirkungen kommen. Diese Interaktionen wurden bereits in Vorstudien untersucht [174-176]. Die untersuchten Interaktionsmechanismen aus Vorarbeiten [121, 131, 174, 177] sind in der Abb. 23 dargestellt. Die Abbildung zeigt außerdem, dass die Glykolyse in diesem Prozess nur indirekt involviert war. Durch die Wechselwirkungen von blauem Licht mit flavinhaltigen Molekülen der Atmungskette könnte es zu einer unterschiedlichen toxischen Wirkung der Kombinationstherapie und vor allem der Behandlung mit blauem Licht auf die Atmungskette im Gegensatz zur Glykolyse kommen. In der Zusammenschau aus meinen Ergebnissen wäre es denkbar, dass es durch die Behandlung der Zellen mit Riboflavin und Gemcitabin sowie der Bestrahlung mit blauem Licht auf der einen Seite zum Absterben der Zellen und auf der anderen Seite zur unterschiedlich stark verminderten Aktivität von Atmungskette und Glykolyse durch Zellschäden in den noch lebenden Zellen gekommen ist. Dies würde bedeuten, dass die Kombinationsbehandlung einen sowohl zytostatischen als auch zytotoxischen Effekt auf die Zellen hatte, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Allerdings konnten vorherige Studien zeigen, dass die Interaktion von blauem Licht mit flavinhaltigen Molekülen der Atmungskette lediglich direkt nach der Bestrahlung bestanden und bereits 12 h nach der Bestrahlung nicht mehr nachweisbar waren [174]. Demnach wären solche Interaktionseffekte in meinen Versuchen nicht gemessen worden, da die Auswertung mittels MTT und CTB Assay erst nach 48 h erfolgte. Es wurde jedoch im Rahmen der Vorstudien eine Lichtintensität von 80 J verwendet, wohingegen in meiner Studie mit 110 J gearbeitet wurde. Ein länger anhaltender Effekt durch die Interaktion zwischen blauem Licht und den flavinhaltigen Molekülen der Atmungskette wäre daher denkbar. Dies ließe die Annahme zu, dass es durch die Interaktion von blauem Licht mit flavinhaltigen Molekülen in der Atmungskette zu "verfälschten" Ergebnissen im Rahmen des CTB Assay kam, womit die aussagekräftigeren Ergebnisse dem MTT Assay zu entnehmen wären. Demnach hätte die Kombinationsbehandlung einen stärkeren toxischen Effekt auf die Zellviabilität als den Ergebnissen des CTB Assay zu entnehmen war.

Dies ist eine Hypothese, welche die unterschiedlichen Ergebnisse des CTB und MTT Assay erklären könnte, allerdings Gegenstand weiterer Forschung ist, da einige Zusammenhänge sich nicht plausibel erklären lassen.



Abb. 23: Vereinfachte Darstellung des Interaktionsmechanismus von blauem Licht im Rahmen der Zellatmung

Schematische Darstellung der Glykolyse, des Citratzyklus und der Atmungskette mit denkbaren Ansatzpunkten von blauem Licht; Interaktion von blauem Licht und flavinhaltigen Molekülen; eigene Darstellung

5.2 Zellschädigende Wirkung von Gemcitabin, blauem Licht und Riboflavin auf Harnblasenkarzinomzellen

Die Verstärkung der zytotoxischen Wirkung von Gemcitabin durch blaues Licht und Riboflavin geschieht wahrscheinlich über eine vermehrte ROS Produktion in den Zellen, was zu einer höheren Zellschädigung als die alleinige Gabe von Gemcitabin führte.

Eine Studie von Ming-Yeh Yang et al. publiziert im Jahr 2017 zeigte, dass die Bestrahlung von HeLa Zellen (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) mit blauem Licht (462 nm) bei zusätzlicher Gabe von 12,5 µM FMN/FAD u.a. die Produktion von ROS innerhalb der Zellen signifikant steigert im Vergleich zur Kontrolle. Ebenfalls zeigte diese Arbeit einen Anstieg der aktivierten Caspase 9 sowie der p53 Expression bei Bestrahlung mit blauem Licht in Kombination mit der Gabe von FMN. In diesem Zusammenhang wurde angenommen, dass durch die Bestrahlung mit blauem Licht und die Behandlung der Zellen mit FMN der intrinsische Weg der Apoptose und somit der Zelltod eingeleitet wird [121]. Weiterhin zeigte die Arbeitsgruppe von Godley et al. die vermehrte ROS Produktion in Form von Singulett-Sauerstoff, Superoxidanion und Hydroxylradikalen bei Bestrahlung von nicht pigmentierten retinalen Epithelzellen mit 390 – 550 nm blauem Licht. Zusätzlich konnten im Zusammenhang mit der Blaulichtbestrahlung erhöhte DNA- Schäden nachgewiesen werden, was neben der Induktion der Apoptose einen weiteren Mechanismus darstellt, über welchen blaues Licht die Zellen schädigt [178]. Des Weiteren konnten Studien von Opländer et al., Krassovka et al. sowie Mamalis et al. die vermehrte ROS Produktion bei Bestrahlung von Fibroblasten mit blauem Licht belegen [74, 114, 177]. Dabei publizierte Opländer et al. im Jahr 2011, dass vor allem blaues Licht mit einer Wellenlänge von 410 und 420 nm zu einer gesteigerten ROS Produktion und damit zu einer Abnahme der Zellviabilität führt. Allerdings führte die Bestrahlung mit 453 nm blauem Licht in der Studie von Opländer et al. zu keiner erhöhten Zelltodrate der Fibroblasten [114]. In meiner Arbeit führte die Bestrahlung mit 453 nm blauem Licht jedoch zu einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität. Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, dass in meiner Arbeit mit Tumorzellen gearbeitet wurde. Weiterhin zeigte die Arbeitsgruppe von Taflinski et al. im Jahr 2014 die vermehrte Bildung von ROS bei mit blauem Licht der Wellenlänge 420 nm bestrahlten Fibroblasten. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass bei Bestrahlung dermaler Fibroblasten mit blauem Licht die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten dosisabhängig gehemmt werden konnte. Diese Ergebnisse könnten damit für die Therapie von hypertrophen Wunden von Bedeutung sein [73].

Die zellschädigende Wirkung durch Gemcitabin über dessen Einbau in die DNA der Zellen auf der einen Seite und die Zellschädigung durch blaues Licht in Kombination mit Riboflavin über die Bildung von ROS auf der anderen Seite, führten in den Zellen zu einer Phosphorylierung von H2AX zu γH2AX und zu Doppelstrangbrüchen bzw. zu Schäden in der DNA. Aus diesem Grund fungierte eine hohe Expression von γH2AX als Marker für DNA-Schäden [156-158].

Vergleicht man die Zelllinien in den Abb. 15 a-c scheint die Kombinationsbehandlung bei der Zelllinie RT-112 im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien zur höheren Expression von vH2AX geführt zu haben. Dies unterstreicht die signifikant höhere Expression von vH2AX bei der Gabe aller Substanzen im Gegensatz zur alleinigen Riboflavingabe bei dieser Zelllinie, dargestellt in Abb. 16 a. Dies könnte für eine vermehrte DNA-Schädigung durch die Kombinationsbehandlung innerhalb der RT-112 Zelllinie im Vergleich zu den anderen Zelllinien sprechen.

Ein auffälliger Aspekt in Abb. 17 b ist, dass bei der Zelllinie BFTC-905 die Expression von γH2AX innerhalb der Kontrolle höher war als bei der Anwendung der Kombinationstherapie. Dies würde für eine geringere Zellschädigung sprechen, also eine Protektion der Zellen durch die Therapie mit Gemcitabin, blauem Licht und Riboflavin. Durch hohe Standardabweichungen innerhalb der Kontrolle war dieses Ergebnis allerdings schwer zu verifizieren. Allgemein könnten die Ergebnisse aller drei Zelllinien auf eine unterschiedlich starke DNA-Schädigung durch die Kombinationstherapie hindeuten. Dies weist auf unterschiedliche Wirkmechanismen der Kombinationstherapie bei den unterschiedlichen Zelllinien hin.

Zusammengenommen unterstreicht die beobachtete Erhöhung von γH2AX in unseren Western Blot Analysen jedoch die Wirksamkeit unserer Therapie für alle drei Zelllinien, da hierdurch der vermehrte Zellschaden durch die Kombination aller drei Substanzen unterstrichen wird.

5.3 Wirkung der Kombinationsbehandlung auf die Apoptose

Bax und Bcl2 dienen der Regulation der Apoptose, dabei inhibiert Bcl2 die Apoptose wohingegen Bax diese induziert [151, 152, 154]. Die Relation und die Interaktion dieser beiden Proteine haben eine entscheidende Bedeutung [144, 154]. In einer Studie, welche den Mechanismus der Wirkung von Bcl2 untersuchte, wurde die Interaktionen zwischen Bcl2 und Bax beobachtet. Eine Erkenntnis dieser Studie ist, dass Bax Heterodimere mit Bcl2 bildet. Beobachtet wurde, dass überexprimiertes Bax den apoptotischen Tod der untersuchten Zelllinie beschleunigte. Des Weiteren fand man im Rahmen dieser Studie heraus, dass überexprimiertes Bax der anti-apoptotischen Wirkung von Bcl2 entgegenwirkt. Diese Daten legen also ein Modell nahe, in dem das Verhältnis von Bcl2 zu Bax nach einem apoptotischen Stimulus den Tod oder das Überleben der Zelle bestimmt [154]. Die Ergebnisse der Abb. 18 a-c und 19 a-c unterstreichen die Verstärkung der Apoptose durch blaues Licht, Riboflavin und Gemcitabin, sowie deren Kombination. Bei den Zelllinien RT-112 und SW-1710 wurde eine erhöhte Apoptose im Vergleich zur Kontrolle allerdings erst bei Zugabe von Gemcitabin sichtbar. Die zusätzliche Gabe von blauem Licht und Riboflavin potenzierte dann diesen Effekt. Bei der Zelllinie BFTC-905 hingegen konnte bereits ohne die Gabe von Gemcitabin, also allein durch die Bestrahlung mit blauem Licht in Kombination mit der Gabe von Riboflavin, die Apoptose in den Zellen erhöht werden. Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse unsere Hypothese, dass blaues Licht und Riboflavin die Wirkung von Gemcitabin in Form einer gesteigerte Apoptoserate verstärken.

Der Mechanismus durch das blaue Licht die Apoptose induziert wurde von Huang et al. untersucht. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die vermehrte ROS Produktion durch Bestrahlung mit blauem Licht in retinalen Ganglionzellen eine erhöhte Expression von Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) zufolge hatte, wodurch es zur Aktivierung der JNK- und p38-MAPK-Signalwege und somit zur vermehrten Apoptose kam. Zusätzlich wurde in dieser Studie ein Anstieg des proapoptotischen Proteins Bax und ein Abfall des antiapoptostischen Proteins Bcl2 beobachtet, was ebenfalls eine vermehrte Apoptose zur Folge hatte [107].

Interessanterweise zeigten die Ergebnisse aller drei Zelllinien auch einen Anstieg der Bax Expression bei der Applikation von Riboflavin und Gemcitabin ohne blaues Licht im Vergleich zur alleinigen Gemcitabingabe (Abb. 18 a-c). Hier konnte also auch ein Effekt von Riboflavin ohne Bestrahlung mit blauem Licht auf eine Erhöhung der Apoptose beobachtet werden. Die Ergebnisse aus CTB und MTT Assay (Abb. 7 a-c und 11 a-c) waren jedoch konträr, denn hier zeigte blaues Licht allein bereits einen Effekt in Form einer Reduktion der Zellviabilität, wohingegen Riboflavin allein keinen Effekt auf die Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle hatte. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Kombination aus Gemcitabingabe nicht verstärkte, aber die Apoptoserate erhöhte. Die Western Blot Ergebnisse zeigten allerdings nur wenige Signifikanzen für den Anstieg der Apoptoserate durch die Kombinationsbehandlung, weshalb weitere Studien zur Überprüfung dieser Hypothese durchgeführt werden sollten.

In den Abb. 20 a-c wird deutlich, dass der Anstieg von Bax durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur Kontrolle für keine Zelllinie signifikant war. Der Abfall von Bcl2 durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur Kontrolle hingegen war bei den Zelllinien BFTC-905 und SW-1710 signifikant. Dies lässt Rückschlüsse darauf zu, dass der Effekt einer verstärkten Apoptose durch die Kombinationstherapie aus blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin vermehrt durch die Inhibition von Bcl2, statt durch die Induktion von Bax verursacht wird.

Durch die Darstellung des Bax/Bcl2-Index für die Zelllinie SW-1710 in Abb. 21 wird deutlich, dass die Expressionen von Bax und Bcl2 stark miteinander verbunden sind. Dadurch kann beispielsweise ein nur geringer Bax Anstieg aber ein starker Abfall von Bcl2 einen Anstieg der Apoptose verursachen. Beim Vergleich der Kontrolle zur gemeinsamen Gabe von Gemcitabin, blauem Licht und Riboflavin wird ein klarer und signifikanter Unterschied sichtbar. Diese Beobachtung lässt schlussfolgern, dass die Höhe der Bax Expression in Relation zu der von Bcl2 größer ist bzw. die Expression von Bcl2 kleiner ist. Die Wirkung der Kombinationstherapie auf einen Anstieg der Apoptose wird somit unterstrichen.

Zusammengenommen verstärkt die Kombinationstherapie die Apoptose auf unterschiedliche Art innerhalb der Zelllinien. Die verstärkte Apoptoserate führt zu einer Verringerung der Zellzahl. Die Effektivität der Therapie wird somit durch die Western Blot Analysen unterstrichen.

5.4 Unterschiedliches Ansprechen der Zelllinien auf die Kombinationsbehandlung und verschiedene Wirkmechanismen dieser

Bereits in den Vorversuchen (s.a. Kapitel 5.1) wurde eine unterschiedlich starke Abnahme der Zellviabilität zwischen den einzelnen Zelllinien durch die Behandlung mit Gemcitabin bzw. mit blauem Licht und Riboflavin deutlich.

Für die Behandlung der Zellen mit blauem Licht und Riboflavin sind in den Abb. 5 a-c die Differenzen zwischen der mit blauem Licht (453 nm) bestrahlten und unbestrahlten Zellen in Kombination mit 5, 10, 20 und 25 μ M Riboflavin dargestellt. Bei den Zelllinien BFTC-905 und SW-1710 zeigten sich für die Riboflavinkonzentration von 20 und 25 μ M signifikant höhere Differenzen zwischen der mit blauem Licht (453 nm) bestrahlten und unbestrahlten Zellen bezüglich der relativen Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Diese könnten darauf hindeuten, dass bei diesen beiden Zelllinien eine Riboflavindosierung von 20 μ M zu einer stärkeren Abnahme der relativen Zahl lebender Zellen führt als bei der Zell-linie RT-112 und diese somit weniger sensibel auf die Behandlung mit blauem Licht und Riboflavin eine größere Differenz, zwischen der mit blauem Licht bestrahlten und unbestrahlten zellen zu beobachten als bei den Zelllinien SW-1710 und RT-112. Die Zelllinie BFTC-905 reagierte also insgesamt am sensibelsten auf die Behandlung mit blauem

Licht und Riboflavin, da die Differenz der relativen Anzahl lebender Zellen zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen am stärksten zunahm. Die verwendeten Riboflavindosierungen hatten daher unterschiedlich stark vermindernde Effekte auf die Zellviabilität zwischen den Ziellinien. Dementsprechend könnten im Rahmen weiterer Studien eventuell verschiedene Riboflavindosierung für verschiedene Zellarten verwendet werden.

Die Behandlung mit blauem Licht und Riboflavin schien auf die Zelllinie BFTC-905 toxischer zu wirken als auf die anderen beiden Zelllinien. Dies zeigte sich ebenfalls im Rahmen der Western Blot Analysen zur Expression von Bax und Bcl2. Dies ist in den Abb. 18 a-c und 19 a-c veranschaulicht. Hier zeigten die Ergebnisse für die Zelllinie BFTC-905 bei Bestrahlung mit blauem Licht und Gabe von Riboflavin ohne Gemcitabin einen stärkeren Anstieg von Bax sowie einen stärkeren Abfall von Bcl2 und somit eine stärkere Apoptoserate im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien. Dies könnte darauf hinweisen, dass innerhalb dieser Zelllinie blaues Licht und Riboflavin auch ohne Gemcitabin die Apoptose erhöhte. Für die Zelllinien RT-112 und SW-1710 war eine verstärkte Apoptoserate erst bei zusätzlicher Gemcitabingabe sichtbar. Die BFTC-905 Zelllinie schien also besonders sensibel auf die Behandlung von blauem Licht und Riboflavin zu reagieren, was sich in einer stärker abnehmenden Zellviabilität und einer höheren Apoptoserate im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien darstellt. Es wäre auch möglich, dass die anderen beiden Zelllinien ebenso sensibel auf die Behandlung mit blauem Licht und Riboflavin reagieren, dabei allerdings andere Zelltodmechanismen, wie beispielsweise die Nekrose, ausgelöst wurden.

Auf die alleinige Behandlung mit Gemcitabin zeigten alle Zelllinien eine Reduktion der relativen Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle, wie in den Abb. 6 a-c veranschaulicht wird. Die Abnahme der Zellzahl im Rahmen der in Abb. 6 a-c dargestellten CTB Assay Vorversuche zur Dosisfindung von Gemcitabin ließen auf eine dosisabhängige Abnahme der Zellviabilität der einzelnen Zelllinien mit steigender Gemcitabindosierung schließen. Allerdings zeigte die Zelllinie BFTC-905 im Dosisbereich ab 25 ng/ml einen stärkeren Abfall der Zellviabilität im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien. Dementsprechend lässt sich die Hypothese aufstellen, dass nicht nur blaues Licht und Riboflavin, sondern auch Gemcitabin die jeweils stärkste zytotoxische Wirkung auf die Zelllinie BFTC-905 im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien hatte.

Ein Wirkmechanismus der Kombinationsbehandlung ist also die Abnahme der Zellviabilität, was eine Reduktion der Anzahl lebensfähiger Zellen zufolge hat.

Neben der in dieser Studie vorgestellten photodynamischen Therapie mit blauem Licht (453nm), Riboflavin und Gemcitabin können ebenso andere Wellenlängen, Lichtintensitäten sowie unterschiedliche Photosensibilisatoren verwendet werden. Dementsprechend

können unterschiedliche Formen der photodynamischen Therapie verschiedene Effekte auf die Tumorzellen ausüben. In einer Studie von Moghissi et al. konnte gezeigt werden, dass die bronchoskopische photodynamische Therapie bei inoperablem zentral gelegenem frühem Lungenkrebs das rezidivfreie Intervall verlängern kann. Im Rahmen dieser Studie wurde als Photosensibilisator intravenös verabreichtes Porfimer-Natrium sowie Licht mit einer Wellenlänge von 630 nm verwendet. Die bronchoskopische Beleuchtung erfolgte dabei 24-72 h nach der Behandlung mit Porfimer-Natrium [179].

Außerhalb der photodynamischen Therapie konnten auch additive Effekte von Kombinationsbehandlungen mit Chemotherapeutika beobachtet werden. In einer Arbeit von Jeon et al. konnte beobachtet werden, dass der Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A die toxische Wirkung von Gemcitabin auf Harnblasenkarzinomzellen erhöht [166]. Weiterhin konnte in einer klinischen Phase-II-Studie von Kerr et al. aus dem Jahr 2015 im Rahmen einer Radiosensibilisierung durch Gemcitabin mittels ionisierender Strahlung das verzögerte Tumorwachstum auch in Gemcitabin resistenten Harnblasenkarzinomzellen beobachtet werden [69].

Innerhalb der Hauptversuche (s.a. Kapitel 5.2) zeigte sich ebenso ein unterschiedliches Ansprechen der Zelllinien auf die Kombinationsbehandlung.

Anhand der Expressionshöhe von Bax und Bcl2 konnten, wie in den Abb. 18 a-c und 19 ac dargestellt, Rückschlüsse auf die Apoptose innerhalb der Zellen gezogen werden, welche mit Zunahme der für die Zellen toxischen Substanzen und der Bestrahlung mit blauem Licht zunahm. Bei der BFTC-905 Zelllinie zeigte sich ein signifikanter Abfall der Bcl2 Expression durch die Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Kontrolle. Der Anstieg von Bax ist hingegen weniger deutlich im Vergleich zum Abfall von Bcl2. Dies könnte dafürsprechen, dass innerhalb der BFTC-905 Zelllinie die Apoptose durch die Kombinationsbehandlung vermehrt über eine Bcl2 Inhibition statt über eine Bax Induktion ausgelöst wurde. Für die Zelllinie RT-112 war der Bcl2 Abfall schwächer im Vergleich zur BFTC-905 Zelllinie, dafür aber der Bax Anstieg stärker. Dies könnte dafürsprechen, dass innerhalb der RT-112 Zelllinie die Apoptose durch die Kombinationstherapie vermehrt über eine Bax Induktion statt über eine Bcl2 Inhibition ausgelöst wurde. Bei der SW-1710 Zelllinie hingegen zeigten sich sowohl der Bax Anstieg als auch der Bcl2 Abfall deutlich. Hier könnte die Kombinationstherapie in ähnlichem Maße Einfluss auf die Bax Induktion und Bcl2 Inhibition nehmen.

Bei Betrachtung der Abb. 18 a-c und 19 a-c ließ sich außerdem für alle drei Zelllinien beobachten, dass die Apoptoserate durch die Bestrahlung mit blauem Licht in Kombination mit der Gabe von Riboflavin und Gemcitabin im Gegensatz zur Kontrolle deutlich anstieg. Sichtbar wurde dies durch eine deutlich erhöhte Bax Expression und die Abnahme der Bcl2 Expression bei Kombination von Gemcitabin mit blauem Licht und Riboflavin. Ohne Gemcitabin zeigten blaues Licht und Riboflavin, wie bereits beschrieben, lediglich für die Zelllinie BFTC-905 eine verstärkte apoptotische Wirkung auf die Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Erst die Kombination aus Bestrahlung der Zellen mit blauem Licht und Behandlung mit Riboflavin und Gemcitabin führte bei allen drei Zelllinien zu einer deutlichen Erhöhung der Apoptose. Dementsprechend ist die Apoptose ein weiterer wichtiger Wirkmechanismus der Kombinationsbehandlung.

Weiterhin ist die Schädigung der DNA ein Ansatzpunkt der Kombinationsbehandlung. Dieser Aspekt wurde, wie in den Abb. 15 a-c bis 17 a-c dargestellt, durch die erhöhten Expressionen von γ H2AX durch die Bestrahlung mit blauem Licht bei zusätzlicher Gabe von Riboflavin und Gemcitabin im Vergleich zu den restlichen Kombinationen deutlich. Die höchste Expression von γ H2AX zeigte sich bei der Zelllinie RT-112 im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien, was auf die stärkste DNA-Schädigung durch die Kombinationstherapie bei der Zelllinie RT-112 hindeutete (Abb. 15 a -c bis 17 a - c).

Insgesamt sind diese Beobachtungen ein wichtiger Hinweis darauf, dass die Kombinationstherapie verschiedene Ansatzpunkte hat und je nach Harnblasenkarzinomzelllinie unterschiedlich stark auf eine Reduktion der Zellviabilität, auf eine Zunahme der Apoptoserate und auf die Schädigung der DNA wirken könnte.

5.5 Riboflavin und Gemcitabin als Photosensibilisatoren

Photosensibilisatoren werden im Rahmen der photodynamischen Therapie (PDT) eingesetzt und dienen dazu die Wirkung der Therapie zu verstärken [120, 131, 180, 181].

Die Wirkung von Riboflavin als Photosensibilisator wurde vor allem in den Ergebnissen der CTB und MTT Versuche deutlich (Abb. 7 a-c und Abb. 11 a-c), denn blaues Licht zeigte in Kombination mit Riboflavin eine stärkere Abnahme der Zellviabilität im Unterschied zur alleinigen Anwendung von blauem Licht (s.a. Abb. 7 a-c und Abb. 11 a-c; blaue vs. blaugestreifte Balken im Gegensatz zu blau vs. orange-gestreifte Balken).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass auch Gemcitabin als Photosensibilisator fungiert [69]. Dies unterstreichen auch die Western Blot Analysen zur Bax Expression im Rahmen dieser Arbeit. In den Abb. 18 a-c zeigte die Behandlung mit blauem Licht und Riboflavin für die Zelllinien RT-112 und SW-1710 erst in Kombination mit Gemcitabin einen verstärkenden Effekt auf die Apoptose. Dies unterstreicht die Annahme, dass Gemcitabin als Photosensibilisator wirkt und so den Effekt von blauem Licht in Kombination mit Riboflavin potenziert. Gemcitabin schien ebenfalls in Bezug auf die Zellviabilität als Photosensibilisator zu wirken. Ein Beispiel hierfür ist der Abb. 7 a-c zu entnehmen. Wie bereits im Vorfeld erläutert, nahm die Anzahl lebender Zellen bei Bestrahlung mit blauem Licht innerhalb aller Zelllinien stärker ab als ohne Bestrahlung mit blauem Licht. Innerhalb der Kontrollgruppe war der Effekt von blauem Licht auf eine verminderte Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle lediglich sichtbar, nicht aber signifikant. Für die Gemcitabinkonzentration von 10 ng/ml zeigte sich in Kombination mit blauem Licht allerdings eine signifikante Reduktion der relativen Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur alleinigen Anwendung von Gemcitabin. Gemcitabin bewirkte also eine Verstärkung des Blaulichteffektes auf die Zellviabilität, sodass dieser signifikant wurde. Dies unterstreicht die Hypothese, dass Gemcitabin als Photosensibilisator fungiert und somit den Effekt von blauem Licht verstärkt.

5.6 Resistenzen innerhalb der Zelllinien

Die Zelllinien BFTC-905 [164] und RT-112 [69] wurden bereits als Gemcitabin resistent beschrieben, wohingegen die Zelllinie SW-1710 [166] eine gute Empfindlichkeit gegenüber Gemcitabin zeigt und noch nicht als resistent gegenüber Gemcitabin beschrieben wurde.

In einer Studie von Huang et al. bei der das Ansprechen verschiedener Harnblasenkarzinomzelllinien auf den Survivin-Inhibitor Sepantroniumbromid (YM155) in Verbindung mit Gemcitabin oder Cisplatin untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass bei der Zelllinie BFTC-905 keine erhöhte Toxizität durch die Zugabe von Gemcitabin erzielt werden konnte. Dabei wurde nachgewiesen, dass bei einer Gabe von bis zu 500 nM Gemcitabin nach 48stündiger Behandlung kein signifikanter zytotoxischer Effekt auf die BFTC-905-Zelllinie ausgeübt werden konnte [164].

Eine weitere Studie von Kerr et al. beschrieb die Zelllinie RT-112 als Gemcitabin resistent. In dieser klinischen Phase-II-Studie wurde der Mechanismus der Radiosensibilisierung bei einer niedrigen Dosierung von 100 mg/kg Gemcitabin an vier verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien untersucht. RT-112 zeigte dabei eine Gemcitabinresistenz, welche mit einer verminderten dCK-Expression assoziiert war. Beobachtet wurde allerdings, dass die Gemcitabin resistente Zelllinie RT-112 auf die Kombination von niedrig dosiertem Gemcitabin und Radiosensibilisierung ansprach [69].

Die Zelllinie SW-1710 wurde bereits in einer Studie verwendet, bei der die synergistische Interaktion zwischen Trichostatin A und Gemcitabin untersucht wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass Trichostatin A zur Verstärkung der Anti-Tumor-Wirkung von Gemcitabin bei fortgeschrittenem Blasenkrebs führt. Die Zelllinie zeigte im Vergleich zu den anderen verwendeten Harnblasenkarzinomzellen eine gute Sensibilität gegenüber Gemcitabin [166].

Im Gegensatz zu diesen Studien legen unsere Ergebnisse jedoch nahe, dass für keine dieser Zelllinien deutliche Hinweise für eine Gemcitabinresistenz innerhalb der Gemcitabindosierungen von 10, 25 und 50 ng/ml vorlagen. Interessanterweise war unseren Ergebnissen aus den CTB Vor- und Hauptversuchen (Abb. 6 c, 7 c und 8 c) zufolge am ehesten bei der Zelllinie SW-1710 von einer schwächeren Sensibilität gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Gemcitabin auszugehen. Auffällig war allerdings, dass es bei der Zelllinie SW-1710 im Rahmen der Ergebnisse zur Bax und Bcl2 Expression zu einer deutlichen Abnahme der Bcl2 Expression sowie zu einer Zunahme der Bax Expression bei alleiniger Gabe von Gemcitabin im Vergleich zur Kontrolle kam. Dies wird in den Abb. 18 c und 19 c veranschaulicht und unterstreicht die Sensibilität der Zelllinien gegenüber Gemcitabin. Insgesamt konnten wir also in allen unseren Experimenten und für alle Zelllinien zeigen, dass blaues Licht in Kombination mit Riboflavin die zellzytotoxische Wirkung von Gemcitabin verstärkt ohne, dass es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien gab.

5.7 Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse

Die Ergebnisse der Western Blot Versuche weisen allgemein hohe Standardabweichungen auf (Abb. 14 a-c bis 21), was zu teilweise nicht eindeutigen Ergebnissen führte. In Abb. 17 b ist bei der Zelllinie BFTC-905 die Expression von yH2AX innerhalb der Kontrolle höher als bei der Anwendung der Kombinationsbehandlung. Demnach hätten blaues Licht und Riboflavin einen protektiven, also einen der Zellschädigung entgegenwirkenden Effekt. Dieses Ergebnis ist allerdings konträr zu den bisherigen Erkenntnissen dieser Arbeit, die dafürsprechen, dass Riboflavin und blaues Licht zytotoxisch wirken. Ein ähnlicher Effekt wird für die Zelllinie RT-112 in der Abb. 18 a verdeutlicht. Hier zeigt sich eine sinkende Bax Expression bei Bestrahlung in Kombination mit Riboflavin und auch bei alleiniger Riboflavingabe im Vergleich zur Kontrolle. Dem Großteil unserer Erkenntnisse zufolge sollte die Bax Expression im Vergleich zur Kontrolle allerdings gleich hoch bzw. höher bei Bestrahlung und Riboflavinbehandlung sein. Auch für die Bcl2 Expression zeigt sich in Abb. 19 b ein widersprüchliches Ergebnis für die Zelllinie BFTC-905. Bei der alleinigen Riboflavingabe zeigt sich eine stärkere Abnahme der Bcl2 Expression als bei der kombinierten Gabe aus blauem Licht und Riboflavin im Gegensatz zur Kontrolle. In den Ergebnissen der anderen Zelllinien und auch in den Ergebnissen des MTT und CTB Assay wurde allerdings der verstärkende Effekt von Riboflavin auf die Apoptose bzw. auf eine Abnahme der Zellviabilität durch blaues Licht verstärkt. Demnach müsste Bcl2 bei Kombination mit blauem Licht stärker abfallen als bei der alleinigen Riboflavingabe.

Diese gegenläufigen Ergebnisse könnten durch die großen Standardabweichungen und damit statistische Ungenauigkeit erklärt werden. Die hohen Standardabweichungen

könnten durch die teilweise voneinander abweichenden Resultate der einzelnen Versuchsreihen bedingt sein, da die Messungen der Proteinexpressionen zum Teil sehr unterschiedlich waren. Eine mögliche Ursache für die variierenden Ergebnisse könnten entstandene Resistenzmechanismen einzelner Tumorzellen sein.

Eine weitere mögliche Ursache für die teils paradoxen und uneinheitlichen Ergebnisse ist die Anwendung der jeweils gleichen Konzentrationen von Riboflavin und Gemcitabin und die gleiche Bestrahlungsintensität für jede der drei Zelllinien. Es wäre jedoch möglich gewesen diese mithilfe der CTB und MTT Assay Ergebnisse für jede Zelllinie speziell anzupassen. Dies hätte allerdings den Rahmen dieser Arbeit überschritten und sollte daher in zukünftigen Studien nachgeholt werden. Des Weiteren hätte eine höhere Riboflavinkonzentration und eine etwas geringere Bestrahlungsintensität den Effekt von Riboflavin in Form einer verminderten Zellviabilität, auf eine verstärkte Apoptose sowie einen erhöhten DNA-Schaden besser hervorgehoben.

Ebenfalls wäre es denkbar, dass die Zellen auch innerhalb einer Zelllinie durch verschiedene Mechanismen sterben oder die Zelltodmechanismen zu unterschiedlichen Anteilen ausgeprägt sind. Durch die Analyse von Bax, Bcl2 und γH2AX konnten lediglich Rückschlüsse über das apoptotische Zellsterben, nicht aber über Zelltodmechanismen wie Nekrose oder Autophagie, gewonnen werden. Wenn die vorgestellte Kombinationstherapie unterschiedliche Zelltodmechanismen innerhalb jeder Zelle auslöst, wäre dies eine mögliche Erklärung für statistische Abweichungen in der Auswertung. Diese Hypothese unterstützt, dass durch die Kontrolle der Western Blot Analysen mittels CTB Assay valide Ergebnisse gewonnen werden konnten.

Nähere Untersuchungen weiterer Wirkmechanismen der Kombinationsbehandlung sollten daher ein weiterer Aspekt dieser Arbeit werden. Die Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Analyse und die Fluoreszenzmikroskopie sollten hierbei Rückschlüsse über die Differenzierung zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod geben. Die zu Beginn durchgeführten FACS Analysen konnten jedoch keine repräsentativen Ergebnisse hervorbringen, da mit bereits abgelaufener Chemotherapie gearbeitet wurde. Mit der im Anschluss verwendeten neuen Chemotherapie ließen sich die vorliegenden repräsentativen Ergebnisse zeigen, sodass erneut FACS Untersuchungen durchgeführt werden sollten. Allerdings waren diese Versuche durch eine nicht behebbare Störung am FACS Gerät limitiert, sodass auch der zweite Versuch dieser Experimentreihe eingestellt wurde.

Im Rahmen dieser Überlegungen wäre es für zukünftige Forschung gegebenenfalls von Interesse, den Caspase induzierten Zelltod über den Caspase 3 Assay näher zu analysieren, sowie erneute FACS Analysen und den ROS Assay durchzuführen, um die Wirkmechanismen dieser Behandlung besser nachvollziehen zu können. Die Fluoreszenzmikroskopie konnte die Annahme, dass ein Teil des Zelltodes der Harnblasenkarzinomzellen durch Nekrose induziert wird, unterstreichen, da mit zunehmender toxischer Substanz die Anzahl mit PJ gefärbter Zellen zunahm. Dieser Aspekt wird in den Abb. 22 a und b deutlich. Allerdings führte die Behandlung der Zellen mit Gemcitabin aufgrund der starken Zytotoxizität zum Lösen der Zellen von den Well-Platten, was die quantitative und qualitative Auswertung dieses Verfahren limitierte. Das nähere Analysieren der Wirkmechanismen der Kombinationsbehandlung von Gemcitabin, Riboflavin und blauem Licht bleibt ein Aspekt weiterer Forschung.

5.8 Umsetzung in die klinische Praxis

Eine Methode zur zeitgleichen Anwendung von blauem Licht, Riboflavin und Gemcitabin in der Blase könnte die Verwendung einer sogenannten homogenen Bestrahlungsfasersonde (HIFiP) sein, welche in einer 2012 publizierten Studie von Miyazaki et al. getestet wurde [182]. Diese Sonde wurde für eine homogene Ausleuchtung der Harnblasenhöhle entwickelt. Speziell für die PDT von Blasenkrebs, der in multifokalen Bereichen auftritt und sich diffus in der Blasenschleimhaut ausbreitet, ist diese Sonde von Bedeutung. Um dies zu ermöglichen wurde die Fasersonde so geformt, dass die Fluenzverteilung des Lichtes sich der dreidimensionalen Form der Harnblasenhöhle annähert. Diese homogenen Bestrahlungsfasersonde wurde anhand eines Blasenkrebsmodells der Ratte mit einer Kontrollfasersonde (KF) verglichen. Der prozentuale Anteil der bestrahlten Fläche an der Gesamtfläche der Blasenschleimhaut betrug im Fall der HIFiP 69 % und im Fall der Kontrollfasersonde 36 %. Weiterhin war das Volumen der Tumore nach HIFiP-PDT halb so groß wie nach KF-PDT [182]. Eine Fasersonde mit ähnlicher Effektivität und der Möglichkeit blaues Licht mit einer Wellenlänge von 453 nm zu strahlen, bei zusätzlicher Gemcitabin und Riboflavin Injektion in die Harnblase, könnte eine lokale und präzise Kombinationstherapie des NMIBC ermöglichen. In-vivo-Studien sollten durchgeführt werden, um diese Behandlungsmethode der klinischen Praxis näher zu bringen.

5.9 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der MTT und CTB Assay innerhalb aller Zelllinien einen signifikanten Anstieg der Gemcitabin induzierten Toxizität auf die Tumorzellen durch eine zusätzliche Behandlung mit blauem Licht und Riboflavin. Der dieser erhöhten Toxizität zugrundeliegende molekulare Mechanismus beinhaltet einen signifikanten Anstieg in der Expression proapototischer Proteine sowie DNA-Schäden, beides klare Anzeichen auf eine gestiegene Apoptose. Weiterhin zeigen die Daten, dass die Gemcitabindosis reduziert werden kann, wenn diese mit blauem Licht und Riboflavin kombiniert wird. Bei erfolgreicher Übertragung auf die klinische Praxis könnte dies eine Verbesserung für die Therapie des NMIBC darstellen, indem die Gemcitabindosis und damit die Nebenwirkungen für die Patienten reduziert werden könnte.

6 Literaturverzeichnis

- 1. Aoki, Y., et al., *Urinary incontinence in women*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**.
- 2. Schünke, M., E. Schulte, and U. Schumacher, *PROMETHEUS Innere Organe*. Thieme.
- 3. Aumüller, G., et al., *Duale Reihe Anatomie*. 2020: Thieme.
- 4. de Groat, W.C. and N. Yoshimura, *Anatomy and physiology of the lower urinary tract.* Handb Clin Neurol, 2015. **130**: p. 61-108.
- 5. Birder, L., et al., *Neural Control*, in *Incontinence*. 2013, Health Publications. p. 179-260.
- 6. Abraham, J., J.L. Gulley, and C.J. Allegra, *The Bethesda Handbook of Clinical Oncology*. 4 ed. 2014: Lippincott Williams & Wilkins.
- 7. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.* CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
- 8. Richters, A., K.K.H. Aben, and L. Kiemeney, *The global burden of urinary bladder cancer: an update.* World J Urol, 2020. **38**(8): p. 1895-1904.
- 9. Freedman, N.D., et al., *Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women.* JAMA, 2011. **306**(7): p. 737-745.
- Islami, F., et al., Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. CA Cancer J Clin, 2018. 68(1): p. 31-54.
- 11. Sun, J.W., et al., *Obesity and risk of bladder cancer: a dose-response meta-analysis of 15 cohort studies.* PLoS One, 2015. **10**(3).
- 12. Vermeulen, S.H., et al., *Recurrent urinary tract infection and risk of bladder cancer in the Nijmegen bladder cancer study.* Br J Cancer, 2015. **112**(3): p. 594-600.
- 13. Cumberbatch, M.G.K., et al., *Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018.* Eur Urol, 2018. **74**(6): p. 784-795.
- 14. Czubacka, E. and S. Czerczak, *2-naphthylamine toxicity*. Med Pr, 2020. **71**(2): p. 205-220.
- 15. Schulte, P.A., et al., *Risk Factors for Bladder Cancer in a Cohort Exposed to Aromatic Amines* Cancer, 1986. **58**: p. 2156-2162.
- Tai-An, c., et al., Mutagenicity and aromatic amine content of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan. Food and Chemical Toxicology, 1999. 37(2-3): p. 125-134.
- Bruyninckx, R., et al., *The diagnostic value of macroscopic haematuria for the diagnosis of urological cancer in general practice.* British Journal of General Practice, 2003. **486**: p. 31-35.
- 18. Richards, K.A., et al., Urinary tract infection-like symptom is associated with worse bladder cancer outcomes in the Medicare population: Implications for sex disparities. Int J Urol, 2016. **23**(1): p. 42-47.
- 19. Park, J.C., et al., *Multimodal management of muscle-invasive bladder cancer*. Curr Probl Cancer, 2014. **38**(3): p. 80-108.
- 20. Knowles, M.A. and C.D. Hurst, *Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity.* Nat Rev Cancer, 2015. **15**(1): p. 25-41.
- 21. Babjuk, M., et al., *EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016.* Eur Urol, 2017. **71**(3): p. 447-461.

- 22. Kamat, A.M., M. Bagcioglu, and E. Huri, *What is new in non-muscle-invasive bladder cancer in 2016*? Turk J Urol, 2017. **43**(1): p. 9-13.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 2.0, AMFW-Registrierungsnummer 032/0380L.
 2020; Available from: https://www.leitlinienprogrammonkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom/.
- 24. Fransen van de Putte, E.E., et al., *Prognostic significance of substage and WHO classification systems in T1 urothelial carcinoma of the bladder.* Curr Opin Urol, 2015. **25**(5): p. 427-435.
- 25. van Rhijn, B.W., et al., *A new and highly prognostic system to discern T1 bladder cancer substage.* Eur Urol, 2012. **61**(2): p. 378-384.
- 26. van der Aa, M.N., et al., *A new system for substaging pT1 papillary bladder cancer: a prognostic evaluation.* Hum Pathol, 2005. **36**(9): p. 981-986.
- 27. Nishiyama, N., et al., *Clinicopathological analysis of patients with non-muscle-invasive bladder cancer: prognostic value and clinical reliability of the 2004 WHO classification system.* Jpn J Clin Oncol, 2013. **43**(11): p. 1124-1131.
- 28. Devon, A., A. Rlick, and A. Meenu, *Cancer Facts and Figures.* The American Cancer Society Journal, 2021.
- 29. Wang, G. and J.K. McKenney, Urinary Bladder Pathology: World Health Organization *Classification and American Joint Committee on Cancer Staging Update.* Arch Pathol Lab Med, 2019. **143**(5): p. 571-577.
- 30. Patel, A.R., et al., Validation of new AJCC exclusion criteria for subepithelial prostatic stromal invasion from pT4a bladder urothelial carcinoma. J Urol, 2013. **189**(1): p. 53-58.
- 31. Sylvester, R.J., et al., *Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials.* Eur Urol, 2006. **49**(3): p. 466-475.
- 32. Bach, T., et al., Optimised photodynamic diagnosis for transurethral resection of the bladder (TURB) in German clinical practice: results of the noninterventional study OPTIC III. World J Urol, 2017. **35**(5): p. 737-744.
- 33. Kramer, M.W., et al., *Transurethral en bloc resection of non-muscle invasive bladder cancer. What is the state of the art?* Urologe A, 2012. **51**(6): p. 798-804.
- 34. Mariappan, P., et al., *Detrusor muscle in the first, apparently complete transurethral resection of bladder tumour specimen is a surrogate marker of resection quality, predicts risk of early recurrence, and is dependent on operator experience.* Eur Urol, 2010. **57**(5): p. 843-849.
- 35. Balan, G.X., et al., *Bipolar En Bloc Resection for NMIBC Comparative Medium Term Evaluation.* Romanian Journal of Urology, 2019. **18**(1): p. 31-34.
- 36. Ukai, R., et al., *Transurethral resection in one piece (TURBO) is an accurate tool for pathological staging of bladder tumor.* Int J Urol, 2010. **17**(8): p. 708-714.
- 37. Saito, S., *Transurethral En Bloc Resection of Bladder Tumors.* Journal of Urology, 2001. **166**(6): p. 2148-2150.
- 38. Fritsche, H.M., et al., *Water-jet-aided transurethral dissection of urothelial carcinoma: a prospective clinical study.* J Endourol, 2011. **25**(10): p. 1599-1603.
- Nagele, U., et al., Waterjet hydrodissection: first experiences and short-term outcomes of a novel approach to bladder tumor resection. World J Urol, 2011. 29(4): p. 423-427.

- 40. Zhu, Y., et al., Safety and efficacy of holmium laser resection for primary nonmuscleinvasive bladder cancer versus transurethral electroresection: single-center experience. Urology, 2008. **72**(3): p. 608-612.
- 41. Gao, X., et al., *Thulium laser resection via a flexible cystoscope for recurrent nonmuscle-invasive bladder cancer: initial clinical experience*. BJU Int, 2008. **102**(9): p. 1115-1118.
- 42. Sylvester, R.J., W. Oosterlinck, and A.P. van der Meijden, A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. J Urol, 2004. **171**(6 Pt 1): p. 2186-2190.
- 43. Shelley, M.D., et al., A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guerin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. BJU Int, 2001. **88**(3): p. 209-216.
- 44. Bohle, A., D. Jocham, and P.R. Bock, *Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity.* J Urol, 2003. **169**(1): p. 90-95.
- 45. Rintala, E., et al., *Intravesical chemotherapy (mitomycin C) versus immunotherapy (bacillus Calmette-Guerin) in superficial bladder cancer.* Eur Urol, 1991. **20**(1): p. 19-25.
- 46. Lundholm, C., et al., A Randomized Prospective Study Comparing Long-Term Intravesical Instillations of Mitomycin C and Bacillus Calmette-Guerin in Patients with Superficial Bladder Carcinoma. Journal of Urology, 1996. **156**(2): p. 372-376.
- 47. Mathes, J. and T. Todenhofer, *Managing Toxicity of Intravesical Therapy*. Eur Urol Focus, 2018. **4**(4): p. 464-467.
- 48. Schmidt, S., et al., *Intravesical Bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for Ta and T1 bladder cancer.* Cochrane Database Syst Rev, 2020. **1**.
- 49. Saint, F., et al., Leukocyturia as a predictor of tolerance and efficacy of intravesical BCG maintenance therapy for superficial bladder cancer. Urology, 2001. 57(4): p. 617-621.
- 50. Ehdaie, B., R. Sylvester, and H.W. Herr, *Maintenance bacillus Calmette-Guerin treatment of non-muscle-invasive bladder cancer: a critical evaluation of the evidence.* Eur Urol, 2013. **64**(4): p. 579-585.
- 51. Zargar, H., et al., *Optimizing intravesical mitomycin C therapy in non-muscle-invasive bladder cancer.* Nat Rev Urol, 2014. **11**(4): p. 220-230.
- 52. Hayes, M.C., et al., *Cellular resistance to mitomycin C is associated with overexpression of MDR-1 in a urothelial cancer cell line (MGH-U1).* BJU Int, 2001.
 87(3): p. 245-250.
- 53. von Rundstedt, F.C. and S.P. Lerner, *Bacille-Calmette-Guerin non-responders: how to manage.* Transl Androl Urol, 2015. **4**(3): p. 244-253.
- 54. Kawai, K., et al., Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. Cancer Sci, 2013. **104**(1): p. 22-27.
- 55. van Rhijn, B.W., et al., *Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy.* Eur Urol, 2009. **56**(3): p. 430-442.
- 56. Zieger, K., et al., *Long-term follow-up of noninvasive bladder tumours (stage Ta): recurrence and progression.* BJU Int, 2000. **85**(7): p. 824-828.

- 57. Hui, Y.F. and J. Reitz, *Gemcitabine: a cytidine analogue active against solid tumors.* Am J Health Syst Pharm, 1997. **54**(2): p. 162-70.
- 58. Plunkett, W., P. Huang, and V. Gandhi, *Gemcitabine: Actions and Interactions*. Nucleosides and Nucleotides, 1997. **16**(7-9): p. 1261-1270.
- 59. Hertel, L.W., et al., *Synthesis of 2-Deoxy-2,2-difluoro-D-ribose and 2-Deoxy-2,2-difluoro-D-ribofuranosyl Nucleosides.* Journal of Organic Chemistry, 1988(53): p. 2406-2409.
- 60. Hertel, L.W., et al., *Evaluation of the Antitumor Activity of Gemcitabine (2',2 ' Difluoro-2 ' -deoxycytidine).* Cancer Research, 1990. **50**: p. 4417-4422.
- 61. Song, J.H., et al., *Antiviral activity of gemcitabine against human rhinovirus in vitro and in vivo*. Antiviral Res, 2017. **145**: p. 6-13.
- 62. Huang, P., et al., *Action of 2',2'-Difluorodeoxycytidine on DNA Synthesis.* Cancer Research, 1991. **51**: p. 6110-6117.
- 63. Dasanu, C.A., *Gemcitabine: vascular toxicity and prothrombotic potential.* Expert Opin Drug Saf, 2008. **7**(6): p. 703-716.
- 64. Di Lorenzo, G., et al., *Gemcitabine versus bacille Calmette-Guerin after initial bacille Calmette-Guerin failure in non-muscle-invasive bladder cancer: a multicenter prospective randomized trial.* Cancer, 2010. **116**(8): p. 1893-1900.
- 65. Hurle, R., et al., *Midterm follow-up (3 years) confirms and extends short-term results of intravesical gemcitabine as bladder-preserving treatment for non-muscle-invasive bladder cancer after BCG failure.* Urol Oncol, 2020.
- 66. Shelley, M.D., et al., *Intravesical gemcitabine therapy for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC): a systematic review.* BJU Int, 2012. **109**(4): p. 496-505.
- 67. Addeo, R., et al., *Randomized phase III trial on gemcitabine versus mytomicin in recurrent superficial bladder cancer: evaluation of efficacy and tolerance.* J Clin Oncol, 2010. **28**(4): p. 543-548.
- 68. Ye, Z., et al., The efficacy and safety of intravesical gemcitabine vs Bacille Calmette-Guerin for adjuvant treatment of non-muscle invasive bladder cancer: a metaanalysis. Onco Targets Ther, 2018. **11**: p. 4641-4649.
- 69. Kerr, M., et al., *Deoxycytidine kinase expression underpins response to gemcitabine in bladder cancer*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(21): p. 5435-5445.
- 70. Garza, Z.C.F., et al., *Visible Blue Light Therapy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities*. Curr Med Chem, 2018. **25**(40): p. 5564-5577.
- 71. Ash, C., et al., *Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods.* Lasers Med Sci, 2017. **32**(8): p. 1909-1918.
- 72. Clement, M., G. Daniel, and M. Trelles, *Optimising the design of a broad-band light source for the treatment of skin.* J Cosmet Laser Ther, 2005. **7**(3-4): p. 177-189.
- Taflinski, L., et al., Blue light inhibits transforming growth factor-beta1-induced myofibroblast differentiation of human dermal fibroblasts. Exp Dermatol, 2014.
 23(4): p. 240-246.
- 74. Mamalis, A., M. Garcha, and J. Jagdeo, *Light emitting diode-generated blue light modulates fibrosis characteristics: fibroblast proliferation, migration speed, and reactive oxygen species generation.* Lasers Surg Med, 2015. **47**(2): p. 210-215.
- Liebmann, J., M. Born, and V. Kolb-Bachofen, *Blue-light irradiation regulates* proliferation and differentiation in human skin cells. J Invest Dermatol, 2010. **130**(1): p. 259-269.

- Awakowicz, P., et al., *Biological Stimulation of the Human Skin Applying HealthPromoting Light and Plasma Sources.* Contributions to Plasma Physics, 2009.
 49(9): p. 641-647.
- 77. Pilorz, V., et al., *Melanopsin Regulates Both Sleep-Promoting and Arousal-Promoting Responses to Light*. PLoS Biol, 2016. **14**(6).
- 78. Tosini, G., I. Ferguson, and K. Tsubota, *Effects of blue light on the circadian system and eye physiology.* Molecular Vision, 2016. **22**: p. 61-72.
- 79. Campbell, S.S. and P.J. Murphy, *Extraocular circadian phototransduction in humans*. Science, 1998. **279**(5349): p. 396-399.
- 80. Eichler, M., et al., *Flavins are source of visible-light-induced free radical formation in cells.* Lasers Surg Med, 2005. **37**(4): p. 314-319.
- 81. Berson, D.M., F.A. Dunn, and M. Takao, *Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1070-1073.
- 82. Do, M.T., et al., *Photon capture and signalling by melanopsin retinal ganglion cells.* Nature, 2009. **457**(7227): p. 281-287.
- 83. Matsuyama, T., et al., *Photochemical properties of mammalian melanopsin.* Biochemistry, 2012. **51**(27): p. 5454-5462.
- 84. Cardoso, D.R., et al., *Riboflavin-photosensitized oxidation is enhanced by conjugation in unsaturated lipids.* J Agric Food Chem, 2013. **61**(9): p. 2268-2275.
- 85. Lewis, J.B., et al., *Blue light differentially alters cellular redox properties.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005. **72**(2): p. 223-229.
- 86. Ebbesen, F., et al., *Bilirubin isomer distribution in jaundiced neonates during phototherapy with LED light centered at 497 nm (turquoise) vs. 459 nm (blue).* Pediatr Res, 2016. **80**(4): p. 511-515.
- 87. Tsutsumi, M., et al., *Expressions of rod and cone photoreceptor-like proteins in human epidermis.* Exp Dermatol, 2009. **18**(6): p. 567-570.
- 88. Oplander, C., et al., *Mechanism and biological relevance of blue-light (420-453 nm)induced nonenzymatic nitric oxide generation from photolabile nitric oxide derivates in human skin in vitro and in vivo.* Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 1363-1377.
- 89. Massey, V., *The Chemical and Biological Versatility of Riboflavin*. Biochemical Society Transactions, 2000. **28**(4).
- 90. O'Brien, P.J., *Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity*. Chemico-Biological Interactions, 1991. **80**(1): p. 1-41.
- 91. Khaydukov, E.V., et al., *Riboflavin photoactivation by upconversion nanoparticles for cancer treatment*. Sci Rep, 2016. **6**.
- 92. Winterbourn, C.C., *Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(5): p. 278-286.
- 93. Halliwell, B. and J. Gutteridge, *Free radicals in Biology and Medicine*. 5 ed. 2015: Oxford University Press.
- 94. Oh, P.S., et al., *Blue light emitting diode induces apoptosis in lymphoid cells by stimulating autophagy.* Int J Biochem Cell Biol, 2016. **70**: p. 13-22.
- 95. Fischer, M.R., et al., *Blue light irradiation suppresses dendritic cells activation in vitro*. Exp Dermatol, 2013. **22**(8): p. 558-560.
- 96. Cai, A., et al., A Pilot Metabolic Profiling Study of Patients With Neonatal Jaundice and Response to Phototherapy. Clin Transl Sci, 2016. **9**(4): p. 216-220.
- 97. Kumar, P., et al., Light emitting diodes versus compact fluorescent tubes for phototherapy in neonatal jaundice: a multi center randomized controlled trial. Indian Pediatr, 2010. **47**(2): p. 131-137.

- 98. Wataha, J., *Biological effects of blue light from dental curing units.* Dental Materials, 2004. **20**(2): p. 150-157.
- Moy, L.S., D. Frost, and S. Moy, *Photodynamic Therapy for Photodamage, Actinic Keratosis, and Acne in the Cosmetic Practice.* Facial Plast Surg Clin North Am, 2020. 28(1): p. 135-148.
- 100. Morton, C.A., et al., *An open study to determine the efficacy of blue light in the treatment of mild to moderate acne.* J Dermatolog Treat, 2005. **16**(4): p. 219-223.
- 101. Becker, D., et al., *Clinical efficacy of blue light full body irradiation as treatment option for severe atopic dermatitis.* PLoS One, 2011. **6**(6).
- 102. Zhang, P. and M.X. Wu, *A clinical review of phototherapy for psoriasis*. Lasers Med Sci, 2018. **33**(1): p. 173-180.
- 103. Weinstabl, A., et al., *Prospective randomized study on the efficacy of blue light in the treatment of psoriasis vulgaris.* Dermatology, 2011. **223**(3): p. 251-259.
- 104. Magni, G., et al., *Experimental Study on Blue Light Interaction with Human Keloid-Derived Fibroblasts.* Biomedicines, 2020. **8**(12).
- 105. Wang, T., et al., Blue light therapy to treat candida vaginitis with comparisons of three wavelengths: an in vitro study. Lasers Med Sci, 2020. **35**(6): p. 1329-1339.
- 106. Keemss, K., et al., *Prospective, Randomized Study on the Efficacy and Safety of Local UV-Free Blue Light Treatment of Eczema*. Dermatology, 2016. **232**(4): p. 496-502.
- 107. Huang, C., et al., Long-term blue light exposure induces RGC-5 cell death in vitro: involvement of mitochondria-dependent apoptosis, oxidative stress, and MAPK signaling pathways. Apoptosis, 2014. **19**(6): p. 922-932.
- 108. Beatty, S., et al., *The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration.* Survey of Ophthalmology, 2000. **45**(2): p. 115-134.
- Ham, W.T., et al., *Histologic analysis of photochemical lesions produced in rhesus retina by short-wavelength light*. Investigative Ophtalmology & Visual Science, 1978.
 17(10): p. 1029-1035.
- 110. Oh, P.S., et al., *Inhibitory effect of blue light emitting diode on migration and invasion of cancer cells.* J Cell Physiol, 2017. **232**(12): p. 3444-3453.
- Zhuang, J., et al., Blue light-induced apoptosis of human promyelocytic leukemia cells via the mitochondrial-mediated signaling pathway. Oncol Lett, 2018. 15(5): p. 6291-6296.
- 112. Oh, P.S., et al., *Effect of blue light emitting diodes on melanoma cells: involvement of apoptotic signaling.* J Photochem Photobiol B, 2015. **142**: p. 197-203.
- 113. Nishi, M., et al., *Effect of light irradiation by light emitting diode on colon cancer cells and cancer stem cells.* Journal of Clinical Oncology, 2015. **33**: p. 271-271.
- 114. Oplander, C., et al., *Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts*. J Photochem Photobiol B, 2011. **103**(2): p. 118-125.
- Bouillaguet, S., et al., Intracellular reactive oxygen species in monocytes generated by photosensitive chromophores activated with blue light. Dent Mater, 2008. 24(8): p. 1070-1076.
- Edwards, A.M. and E. Silva, Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2001. 63(1-3): p. 126-131.
- 117. Barile, M., et al., Flavin adenine dinucleotide and flavin mononucleotide metabolism in rat liver--the occurrence of FAD pyrophosphatase and FMN phosphohydrolase in isolated mitochondria. Eur J Biochem, 1997. **249**(3): p. 777-785.
- 118. Yoshida, A., et al., *Blue light irradiation-induced oxidative stress in vivo via ROS generation in rat gingival tissue.* J Photochem Photobiol B, 2015. **151**: p. 48-53.
- 119. Ohara, M., T. Fujikura, and H. Fujiwara, *Augmentation of the inhibitory effect of blue light on the growth of B16 melanoma cells by riboflavin*. International Journal of Oncology, 2003.
- 120. Juarez, A.V., et al., *Riboflavin acetate induces apoptosis in squamous carcinoma cells after photodynamic therapy*. J Photochem Photobiol B, 2015. **153**: p. 445-454.
- 121. Yang, M.Y., C.J. Chang, and L.Y. Chen, *Blue light induced reactive oxygen species from flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide on lethality of HeLa cells.* J Photochem Photobiol B, 2017. **173**: p. 325-332.
- 122. Halliwell, B., *The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system.* Haemostasis, 1993. **23 Suppl 1**: p. 118-126.
- 123. Khan, S. and I. Naseem, *Photocatalytic interaction of aminophylline-riboflavin leads* to *ROS-mediated DNA damage and cell death: A novel phototherapeutic mechanism* for cancer. IUBMB Life, 2017. **69**(8): p. 611-622.
- Lockwood, D.B., et al., Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. Dent Mater, 2005. 21(7): p. 683-688.
- 125. Hanschmann, E.M., et al., *Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling.* Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(13): p. 1539-1605.
- 126. de Souza, A.C., et al., *A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death.* Apoptosis, 2006. **11**(10): p. 1761-1771.
- Munoz, M.A., et al., Different cell death mechanisms are induced by a hydrophobic flavin in human tumor cells after visible light irradiation. J Photochem Photobiol B, 2011. 103(1): p. 57-67.
- 128. de Souza Queiroz, K.C., et al., *A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours.* Cancer Lett, 2007. **258**(1): p. 126-134.
- 129. Machado, D., et al., Irradiated riboflavin diminishes the aggressiveness of melanoma in vitro and in vivo. PLoS One, 2013. **8**(1).
- 130. Chaves Neto, A.H., et al., *Antitumor activity of irradiated riboflavin on human renal carcinoma cell line 786-O.* Tumour Biol, 2015. **36**(2): p. 595-604.
- 131. Akasov, R.A., et al., *Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide.* Sci Rep, 2019. **9**(1).
- Darguzyte, M., et al., *Riboflavin-Targeted Drug Delivery*. Cancers (Basel), 2020.
 12(2).
- 133. Alexiades-Armenakas, M., *Laser-mediated photodynamic therapy*. Clin Dermatol, 2006. **24**(1): p. 16-25.
- 134. Galluzzi, L., et al., *Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis.* Immunity, 2016. **44**(2): p. 221-231.
- Galluzzi, L., et al., Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ, 2018. 25(3): p. 486-541.
- 136. Gerald, K., Cell Biology 2014: Wiley.
- 137. Kerr, J.F., Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. J Pathol, 1971.
 105(1): p. 13-20.
- 138. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-288.

- 139. An, W., et al., *Apoptotic Pathway as the Therapeutic Target for Anticancer Traditional Chinese Medicines.* Front Pharmacol, 2019. **10**.
- 140. Ooi, H.K. and L. Ma, *Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway.* BMC Syst Biol, 2013. **7**.
- 141. Kuida, K., *Caspase-9.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2000.
 32(2): p. 121-124.
- 142. Khan, M., et al., *Targeting Apoptosis and Multiple Signaling Pathways with Icariside II in Cancer Cells.* Int J Biol Sci, 2015. **11**(9): p. 1100-1112.
- Maes, M.E., C.L. Schlamp, and R.W. Nickells, BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells. Prog Retin Eye Res, 2017. 57: p. 1-25.
- 144. Korsmeyer, S.J., et al., Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. Cell Death Differ, 2000. 7(12): p. 1166-1173.
- 145. De Duve, C. and R. Wattiaux, *Functions of lysosomes*. Annu Rev Physiol, 1966. **28**: p. 435-492.
- 146. Ohsumi, Y., Molecular Mechanisms of Autophagy in Yeast, in Nobel Lecture. 2016.
- 147. Lee, S.Y., et al., *Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis.* Oxid Med Cell Longev, 2018. **2018**.
- 148. Zong, W.X. and C.B. Thompson, *Necrotic death as a cell fate*. Genes Dev, 2006.20(1): p. 1-15.
- 149. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.* The American Journal of Pathology, 1995. **146**(1): p. 3-15.
- 150. Weedon, D., J. Searle, and J.F.R. Kerr, *Apoptosis*. The American Journal of Dermatopathology, 1979. **1**(2): p. 133-144.
- 151. Sentman, C.L., et al., *bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes.* Cell, 1991. **67**(5): p. 879-888.
- 152. Strasser, A., A.W. Harris, and S. Cory, *bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship.* Cell, 1991. **67**(5): p. 889-899.
- 153. Hockenbery, D., et al., *Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.* Nature, 1990. **348**(6299): p. 334-336.
- 154. Oltval, Z.N., C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programed cell death.* Cell, 1993. **74**(4): p. 609-619.
- 155. Marino-Ramirez, L., et al., *Histone structure and nucleosome stability*. Expert Rev Proteomics, 2005. **2**(5): p. 719-729.
- 156. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139.* J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-5868.
- 157. Redon, C., et al., *Histone H2A variants H2AX and H2AZ*. Current Opinion in Genetics
 & Development, 2002. 12(2): p. 162-169.
- 158. Ewald, B., D. Sampath, and W. Plunkett, *H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation.* Mol Cancer Ther, 2007. **6**(4): p. 1239-1248.
- 159. Mah, L.J., A. El-Osta, and T.C. Karagiannis, *gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair.* Leukemia, 2010. **24**(4): p. 679-686.
- 160. Rassow, J., et al., Duale Reihe Biochemie. 2016: Thieme.
- 161. Horn, F., Biochemie des Menschen. 2021: Thieme.

- 162. Puzio-Kuter, A.M., et al., *Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer*. Genes Dev, 2009. **23**(6): p. 675-680.
- 163. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 315-322.
- Huang, Y.T., et al., Therapeutic potential of sepantronium bromide YM155 in gemcitabine-resistant human urothelial carcinoma cells. Oncol Rep, 2014. 31(2): p. 771-780.
- Pasquale, V., et al., Profiling and Targeting of Energy and Redox Metabolism in Grade 2 Bladder Cancer Cells with Different Invasiveness Properties. Cells, 2020.
 9(12).
- 166. Jeon, H.G., et al., Induction of caspase mediated apoptosis and down-regulation of nuclear factor-kappaB and Akt signaling are involved in the synergistic antitumor effect of gemcitabine and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in human bladder cancer cells. J Urol, 2011. 186(5): p. 2084-2093.
- 167. GmbH, P., Zellbasierte & Biochemische Assays. 2016.
- 168. Cecchi, C., et al., *Differing molecular mechanisms appear to underlie early toxicity of prefibrillar HypF-N aggregates to different cell types.* FEBS J, 2006. **273**(10): p. 2206-2222.
- 169. Berridge, M.V. and A.S. Tan, Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Arch Biochem Biophys, 1993. 303(2): p. 474-482.
- 170. Moravec, R. and T. Riss, *The Celltiter-Blue™ cell viability assay: Monitoring cell viability using a fluorescent redox indicator dye*. 2003.
- 171. Yang, H.T., P.C. Chao, and M.C. Yin, *Riboflavin at high doses enhances lung cancer cell proliferation, invasion, and migration.* J Food Sci, 2013. **78**(2).
- 172. Husain, E. and I. Naseem, *Riboflavin-mediated cellular photoinhibition of cisplatininduced oxidative DNA breakage in mice epidermal keratinocytes.* Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2008. **24**(6): p. 301-307.
- 173. Gardmark, T., et al., Randomized phase II marker lesion study evaluating effect of scheduling on response to intravesical gemcitabine in recurrent Stage Ta urothelial cell carcinoma of the bladder. Urology, 2005. **66**(3): p. 527-530.
- 174. Krassovka, J.M., Molekulare Grundlagen der durch blaues Licht induzierten Differenzierungshemmung humaner Fibroblasten zu Myofibroblasten. 2017, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Düsseldorf.
- 175. Tao, J.X., W.C. Zhou, and X.G. Zhu, *Mitochondria as Potential Targets and Initiators* of the Blue Light Hazard to the Retina. Oxid Med Cell Longev, 2019. **2019**.
- 176. Aggarwal, B.B., et al., *Damage to mitochondrial electron transport and energy coupling by visible light.* Biochimica et Biophysica Acta, 1978. **502**: p. 367-382.
- 177. Krassovka, J.M., et al., *The impact of non-toxic blue light (453 nm) on cellular antioxidative capacity, TGF-beta1 signaling, and myofibrogenesis of human skin fibroblasts.* J Photochem Photobiol B, 2020. **209**.
- 178. Godley, B.F., et al., *Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells.* J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21061-21066.
- Moghissi, K., et al., Photodynamic therapy (PDT) in early central lung cancer: a treatment option for patients ineligible for surgical resection. Thorax, 2007. 62(5): p. 391-395.

- 180. Agostinis, P., et al., *Photodynamic therapy of cancer: an update.* CA Cancer J Clin, 2011. **61**(4): p. 250-281.
- Manyak, M.J. and K. Ogan, Photodynamic therapy for refractory superficial bladder cancer: long-term clinical outcomes of single treatment using intravesical diffusion medium. J Endourol, 2003. 17(8): p. 633-639.
- 182. Miyazaki, K., et al., A novel homogeneous irradiation fiber probe for whole bladder wall photodynamic therapy. Lasers Surg Med, 2012. **44**(5): p. 413-420.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christoph V. Suschek und bei Prof. Dr. Joachim Windolf sowie dem ganzen Labor der Orthopädie und Unfallchirurgie für die Möglichkeit diese Promotionsarbeit erstellen zu können. Danke Christoph für die tolle Betreuung und dafür, dass du immer ein offenes Ohr für jedes Anliegen hattest. Ein großes Dankeschön auch an Samira Seghrouchni, Jutta Schneider und Christa Wilkens, die jederzeit zur Hilfe bereitstanden und immer für gute Laune gesorgt haben. Für die Zweitbetreuung und Unterstützung möchte ich mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. Günter Niegisch bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf diesem Weg begleitet haben, in guten wie in schlechten Zeiten. Danke Mama und Papa ohne euch wäre ich nicht da, wo ich heute bin. Ihr habt mich immer unterstützt, mich motiviert und aufgemuntert genauso wie meine Geschwister David, Elisa, Lukas und Anni, die immer mitfiebern. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Gerd für das Interesse an meiner Arbeit und die Unterstützung.

Nicht zuletzt warst du es Sevi, der mich jederzeit unterstützt hat, für mich da war, mir Motivation geschenkt hat und immer an mich geglaubt hat. Ich bin so froh dich als Freund und Partner an meiner Seite zu haben.

Danke auch an unsere flauschige Mitbewohnerin Perla, für die spielerischen und kuschligen Abwechslungen zwischendurch.