

***In vitro*-Untersuchungen**
von Hämatoporphyrin-Platin(II)-Komplexen –
eine neue Klasse von selektiven
Photosensibilisatoren mit intrinsischer Zytotoxizität

Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV - Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Christian Lottner
aus Neunburg vorm Wald
2003

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. H. Brunner.

Promotionsgesuch eingereicht am: 06. Dezember 2002

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Januar 2003

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. H. Brunner

Prof. Dr. R. Knüchel-Clarke

Prof. Dr. O. S. Wolfbeis

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Liefländer

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2000 bis Dezember 2002 am Lehrstuhl Prof. Dr. H. BRUNNER, Institut für Anorganische Chemie der Universität Regensburg in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie, Prof. Dr. F. HOFSTÄDTER, Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. KNÜCHEL-CLARKE, Universitätsklinikum Regensburg und dem Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie II, Prof. Dr. A. BUSCHAUER, Universität Regensburg.

Meinem hochgeschätzten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. Henri Brunner

danke ich an dieser Stelle sehr herzlich für die vielschichtige und interdisziplinäre Themenstellung, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und das mir entgegebrachte uneingeschränkte Vertrauen.

Für
meine Eltern und Lucia

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	DIE HARNBLASE – DAS HARNBLASENKARZINOM	1
1.2	PLATINVERBINDUNGEN ALS ZYTOSTATIKA	4
1.2.1	<i>Entdeckungsgeschichte der zytostatischen Wirkung</i>	4
1.2.2	<i>Klinischer Einsatz von Cisplatin</i>	4
1.2.3	<i>Wirkmechanismus von Cisplatin</i>	5
1.2.4	<i>Reaktionen mit DNA</i>	6
1.2.5	<i>Pharmakologie und Toxikologie von Cisplatin</i>	9
1.3	PHOTODYNAMISCHE TUMORTHERAPIE (PDT)	11
1.3.1	<i>Historische Entwicklung.....</i>	11
1.3.2	<i>Prinzip der photodynamischen Therapie.....</i>	12
1.3.3	<i>Anforderungen an einen Sensibilisator für die PDT</i>	14
1.3.4	<i>Medizinische Anwendung der PDT – neue Photosensibilisatoren.....</i>	17
2	ZIELSETZUNG.....	19
3	MATERIAL UND METHODEN.....	24
3.1	ETABLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER VERWENDETEN TUMOR- ZELLINNEN	24
3.1.1	<i>Das Seed-Stock-Konzept.....</i>	24
3.1.2	<i>Verwendete Zelllinien</i>	25

3.1.3 Kultivierung der Zelllinien	26
3.1.4 Zellzahlbestimmung und Volumenmessung.....	26
3.1.5 Chromosomenpräparation.....	27
3.1.5.1 Vorbehandlung der Objektträger	27
3.1.5.2 Fixierung und Färbung der Chromosomen.....	28
3.1.5.3 Chromosomenzählung	28
3.2 BESTRAHLUNG VON 96-LOCH-MIKROTITERPLATTEN.....	29
3.3 CHEMOSENSITIVITÄTSTEST	30
3.3.1 <i>Dunklexperiment</i>	30
3.3.1.1 Aussäen der Zellkulturen	30
3.3.1.2 Herstellung und Lagerung der Wirkstofflösungen	30
3.3.1.3 Substanzzugabe.....	31
3.3.2 <i>Chemosensitivitätstest mit und ohne Bestrahlung</i>	32
3.3.3 <i>Ermittlung der Zellmasse mit dem Kristallviolett-Assay</i>	32
3.3.3.1 Fixieren der Zellen.....	32
3.3.3.2 Kolorimetrische Messung der Zelldichte.....	33
3.4 FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE.....	34
3.4.1 <i>Molekülphysikalische Grundlagen</i>	34
3.4.2 <i>Spektrale Eigenschaften</i>	35
3.4.3 <i>Bestimmung des Porphyringehalts in J82- und UROtsa-Zellen mittels Fluoreszenzspektroskopie</i>	36
3.4.3.1 Kalibrierung	36
3.4.3.2 Quantifizierung von zellassoziiertem L, K1, K2 bzw. Hämato-porphyrin in J82- und UROtsa-Zellen	38

3.4.3.2.1 Inkubation der Zellen mit L, K1, K2 bzw. Hämatoporphyrin....	38
3.4.3.2.2 Probenvorbereitung für die Proteinbestimmung und Fluoreszenzmessung	38
3.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	40
3.5.1 <i>Prinzipieller Aufbau</i>	40
3.5.2 <i>Auswertung und Interpretation der Daten</i>	42
3.5.3 <i>Bestimmung der Langzeitkinetik</i>	42
3.6 MIKROSKOPIE.....	44
3.6.1 <i>(Auflicht)-Fluoreszenzmikroskopie</i>	44
3.6.2 <i>Phasenkontrast- und Hellfeldmikroskopie</i>	45
3.6.3 <i>Sensibilisatorlokalisierung</i>	45
3.6.3.1 Kolokalisationsexperiment mit Lysosomen	45
3.6.3.2 Kolokalisationsexperiment mit Mitochondrien	46
3.6.3.3 Intrazelluläre Lokalisation: Golgi-Apparat.....	48
3.7 SPHÄROIDE ALS 3-D-KULTURMODELLE	50
3.7.1 <i>Kultivierung der 3-D-Aggregate</i>	51
3.7.2 <i>Inkubation der Sphäroide mit Porphyrinverbindungen</i>	52
3.7.3 <i>Mikroskopische Aufnahme der Porphyrinfluoreszenz</i>	52
3.7.4 <i>Quantifizierung der Porphyrinfluoreszenz</i>	52
3.7.5 <i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	53
3.8 PLATINBESTIMMUNG DURCH AAS	54
3.8.1 <i>Quantitative Platinbestimmung mit der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)</i>	54
3.8.2 <i>Prinzip der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)</i>	54

3.8.3 Durchführung der Platinbestimmung.....	56
3.8.3.1 Das Ofenprogramm.....	56
3.8.3.2 Kalibrierung	58
3.8.4 Quantifizierung von zellassoziiertem Platin in J82- und UROtsa-Zellen	59
3.8.4.1 Inkubation der Zellen mit Platinkomplexen	59
3.8.4.2 Probenvorbereitung für die Proteinbestimmung und AAS	59
3.8.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford	59
3.8.4.4 Ultrafiltration	60
3.8.5 Quantifizierung von DNA-gebundenem Platin in J82- und UROtsa-Zellen	61
3.8.5.1 Inkubation der J82- und UROtsa-Zellen mit Platinkomplexen.....	61
3.8.5.2 Lyse mit Proteinase K.....	61
3.8.5.3 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion.....	61
3.8.5.4 Ethanolfällung der DNA.....	62
3.8.5.5 Bestimmung der DNA-Konzentration und des Reinheitsgrads.....	62
3.8.5.6 AAS-Messung des Platingehalts der isolierten DNA.....	63
3.9 ABSORPTIONSSPEKTREN.....	64
3.10 BESTIMMUNG DER GLUTATHIONKONZENTRATION UND DES EINFLUSSES VON BUTHIONINSULFOXIMIN AUF J82- UND UROTSZA-ZELLEN	65
3.10.1 Chemosensitivitätstest mit BSO	65
3.10.2 Ellman-Assay	66
3.10.2.1 Inkubation der J82- und UROtsa-Zellen	67
3.10.2.2 Vorbereitung der Glutathionstandards.....	67
3.10.2.3 Gesamt-SH-Gehalt in J82- und UROtsa-Zellen	68

3.10.2.4 SH-Gehalt von niedermolekularen Verbindungen in J82- und UROtsa-Zellen	68
3.11 STATISTISCHE AUSWERTUNG	69
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	
IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN DER WASSERLÖSLICHEN	
PORPHYRIN-PLATIN(II)-KOMPLEXE K1 UND K2	70
4.1 CHEMOSENSITIVITÄTSTEST	70
4.1.1 <i>Chemosensitivitätstest verschiedener Zytostatika an humanen Harnblasen-Zelllinien</i>	72
4.1.2 <i>Chemosensitivitätstest in Dauerinkubation</i>	77
4.1.3 <i>Untersuchung zur Inaktivierung der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe K1 und K2 im Kulturmedium</i>	80
4.1.4 <i>Chemosensitivitätstests bei Kurzzeitinkubation mit K1 und K2</i>	83
4.1.5 <i>Antiproliferative Wirkung der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe an humanen Zellen mit und ohne Bestrahlung</i>	87
4.1.6 <i>Zusammenfassung der Zellkulturexperimente</i>	94
4.2 FLUORESENZGESTÜTZTE UNTERSUCHUNGEN ZUM AUFNAHMEVERHALTEN DER PORPHYRIN-PLATIN(II)-KOMPLEXE IN J82- UND UROTS A-ZELLEN	97
4.2.1 <i>Fluoreszenzspektroskopische Quantifizierung des zellassoziierten Porphyrins</i>	97
4.2.2 <i>Durchflusszytometrische Messung der Aufnahmekinetik von K1 und K2</i>	103
4.2.3 <i>Zusammenfassende Diskussion</i>	108
4.3 INTRAZELLULÄRE SENSIBILISATORLOKALISATION	112
4.3.1 <i>Intrazelluläre K1- und K2-Lokalisation</i>	112
4.3.2 <i>Intrazelluläre L- und Hämatoporphyrin-Lokalisation</i>	117

4.3.3 Zusammenfassende Diskussion.....	117
4.4 PENETRATIONSEIGENSCHAFTEN VON K1 UND K2 IN MULTIZELLULÄREN TUMORSPHÄROIDEN	124
4.5 QUANTITATIVE PLATINBESTIMMUNG MIT DER ATOMABSORPTIONS- SPEKTROSKOPIE (AAS)	129
4.5.1 Quantifizierung von zellassoziiertem Platin nach Behandlung von <i>J82- und UROtsa-Zellen mit K1 und Cisplatin</i>	129
4.5.1.1 Strategie	129
4.5.1.2 Bestimmung des zellassoziierten Platins	130
4.5.2 Quantifizierung der DNA-Platinierung.....	134
4.5.3 Bestimmung der intrazellulären Glutathionkonzentration und des Einflusses von Buthioninsulfoximin (BSO) auf J82- und UROtsa-Zellen	137
4.5.3.1 Chemosensitivitätstest mit BSO	138
4.5.3.2 Ellman-Assay	142
4.5.4 Zusammenfassende Diskussion.....	143
5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN DER PORPHYRIN- PLATIN(II)-KOMPLEXE K1a UND K2a.....	149
5.1 CHEMOSENSITIVITÄTSTEST	149
5.2 ANALYTISCHE UNTERSUCHUNGEN VON K1a UND K2a.....	153
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	156
7 ANHANG	165

7.1 QUANTIFIZIERUNG DES ZELLASSOZIIERTEN PORPHYRINS MITTELS FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE BEI EINER SUBSTANZINKUBATION VON 5 μ M	165
7.2 ABBILDUNGEN ZUR INTRAZELLULÄREN LOKALISATION VON L UND K2.....	166
7.3 CHEMOSENSITIVITÄTSTESTS ZU La, K1a UND K2a	171
7.4 VERWENDETE ABKÜRZUNGEN.....	180
7.5 BEZUGSQUELLENNACHWEIS	183
7.5.1 <i>Geräte und Materialien</i>	183
7.5.1.1 Zellkultur	183
7.5.1.2 Zytologische Färbung	183
7.5.1.3 Analytik	184
7.5.1.4 Sonstige Arbeitsmaterialien.....	184
7.5.2 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	186
7.5.2.1 Zellkultur	186
7.5.2.2 Zytologische Färbung	186
7.5.2.3 Analytik	186
7.5.3 <i>Lösungen</i>	187
8 LITERATURVERZEICHNIS	189
9 DANK	213

1 Kapitel

Einleitung

1.1 Die Harnblase – das Harnblasenkarzinom

Die Harnblase (*vesica urinaria*) ist ein urinspeicherndes Hohlorgan und zählt zu den ableitenden Harnwegen (Abbildung 1).

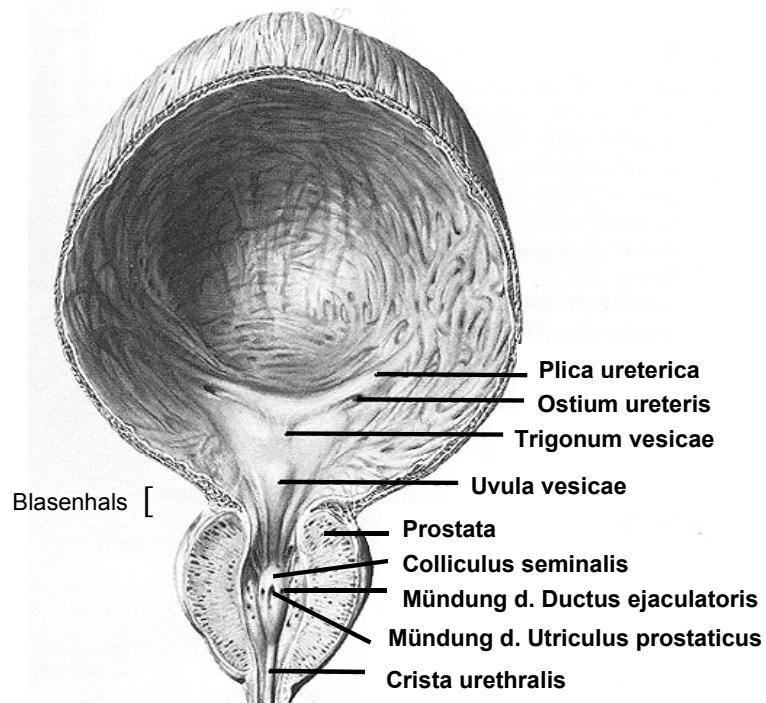


Abbildung 1: Schema einer männlichen Harnblase.^[1]

Sie sammelt den Endharn aus den Harnleitern (Ureteren) und führt ihn über die Harnröhre (Urethra) ab. Die Entleerung der Harnblase wird gesteuert über Rezeptoren in der dehnbaren Blasenwand, die den jeweiligen Füllungszustand registrieren, und mit Hilfe zweier Muskeln am Blasenausgang.^[2]

Weltweit erkranken jedes Jahr etwa 200.000 Menschen neu an Harnblasenkrebs^[3] (jährlich 15.000 neue Fälle in Deutschland). Bezogen auf alle Tumorneuerkrankungen in Deutschland liegt das Harnblasenkarzinom bei den Männern an 5. (6,2 %) und bei den Frauen an 11. Stelle (2,7 %).^[4] In der Mehrzahl der Harnblasentumore (90 %) handelt es sich um ein Karzinom, das aus dem Übergangsepithel der ableitenden Harnwege, dem Urothel, hervorgeht. Bei 70 % der Patienten wird initial ein oberflächlich wachsender Tumor diagnostiziert und bei 30 % ein bis in die Muskel- schicht vorgewachsenes Urothelkarzinom, das bereits bei der Erstdiagnose zu einem hohen Prozentsatz metastasiert ist.^[5] Neben zunehmendem Alter sind für die Urothelkarzinogenese berufliche und außerberufliche Umwelteinflüsse sowie bestimmte Lebensgewohnheiten bedeutend. Als Hauptursache für die Entstehung eines Harnblasenkrebses gilt heute das Rauchen. Die kausale Rolle des Zigarettenrauchens für die Entstehung von Blasenkrebs ist in einer Vielzahl epidemiologischer Studien nachgewiesen und gesichert.^[6]

Die Therapiemaßnahmen des Harnblasenkarzinoms orientieren sich in erster Linie am Tumorstadium. Jeder Tumor wird zunächst transurethral reseziert,^[*] um Informationen über die Histologie, das Grading und die lokale Infiltrationstiefe (T-Stadium) zu erhalten. Danach schließen sich abhängig vom Tumorstadium verschiedene Therapieansätze an. Bei fortgeschrittenem und metastasiertem Urothelkarzinom werden Kombinationschemotherapien basierend auf Cisplatin oder Methotrexat verwendet. Als Einzelsubstanzen erreichen Cisplatin und Methotrexat Remissionsraten von ca. 25-35 % mit einem Anteil kompletter Remissionen von jeweils ca. 5 %.^[7] Standardtherapie ist heute die Polychemotherapie mit M-VAC

* Transurethrale Resektion: Abtragung von Gewebe mittels einer durch die Harnröhre eingeführten elektrischen Schlinge unter optischer Kontrolle.

(Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin) bei metastasiertem Harnblasenkarzinom.^[8] Mit dieser Kombination werden Remissionsraten zwischen 40 und 72 %^[9] und eine mediane Überlebenszeit von 12-13 Monaten erreicht.^[10] Die Polychemotherapie mit M-VAC ist mit einer relativ hohen Toxizität verbunden, die sich in Form von Blutbildveränderungen, Nephrotoxizität, gastrointestinalen Störungen (Übelkeit und Erbrechen) und Aloperie (Haarausfall) äußern kann.^[11] Bei multifokalen, rezidivierenden, oberflächlichen Harnblasenkarzinomen steht neben der intravesikalen Behandlung mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG)^[12] und alternativ zur sofortigen Zystektomie die photodynamische Therapie zur Verfügung.

Im Folgenden werden in groben Zügen wesentliche Aspekte zur Chemotherapie mit Cisplatin und zur photodynamischen Therapie, die eine zentrale Rolle in der vorgelegten Arbeit spielen, dargestellt.

1.2 Platinverbindungen als Zytostatika

1.2.1 Entdeckungsgeschichte der zytostatischen Wirkung

cis-Diammin(dichloro)platin(II) (Cisplatin), eines aufgrund der d^8 -Konfiguration des Metalls quadratisch-planaren Komplexes, ist heute eines der erfolgreichsten Antitumormittel. Der Platinkomplex, erstmals um 1845 beschrieben^[13] und Objekt zahlreicher Untersuchungen auf dem Gebiet der anorganischen Stereo- und Reaktionschemie, wurde in den sechziger Jahren durch Zufall von B. Rosenberg als Zytostatikum entdeckt.^[14]

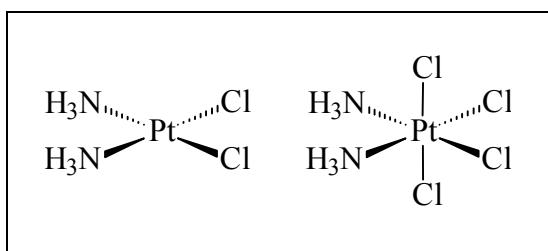


Abbildung 2: Cisplatin und *cis*-Diammin(tetrachloro)platin(IV).

Er untersuchte den Einfluss schwachen Wechselstroms auf das Wachstum von *Escherichia coli*-Bakterien und verwendete dazu scheinbar inerte Platinelektroden. Das Ergebnis war eine Hemmung der Zellteilung ohne gleichzeitige Inhibition des Bakterienwachstums, was zur Bildung langer, fadenförmiger Zellen

führte. Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, dass nicht der elektrische Strom selbst, sondern die in Spuren durch Oxidation der Platinelektroden gebildeten *cis*-konfigurierten Chlorokomplexe wie Cisplatin oder *cis*-Diammin(tetrachloro)platin(IV) (Abbildung 2) für diesen biologischen Effekt verantwortlich waren.^[15] Das filamentöse Wachstum der Bakterien korreliert mit der Antitumoraktivität der betreffenden Substanzen, d. h. mit der Hemmung der Zellteilung.^[16]

1.2.2 Klinischer Einsatz von Cisplatin

Das seit 1978 zugelassene Cisplatin wird als Einzelpräparat oder in Verbindung mit anderen synergistisch wirkenden Zytostatika^[17] gegen Hoden-, Ovarial-, Blasen- und Lungenkarzinome sowie gegen Tumore im Hals-Kopf-Bereich eingesetzt.^[18, 19, 20]

Ausgezeichnete Ergebnisse werden vor allem bei der Behandlung von Hodentumoren erzielt; die Heilungschancen liegen hier bei über 90 %.^[21, 22]

1.2.3 Wirkmechanismus von Cisplatin

Cisplatin wird durch intravenöse Injektion in Form einer wässrigen, salzhaltigen Lösung verabreicht. Eine orale Verabreichung ist wegen Hydrolyse in der sauren Magenflüssigkeit nicht möglich. 30-70 % der Platinverbindung binden an Plasmaproteine oder werden durch die Niere ausgeschieden. Der Rest wird unverändert durch das Blut transportiert und auf verschiedene Gewebe verteilt. Die hohe Chlorid-Ionenkonzentration von ungefähr 100 mM verhindert Hydrolysereaktionen von Cisplatin im Blut.^[23]

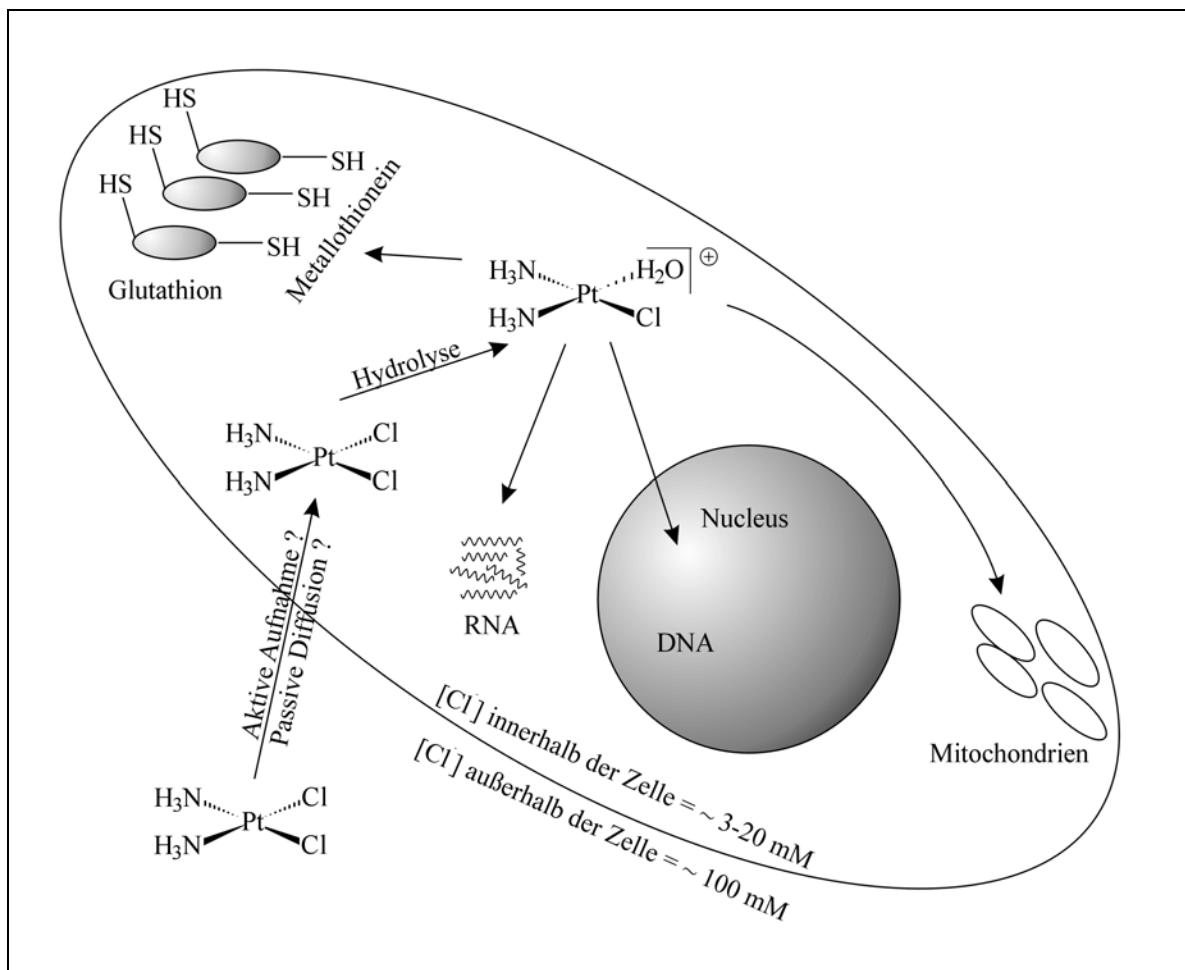


Abbildung 3: Wirkmechanismen von Cisplatin in einer Zelle.^[24]

Nach passiver Diffusion^[25] oder, wie auch diskutiert, nach aktiver Aufnahme^[26] des noch intakten Cisplats durch die Glycocalix verschiedener Zelltypen wird es im Inneren von Zellen rasch hydrolysiert, was auf die deutlich niedrigere Chlorid-Ionenkonzentration von ungefähr 3-20 mM im intrazellulärem Bereich zurückzuführen ist (Abbildung 3).^[23] Innerhalb der Zellen liegen etwa 40 % des Cisplats als *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl(H₂O)]⁺ vor.^[27] Dieses Hydrolyseprodukt, das unter anderem Bestandteil eines komplexen Hydrolysegleichgewichts von Cisplatin ist,^[28] ist kinetisch labil, da H₂O gegenüber Platin(II) eine bessere Abgangsgruppe ist als Cl⁻. Es wird daher angenommen, dass dieser kationische Komplex eine besonders aktive Form des Zytostatikums darstellt. Er kann nun in der Zelle mittels Ligandensubstitution mit Makromolekülen wie der DNA, RNA oder Proteinen reagieren.

1.2.4 Reaktionen mit DNA

Die wachstumshemmenden Eigenschaften von Cisplatin werden auf die Platinierung genetischer DNA zurückgeführt. Bei der Reaktion von Platinkomplexen mit der

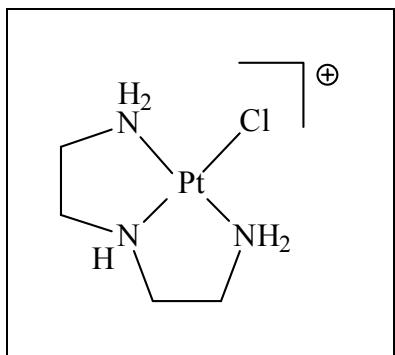


Abbildung 4: Pt(dien)Cl⁺.

DNA können unterschiedliche Arten von Pt-DNA-Addukten, bi- und monofunktioneller Art, gebildet werden.^[29] Da Komplexe mit nur einem labilen Liganden wie etwa Diethylenetriaminplatin(II)-chlorid, Pt(dien)Cl⁺ (Abbildung 4), therapeutisch inaktiv sind, spielt monofunktionell koordiniertes Platin vermutlich nur die Rolle einer Zwischenstufe.^[30] Chelatkomplexbildung durch Stickstoff- und Sauerstoff-Koordination an einer Base,

Verknüpfung zweier Nukleobasen eines DNA-Strangs (intrastrand cross-linking) (Abbildung 5), Quervernetzung zweier verschiedener DNA-Stränge (interstrand cross-linking) (Abbildung 5) und Verknüpfung der DNA mit einem Protein sind mögliche Alternativen.^[31] Experimente haben gezeigt, dass die Chelatkomplexbildung an O6-N7 einer Guanin-Base zwar prinzipiell möglich, aber innerhalb der

DNA-Doppelhelix nicht günstig ist. Auch „interstrand cross-linking“ und Protein-DNA-Verknüpfungen tragen offenbar nur in geringem Maße zur gesamten Platin-DNA-Adduktbildung bei. Für $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ entfällt der Hauptteil auf Bindungen zwischen dem Platinzentrum und zwei benachbarten, jeweils N7-koordinierten Guanosin-Nukleotiden auf demselben DNA-Strang (1,2-intrastrand d(GpG) cross-linking, 50-65 %; d: desoxy; p: phosphat); die zweithäufigste Bindung erfolgt durch 1,2-intrastrand d(ApG)-Verknüpfung (jeweils über N7; 25 %).^[32, 33]

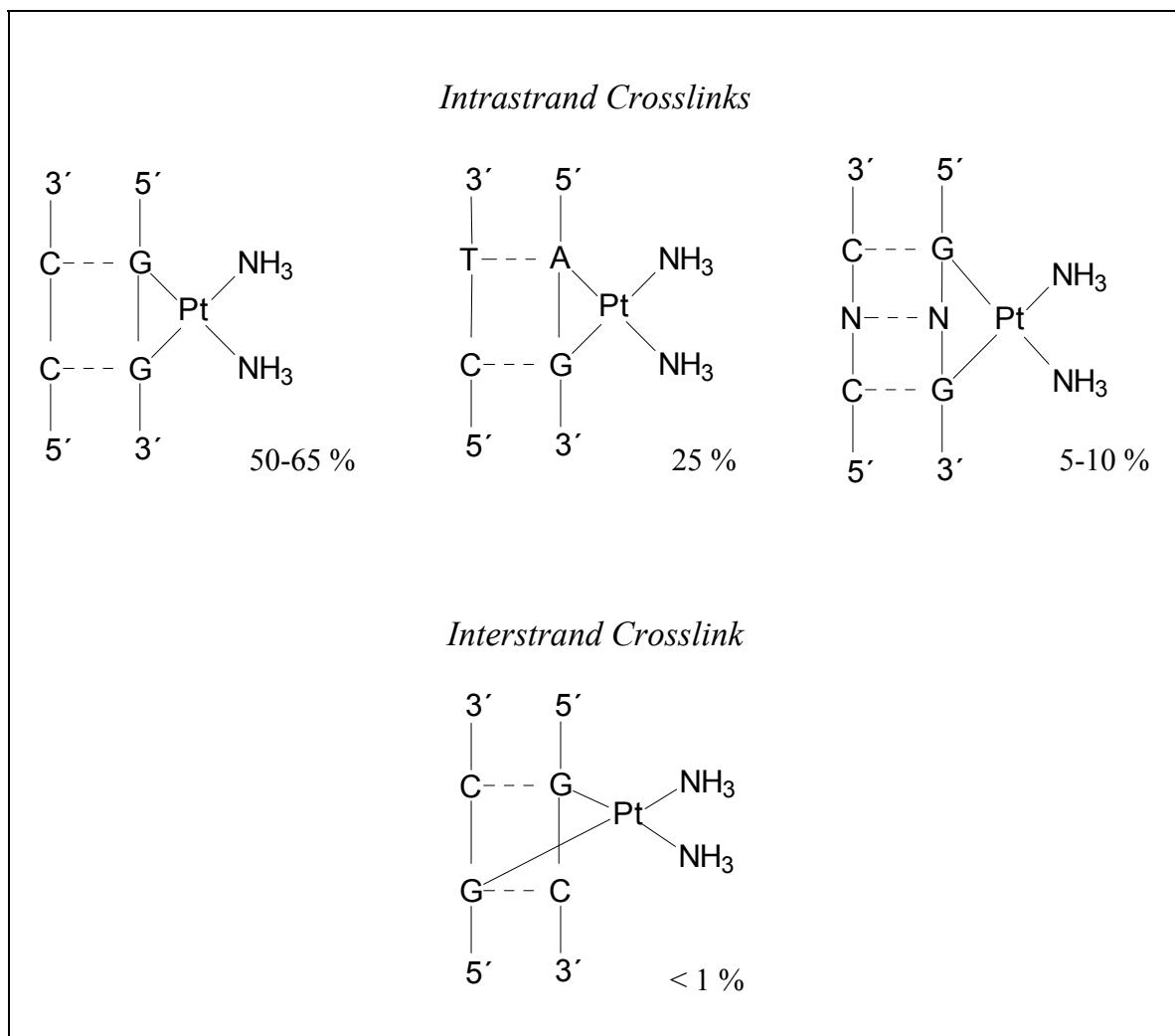


Abbildung 5: Mögliche Intrastrand oder Interstrand Crosslinks. G bedeutet Guanin, C Cytosin, A Adenin und T Thymin; N steht für ein beliebiges Nukleotid.

Die Bindung des Platinkomplexfragments an die DNA führt zu entscheidenden Struktur- und Eigenschaftsänderungen. Wie Abbildung 6, eine dreidimensionale

Struktur eines 1,2-intrastrand d(GpG) Crosslinks, die mittels NMR-Spektroskopie und Molecular Modelling erhalten wurde, zeigt, ist die Helix im Vergleich zu einer normalen B-DNA mit einem Winkel von ca. 45° geknickt und es bildet sich eine Wasserstoffbrücke vom Amminproton des Cisplatsins zum 5'-Desoxyguanosylphosphatsauerstoff aus.

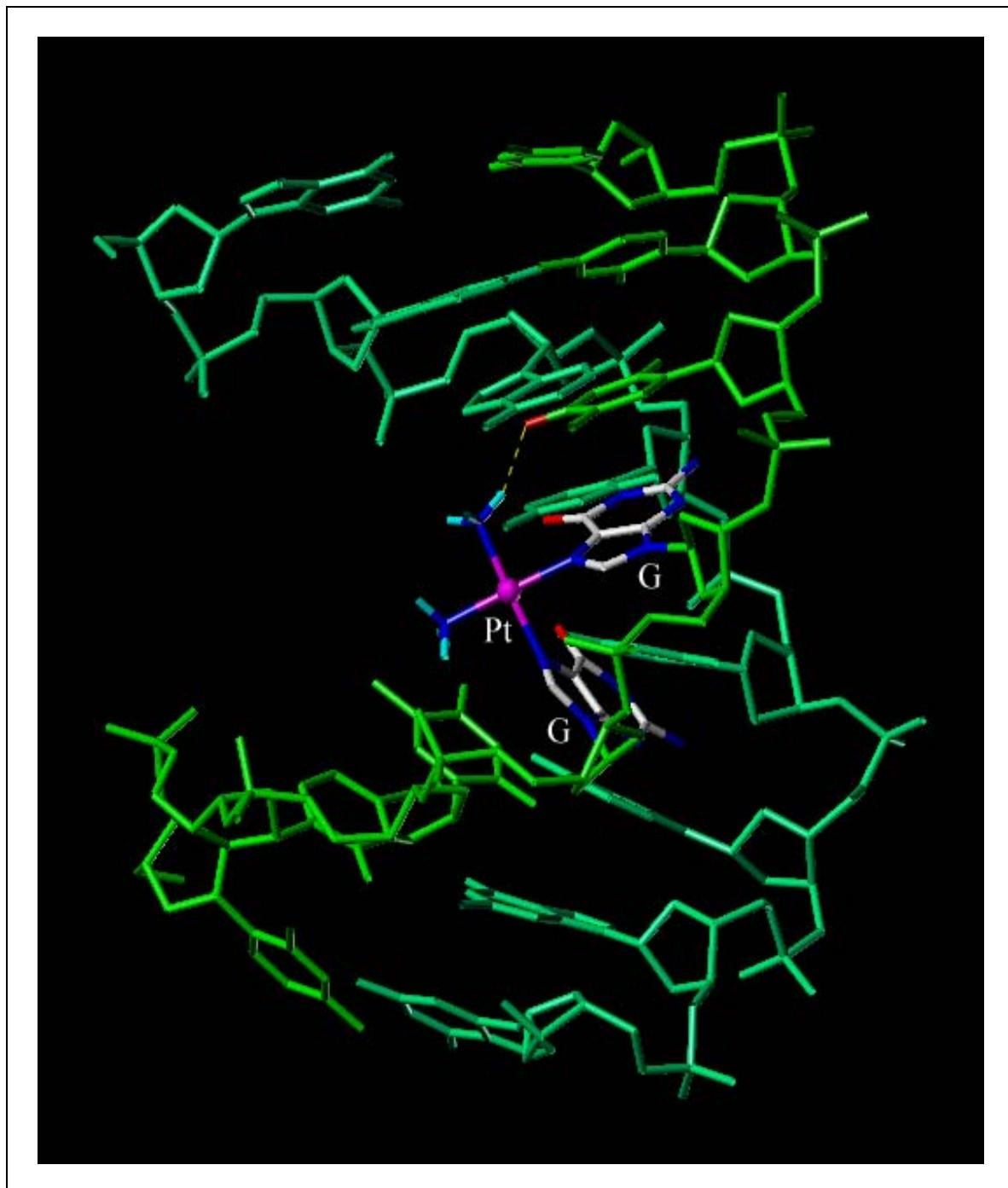


Abbildung 6: d(GpG) Cisplatin-DNA Intrastrand Crosslink. Gelb gestrichelt ist die Wasserstoffbrücke zwischen Phosphatsauerstoff und einem Amminproton. [34]

Damit liegt das Platinatom aufgrund des kleinen Winkels zwischen den beiden Guaninbasen um 1 Å außerhalb der Guaninebene. Zusätzlich bewirkt die Abwinkelung am Knickpunkt eine Konformationsänderung der B-DNA- zur A-DNA-Form hin.^[35]

Nach wie vor ist noch nicht im Detail geklärt, wie Pt-DNA-Addukte den Zelltod auslösen. So ist bekannt, dass Cisplatin bei manchen Zellen Apoptose (programmierter Zelltod) herbeiführen kann.^[24, 36] Außerdem lässt die spezifische Bindung eines chromosomalen Proteins HMG-1 („high mobility group“)^[37] und der struktur-spezifischen Erkennungsproteine SSRP („structure specific recognition proteins“)^[38] an *cis*-Pt(NH₃)₂²⁺-gestörte DNA auf Beeinträchtigung des genetischen Informationstransfers hinsichtlich Hemmung der Transkription essentieller Gene oder fehlerhafter Erkennung und ausbleibender Reparatur schließen.^[37, 39, 40, 41] Die Proteine bilden eine Art Schutzschild über der Platin-DNA-Bindungsstelle, sodass diese von den körpereigenen Reparaturmechanismen für defekte DNA-Stellen nicht erkannt werden.

1.2.5 Pharmakologie und Toxikologie von Cisplatin

Eine Cisplatin-Tumorbehandlung bedeutet eine intravenöse Verabreichung von 50-120 mg/m² Wirkstoff alle 3-4 Wochen.^[20, 42] Eine höhere Dosis im Rahmen einer Cisplatin-Therapie in der klinischen Anwendung ist aufgrund einer Reihe gravierender Nebenwirkungen nicht möglich. So führt Cisplatin zu Beeinträchtigungen des Gastrointestinalbereichs (Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen), Nephrotoxizität (nierenschädigende Wirkung), Ototoxizität (Gehörschädigung), Myelotoxizität (knochenmarkschädigende Wirkung) und peripheren Neuropathien (Schädigung peripherer sensibler Nerven) sowie psychischen Belastungen.^[43] Dosislimitierend ist vor allem die starke Nephrotoxizität, die durch gleichzeitige Infusion einer physiologischen Kochsalzlösung und Mannitol-induzierte Diurese verringert werden kann, weil dadurch die renale Ausscheidung von Platinverbindungen beschleunigt wird.^[30] Übelkeit und Erbrechen, die oft Patienten veranlassten eine weitere Behandlung mit Cisplatin abzulehnen, bekommt man jetzt durch Gabe von Dopamin-Antagonisten

oder 5-Hydroxytryptamin-Antagonisten besser in den Griff.^[44] Trotz dieser Fortschritte verhindern die weiterhin auftretende Neuropathie und Ototoxizität eine höhere Dosierung von Cisplatin und dadurch einen besseren Behandlungserfolg.

Problematisch beim klinischen Einsatz von Platinverbindungen ist auch die auftretende Resistenzentwicklung bei längerer Therapie.^[45]

Neben der intensiven Erforschung des Wirkmechanismus von Cisplatin werden große Anstrengungen unternommen, um Cisplatin-Analoga mit verbesserten Antitumoreigenschaften zu entwickeln, da der klinische Einsatz von Cisplatin durch erhebliche Toxizitäten begrenzt ist. Hervorzuheben hierbei sind die beiden Platinverbindungen Carboplatin^[*] und Oxaliplatin,^[†] die sich bereits in klinischer Anwendung bei Ovarial-, Bronchial-, Zervix-, Kopf- und Halstumoren^[46, 47, 48, 49] sowie bei Kolonkarzinomen^[50] befinden.

Gegenstand der aktuellen Forschung ist die Entwicklung besserer Pt-Zytostatika, die sich vor allem durch eine Erhöhung der Selektivität gegenüber dem Tumorgewebe auszeichnen. Versuche die Selektivität zu steigern, führten z. B. zur Synthese von Pt-Komplexen mit gewebespezifischen Carrier-Liganden, die eine höhere Drug-Konzentration oder eine langsamere Freisetzung im oder um das Tumorgewebe bewirken sollten oder zur Verwendung von Prodrugs. Über entscheidende Fortschritte konnte bis dato noch nicht berichtet werden. Weiterhin versucht man, Pt-Komplexe mit einem breiteren Wirkungsspektrum, anderen Applikationsmöglichkeiten, z. B. oral, und mit Aktivität gegen Cisplatin-resistente Tumoren zu entwickeln. Die Resistenzentwicklung von bestimmten Tumoren, spontan oder nach Cisplatin-Behandlung erlangt, stellt eine große Limitierung dar und gilt daher als besonderer Schwerpunkt bei der Suche nach neuen Pt-Verbindungen.

^{*} *cis*-Diammin(1,1-cyclobutandicarboxylato)platin(II).

[†] (*trans*-R,R-1,2-Diaminocyclohexan)oxalatoplatin(II).

1.3 Photodynamische Tumortherapie (PDT)

1.3.1 Historische Entwicklung

Schon im Altertum haben Menschen in Ägypten, China und Indien versucht, durch Photosensibilisierung mit Pflanzenextrakten Hautkrankheiten wie Schuppenflechte, Vitiligo (eine Pigmentstörung der Haut) und Hautkrebs zu heilen.

Erstmals untersucht wurde der photodynamische Effekt vor circa 100 Jahren, 1900, durch Oscar Raab im Rahmen seiner Dissertation bei Prof. Dr. H. von Tappeiner am Pharmakologischen Institut der Ludwig-Maximilian-Universität in München mit der Thematik „Ueber die Wirkung fluorescierender Stoffe auf Infusorien“.^[51] Der Ausdruck „photodynamisch“ wurde jedoch erst 1904 geprägt, um die beobachteten sauerstoffabhängigen Sensibilisierungsprozesse von anderen photochemisch induzierten Vorgängen abzugrenzen.^[52] Die ersten therapeutischen Versuche mit Eosin als topisch appliziertem Photosensibilisator wurden bereits 1903 bei Patienten mit Hauttumoren im Gesicht durchgeführt.^[53]

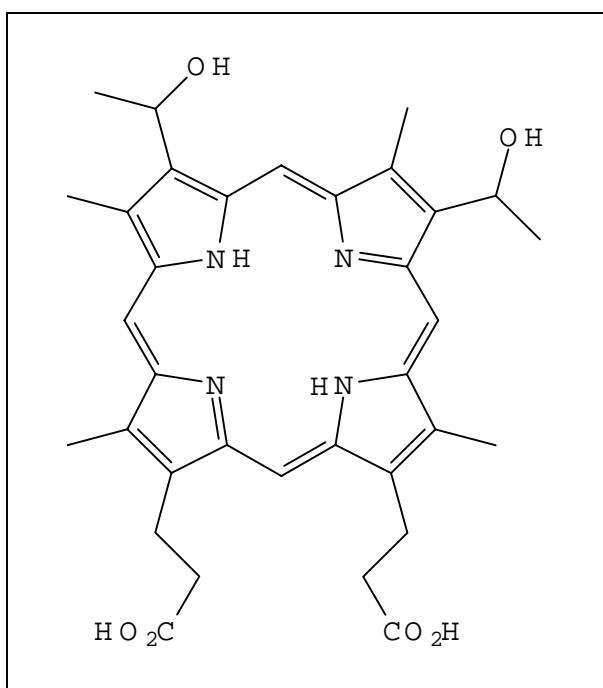


Abbildung 7: Hämatoporphyrin.

Als 1942 berichtet wurde, dass Hämatoporphyrin (Abbildung 7) sich nach intravenöser Injektion selektiv in humanen Tumoren anreichert, konzentrierte sich das Interesse auf porphyrinartige Photosensibilisatoren.^[54] Eine Verbesserung dieser tumorlokalisierenden Eigenschaften wurde von Lipson 1961 mit der Entwicklung des Hämatoporphyrin-Derivats (HpD) durch Behandlung von Hämatoporphyrin mit einer Mischung aus Eisessig und

Schwefelsäure erzielt.^[55] Dougherty et al. führten schließlich ab 1975 die ersten systematischen Studien für den klinischen Einsatz der PDT mit Hämatoporphyrin-Derivat durch.^[56] Dieses HpD ist ein Vorläufer des auch heute noch in der klinischen Praxis verwendeten Photofrin oder Photosan-3.^[57]

1.3.2 Prinzip der photodynamischen Therapie

Der Ablauf der PDT ist durch die Interaktion von Licht, einem photosensibilisierenden Agens – dem Photosensibilisator (PS) – und Sauerstoff geprägt. Das gleichzeitige Zusammentreffen dieser drei Komponenten ist Voraussetzung für eine photodynamische Reaktion. Was die PDT für den Einsatz in der Krebstherapie überhaupt erst sinnvoll macht, ist die unterschiedliche Anreicherung von Photosensibilisatoren in gesundem und krankem Gewebe. Die so erhaltene Sensibilisierungsverteilung bewirkt bei nachfolgender Bestrahlung mit Licht eine bevorzugte Schädigung des Tumors. Zugrunde liegt ein photochemisch induzierter Prozess, der durch die Anregung des Sensibilisatormoleküls ausgelöst wird (Abbildung 8).

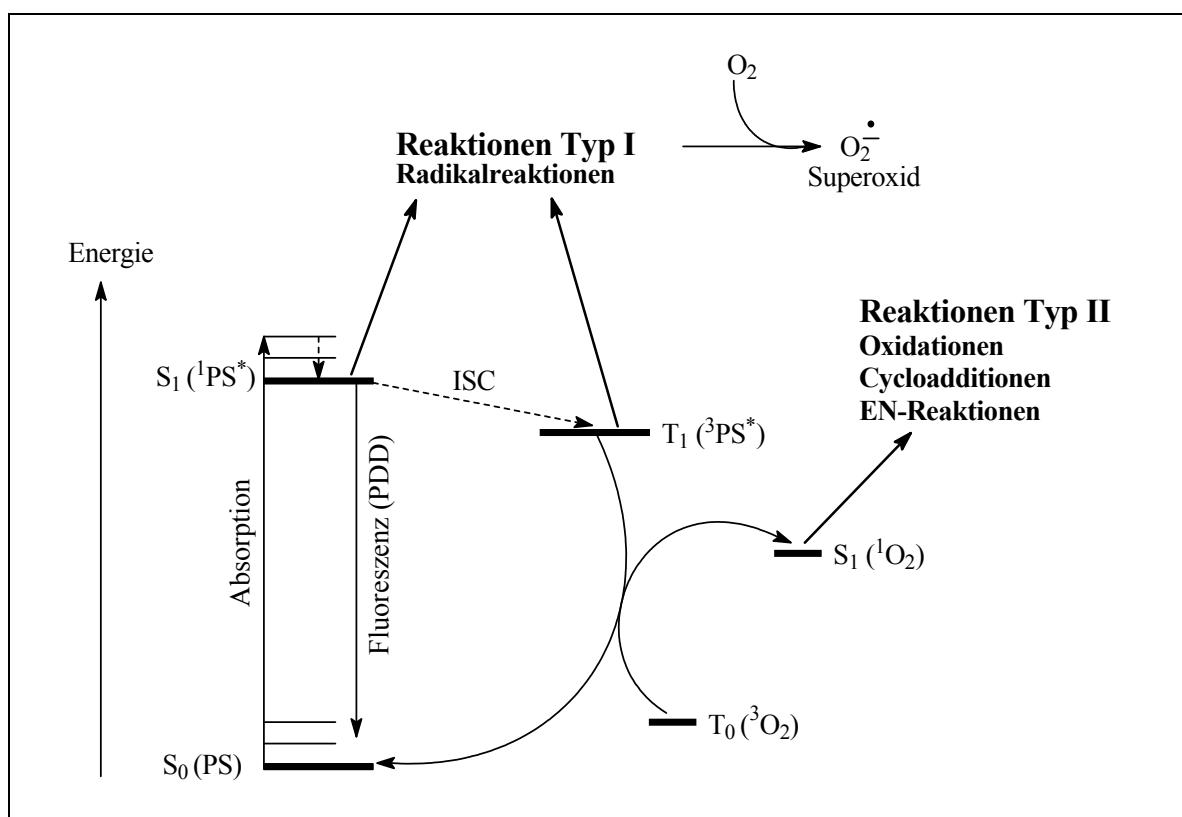


Abbildung 8: Anregung eines Photosensibilisators (PS) und Folgereaktionen.^[58]

Im Detail:

- Durch Absorption von Photonen geht der Photosensibilisator vom Grundzustand S_0 in den angeregten Singulett-Zustand ($^1PS^*$) über und anschließend via Inter-system Crossing (ISC) in den angeregten Triplett-Zustand ($^3PS^*$) (Abbildung 9, Gleichung 1).
- Die nachfolgenden Reaktionen aus dem angeregten Triplett-Zustand ($^3PS^*$) unterteilt man in Typ I- und Typ II-Reaktionen. Typ I-Reaktionen sind Radikalreaktionen oder Elektronentransferreaktionen wie reduktives Quenching mit Biomolekülen (Abbildung 9, Gleichung 2) oder oxidatives Quenching mit Sauerstoff (Abbildung 9, Gleichung 3). Vorherrschend sind allerdings Typ II-Reaktionen, die mit einem spineraubten Triplett-Triplett-Energietransfer vom $^3PS^*$ auf Sauerstoff beginnen, der sich im Triplett-Grundzustand (3O_2) befindet. Diese Reaktion führt zur Bildung von Sauerstoff im angeregten Singulett-Zustand (1O_2) (Abbildung 9, Gleichung 4).^[59]
- Singulett-Sauerstoff geht leicht [2+2]-, [4+2]-Cycloadditionen und EN-Reaktionen ein und wirkt somit als zytotoxisches Agens.^[59, 60] Auf molekularer Ebene sind in biologischen Systemen Aminosäuren, Lipide und Nukleinsäuren die Ziele photosensibilisierter Reaktionen. Methionin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Cystein sind die Aminosäuren, die in freier Form oder in Peptiden stark geschädigt werden. Wenn die Aminosäuren im aktiven Zentrum eines Enzyms lokalisiert sind, können Konformationsänderungen und Enzymaktivierung die Folge sein. Von den Nukleinsäuren ist nur Guanin empfindlich für die Photosensibilisierung.^[61] Im DNA-Molekül führt dies zu Punktmutationen, zu Strangbrüchen und zu Deletionen.^[62] Eine weitere wichtige Reaktion ist die Photooxidation von ungesättigten Fettsäuren, die z. B. in Membransystemen und im Cholesterin vorkommen. Diese Effekte führen zu Veränderungen der Membranpermeabilität.^[63]

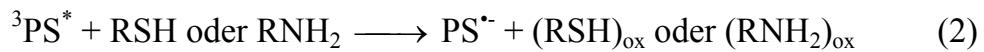


Abbildung 9: Mechanismus der photodynamischen Therapie.

Grundsätzlich hat die PDT auf eine Vielzahl von Zellkomponenten eine schädigende Wirkung.^[64] So wurden unter anderem Veränderungen an Mitochondrien,^[65, 66] Lysosomen,^[67] des Golgi-Apparats,^[68] der Plasma- und ER-Membranen^[69] und der DNA^[61, 70] festgestellt. Welche Zellbestandteile auf die PDT ansprechen, ist von der Art des verwendeten Farbstoffs abhängig. Da verschiedene Photosensibilisatoren sich unterschiedlich in den Zellen lokalisieren und Singulett-Sauerstoff während seiner Lebensdauer weniger als 0,1 µm diffundieren kann, werden dementsprechend auch jeweils andere Zellbestandteile geschädigt.^[63]

1.3.3 Anforderungen an einen Sensibilisator für die PDT

Viele der gegenwärtigen Einschränkungen in der Anwendung der PDT sind auf eine Unzulänglichkeit der verwendeten Photosensibilisatoren zurückzuführen. Die Photosensibilisatoren HpD, Photofrin und Photosan-3 sind chemisch nicht definiert, haben eine geringe Tumorselektivität, eine geringe Absorption im roten Spektralbereich und eine lange Verweildauer im Körper.

Ein idealer Photosensibilisator sollte demnach folgenden Anforderungen entsprechen:^[71]

- Chemisch genau definierte Substanz.
- Keine toxische Wirkung ohne Bestrahlung mit Licht.
- Selektive Anreicherung im erkrankten Gewebe.

- Möglichst topische Applikation oder bei systemischer Applikation kurze Verweildauer im Körper.
- Starke Absorption im roten Wellenlängenbereich des Spektrums.
- Hohe Ausbeute an reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere Singulett-Sauerstoff.

Im Folgenden werden die einzelnen Punkte näher erläutert:

Photosensibilisatoren, wie HpD oder Photofrin, setzen sich aus einer Vielzahl von Komponenten zusammen mit unterschiedlichen photosensibilisierenden und fluoreszierenden Eigenschaften.^[72]

Photosensibilisatoren sollten keine toxische Wirkung auf den Organismus haben, solange nicht durch Licht angeregt wird; sprich, sie sollten eine geringe Dunkeltoxizität aufweisen. Dies ist eine Grundvoraussetzung, um in der PDT gezielte Schädigungen durch lokale Bestrahlung mit Licht auslösen zu können.^[73] Die meisten Photosensibilisatoren erfüllen diese Eigenschaft sehr gut. Weit schwieriger ist es, Photosensibilisatoren zu finden, die sich selektiv anreichern.

Die selektive Anreicherung im Tumorgewebe erlaubt durch großflächige Bestrahlung mehrere multifokal wachsende Tumore gleichzeitig zu behandeln, ohne das dazwischenliegende gesunde Gewebe negativ zu beeinflussen. Diese Eigenschaft macht die PDT zu einer räumlich gezielt einsetzbaren Behandlungsmethode. So sind erste Erfolge, neben der Behandlung von Blasenkarzinomen, auch von malignen Neubildungen der Haut, von Lungen- und gynäkologischen Tumoren sowie Augentumoren zu verzeichnen.^[74] Die Verteilungsraten zwischen Tumorgewebe und normalem Gewebe liegen bei 2:1 bis 10:1, wobei sich diese Bandbreite sowohl durch die Anwendung verschiedener Photosensibilisatoren als auch durch verschiedene Tumorsysteme ergibt.^[64, 74a, 75] Bei Kolonkarzinomen, die durch Dimethylhydrazin in Mäusen induziert wurden, konnte eine deutliche Anreicherung von HpD und eines Phthalocyanin-Derivats (etwa sechsmal höhere Konzentration) im Vergleich zum umgebenden Gewebe beobachtet werden.^[76] Eine Möglichkeit zur Ver-

stärkung dieser Selektivität bietet die gezielte Injektion und Bestrahlung nach dreidimensionaler Erfassung des Tumors.

Eine umfassende Erklärung dieser Anreicherung ist bisher noch nicht gefunden worden. Wichtige Parameter scheinen dabei die Hydrophobie und die Fett/Wasser-Löslichkeit der Substanz zu sein.^[77] Die Tumorselektivität anionischer, porphyrin-verwandter Sensibilisatoren, wie z. B. Photofrin oder Phthalocyanine, dürfte durch spezielle Eigenschaften des Tumorgewebes beeinflusst werden. Eine Retention von proteingebundenen Porphyrinen in den interzellulären Räumen des Tumors wird durch eine hohe vaskuläre Durchlässigkeit und durch eine mangelnde lymphatische Entsorgung bewirkt. Die großen Zwischenräume, der geringe pH-Wert (pH-Theorie der Akkumulation^[78, 79]), die Anwesenheit vieler Makrophagen, eine hohe Dichte an Lipoprotein-Rezeptoren (LDL-Theorie der Akkumulation^[80, 81, 82]) und eine relativ große Menge an neu synthetisiertem Kollagen in Tumoren dürften ebenso von Bedeutung sein.^[83]

Nach der Bestrahlung bzw. Durchführung der Therapie sollte der Photosensibilisator schnell wieder aus dem Körper des Patienten ausgeschieden werden, damit keine länger anhaltende, unkontrollierte Lichtempfindlichkeit auftreten kann. Hautverbrennungen, die auf einen sehr langsamen Rückgang der Photosensibilisatorkonzentration in der Haut hinweisen, sind die häufigsten Komplikationen in der PDT. Patienten mit intravenös verabreichtem HpD mussten für wenigstens zwei Wochen jegliches Sonnenlicht meiden. Ein geringer Teil der Patienten wies bis zu drei Monate lang eine klinisch signifikante Konzentration von HpD in der Haut auf.^[84]

Die Stärke, mit der eine photosensibilisierende Reaktion an einem Ort im Gewebe ausgelöst werden kann, ist von der Konzentration und den Eigenschaften des Sensibilisators sowie der effektiven Lichtdosis an diesem Punkt abhängig. Um eine photochemische Reaktion herbeiführen zu können, muss das Licht, das zur Bestrahlung verwendet wird, einerseits den Photosensibilisator erreichen und andererseits von ihm auch absorbiert werden. Die Lichtausbreitung im biologischen Gewebe wird

von der Absorption durch Pigmente und durch Streuung an Gewebebestandteilen bestimmt. Der Bereich größter Eindringtiefe, das sogenannte *therapeutische Fenster*, liegt zwischen den Infrarot-Absorptionsbanden des Wassers (beginnend bei 925 nm) und der Absorption von Hämoglobin im grünblauen Bereich des sichtbaren Spektrums.^[85] Innerhalb des therapeutischen Fensters wird die Eindringtiefe des Lichts fast ausschließlich durch Streuung bestimmt. Der Streukoeffizient in Gewebe ist umgekehrt proportional zur Wellenlänge, deshalb nimmt die Eindringtiefe des Lichts in Gewebe mit der Wellenlänge zu.^[86] Die Eindringtiefe steigt von typischen Werten um 1 bis 3 mm bei 630 nm auf etwa den doppelten Wert bei 700-850 nm an,^[87] obwohl es Gewebearten mit deutlich größeren oder kleineren Werten gibt.^[64] Um also eine weitreichende Wirkung der Photosensibilisierung zu erreichen, muss man Sensibilisatoren verwenden, die eine starke Lichtabsorption bei möglichst großer Wellenlänge im roten Bereich des Spektrums aufweisen.^[88]

Die Lichtabsorption des Photosensibilisators selbst kann ebenfalls die Eindringtiefe des Lichts in das Gewebe begrenzen. Dieses Phänomen, oft als *Self-Shielding* bezeichnet, ist besonders bei Sensibilisatoren wichtig, die stark bei der Behandlungswellenlänge absorbieren.^[64, 87]

1.3.4 Medizinische Anwendung der PDT – neue Photosensibilatoren

In den letzten Jahren gewann die PDT zunehmend an Bedeutung. Obwohl sich die meisten klinischen Studien noch in der experimentellen Phase befinden (Phase I bis Phase III der klinischen Prüfung), findet die photodynamische Behandlung bei Patienten mit den verschiedensten Tumoren eine immer breitere Anwendung. Die aktuelle Forschung selbst ist auf der Suche nach neuen Photosensibilisatoren, wobei besonderes Augenmerk auf der Entwicklung langwellig absorbierender Porphyrinderivate liegt. Phthalocyanine (Pc) und Naphthalocyanine (Nc) haben Eigenschaften, die diese Verbindungen für die PDT besonders attraktiv machen.^[89, 90] Diese Verbindungen besitzen geeignete Absorptionsmaxima (Pc: $\lambda = 660\text{-}740\text{ nm}$;

Nc: $\lambda = 759\text{-}830\text{ nm}$), sodass therapeutisches Licht 2-3 cm in das Gewebe eindringen kann. Zudem zeichnen sich diese Photosensibilisatoren durch eine große Variationsbreite an Substituenten und Zentralmetallionen, eine geringe Dunkeltoxizität sowie gute Tumorlokalisierung und gute photodynamische Aktivität aus. Weitere neu entwickelte Photosensibilisatoren sind Chlorine,^[91] Tetraphenylporphyrine,^[92] Benzoporphyrin-Derivate,^[93] Purpurine^[94] und Pheophorbide^[95] sowie deren Metallkomplexe.^[96]

Neben der Tumorbehandlung ist durch die Entwicklung besserer Photosensibilisatoren auch die Erkennung und die Bestimmung der Ausdehnung von Tumoren möglich. Für die photodynamische Diagnostik (PDD) von Tumoren, insbesondere von gastrointestinalen Präkanzerosen, befindet sich derzeit 5-Aminolävulinsäure (ALA) im Zulassungsverfahren. ALA ist ein biologischer Baustein von Protoporphyrin IX. Nach Applikation von ALA kommt es zu einer bevorzugten Bildung von Protoporphyrin IX in tumorösen Geweben. Nach dessen Biosynthese im Tumorgewebe kann durch Bestrahlung über die auftretende Fluoreszenz das Ausmaß des Tumors genau lokalisiert werden.^[97]

2 Kapitel

Zielsetzung

Grundgedanke der vorliegenden Arbeit ist es, in **einer** Substanz zwei Therapieansätze für die Behandlung von Harnblasenkarzinomen, die zytostatische Therapie und die photodynamische Therapie, miteinander zu verbinden. Mit den am Lehrstuhl von Prof. Dr. H. Brunner synthetisierten Porphyrin-Platin(II)-Komplexen wird versucht, den zytostatischen Effekt des Cisplats mit der photodynamischen Aktivität des Porphyringerüsts zu kombinieren. Damit soll im Sinne des „drug targeting“-Konzepts der normalerweise unselektiv wirkende Arzneistoff Cisplatin, welcher seit Jahren erfolgreich klinisch in der Standardchemotherapie bei der Bekämpfung von Harnblasenkarzinomen eingesetzt wird, so modifiziert werden, dass er durch die Carrier-Eigenschaft der Porphyrine selektiv im Tumorgewebe angereichert wird und dort seine volle Wirkung entfalten kann. Anders herum erhofft man sich, dass im Rahmen der photodynamischen Behandlung durch Hinzunahme der Wirkung der Platinkomponente auch tiefer liegendes Tumorgewebe, das durch therapeutisches Licht (Wellenlängenbereich etwa 600 bis 850 nm) aufgrund der limitierten Ein- dringtiefe in biologisches Gewebe nicht erreicht wird, geschädigt wird.

Bei der Substanzentwicklung stellen nicht nur die oftmals sehr komplizierten Synthesen der Komplexe einen wesentlichen Punkt dar, sondern auch die Ausarbeitung

aussagekräftiger Testmodelle, die reproduzierbare Ergebnisse liefern, ist von entscheidender Bedeutung.

Im Rahmen von präklinischen Studien soll in der vorliegenden Arbeit die Eignung von wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexen hinsichtlich ihrer photodynamischen und zytostatischen Effektivität untersucht werden. Darüber hinaus, insbesondere in Hinblick auf einen späteren klinischen Einsatz, sollen grundlegende zelluläre Wirkmechanismen analysiert werden. Dabei sollen Untersuchungen zur Dunkeltoxizität, PDT-Wirkung, zellulären Aufnahme, intrazellulären Lokalisation und zum Verhalten in 3-D-Zellaggregaten erfolgen. Die Experimente werden an der J82-Zelllinie, einem Modell eines gering differenzierten invasiven Urothelkarzinoms, *in vitro* durchgeführt. Neben der gering differenzierten Tumorzelllinie werden normale urotheliale Zellen, die UROtsa-Zelllinie, verwendet.

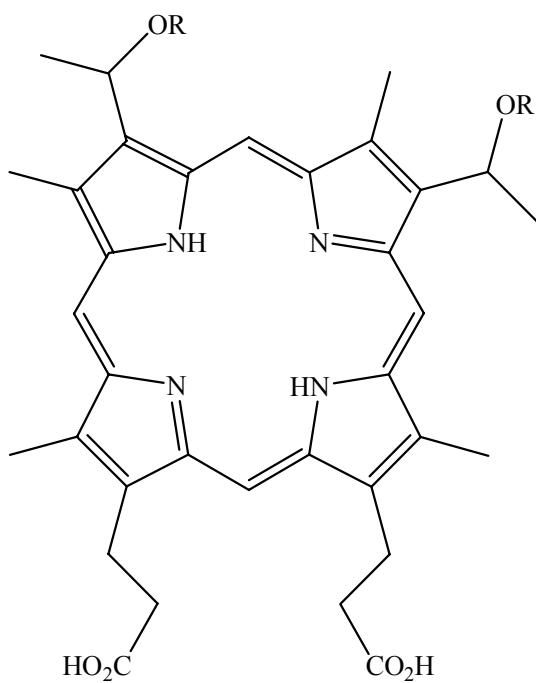
Der Nachteil der bisher synthetisierten, von Hämin abgeleiteten Porphyrin-Platin(II)-Komplexe war ihre meist schlechte Löslichkeit. Durch Einführung funktionalisierter Seitenketten auf der Basis von Polyethylenglykolmonomethylethern in den Naturstoff Hämin konnte vor allem die Wasserlöslichkeit von Porphyrin-Platin(II)-Komplexen erreicht werden. Die wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexe sind von K.-C. Bart^[98] synthetisierte und charakterisierte Verbindungen und zeigten sich in ersten pharmakologischen Tests an der TCC-SUP-Zelllinie viel-versprechend.^[99]

Als Substanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht:

- 7,12-Bis[1-(polyethylenglykol-750-monomethylether-1-yl)ethyl]-3,8,13,17-tetramethylporphyrin-2,18-dipropionsäure (**L**).
- Diammin{7,12-bis[1-(polyethylenglykol-750-monomethylether-1-yl)ethyl]-3,8,13,17-tetramethylporphyrin-2,18-dipropionato}platin(II) (**K1**).
- (\pm)-*trans*-1,2-Diaminocyclohexan{7,12-bis[1-(polyethylenglykol-750-monomethylether-1-yl)ethyl]-3,8,13,17-tetramethylporphyrin-2,18-dipropionato}platin(II) (**K2**).

Der den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen entsprechende Ligand **L** wird in den Zellkulturexperimenten als Vergleichssubstanz mitgetestet, um etwaige toxische Eigenschaften beobachten zu können oder Unterschiede zu den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen im Hinblick auf zelluläre Akkumulation, intrazelluläre Lokalisation usw. sichtbar zu machen.

In Abbildung 10 und Abbildung 11 sind die Strukturformeln von **L**, **K1** und **K2** wiedergegeben mit $R = (CH_2CH_2O)_{\sim 17}CH_3$:



L

Abbildung 10: Strukturformel von **L** mit $R = (CH_2CH_2O)_{\sim 17}CH_3$.

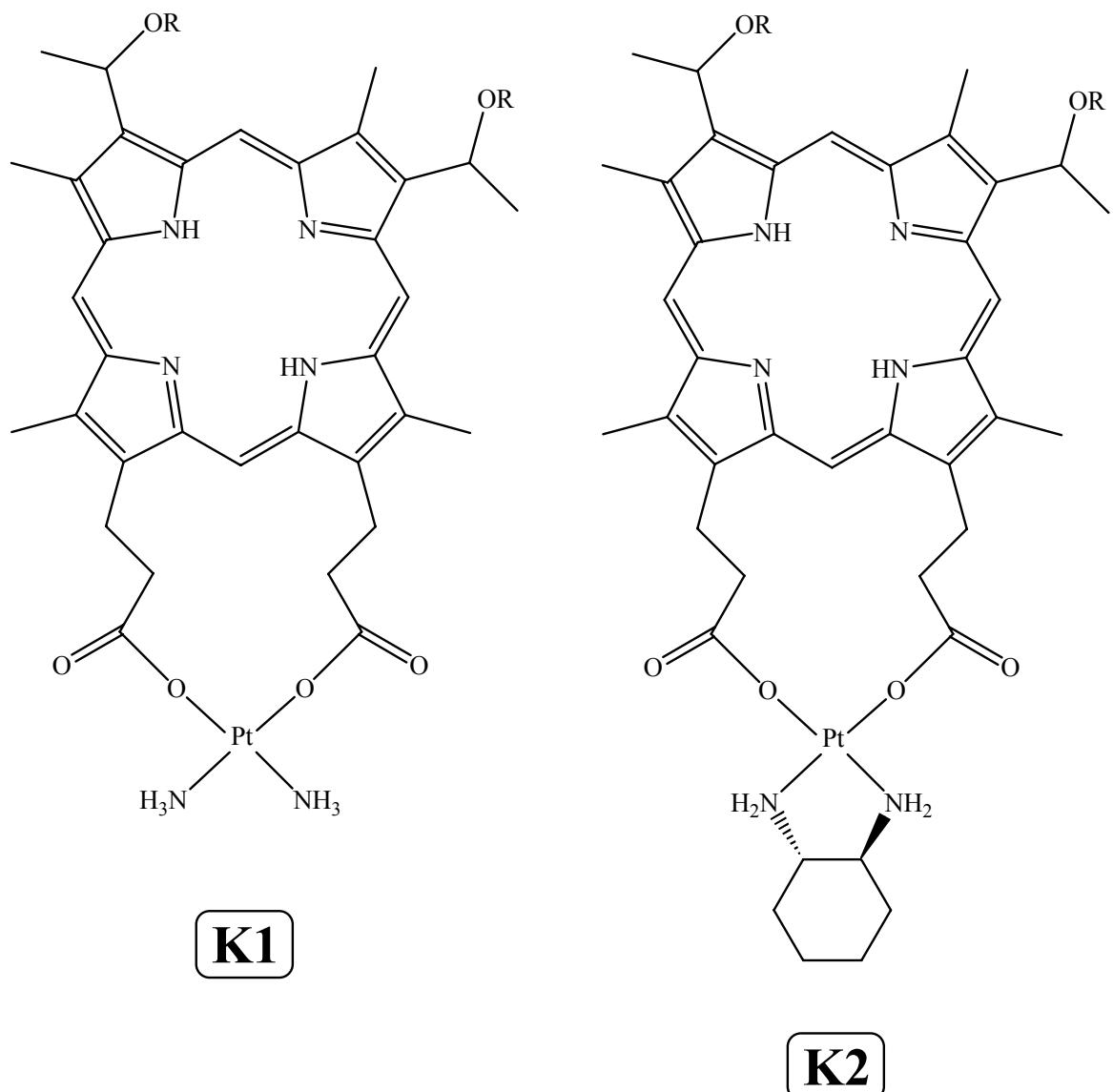


Abbildung 11: Strukturformeln von **K1** und **K2** mit $R = (CH_2CH_2O)_{17}CH_3$.

Zusätzlich zu den wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexen **K1** und **K2** wurden in der vorliegenden Arbeit auch die synthetisch leichter zugänglichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexe mit R = (CH₂CH₂O)₂CH₃ untersucht, auf die genauer in Kapitel 5 eingegangen wird.

Entsprechend ist R = (CH₂CH₂O)₂CH₃:

- 7,12-Bis[1-(1,4,7-trioxaoctyl)ethyl]-3,8,13,17-tetramethylporphyrin-2,18-dipropionsäure (**L_a**)
- Diammin{7,12-bis[1-(1,4,7-trioxaoctyl)ethyl]-3,8,13,17-tetramethylporphyrin-2,18-dipropionato}platin(II) (**K1a**)
- (\pm)-*trans*-1,2-Diaminocyclohexan{7,12-bis[1-(1,4,7-trioxaoctyl)ethyl]-3,8,13,17-tetramethylporphyrin-2,18-dipropionato}platin(II) (**K2a**)

3 Kapitel

Material und Methoden

3.1 Etablierung und Charakterisierung der verwendeten Tumorzelllinien

3.1.1 Das Seed-Stock-Konzept

Bei der Suche nach neuen Wirkstoffen mit Hilfe der Zellkulturtechnik liegt ein Problem in der extremen genetischen Variabilität der Tumorzellen.^[100] Durch das häufige Passagieren der Zellen wird ein starker Selektionsdruck auf die Tumorzellen ausgeübt. Dies kann schließlich zur Entstehung von Subklonen führen. Die Subklone können sich sowohl genotypisch als auch phänotypisch sehr stark von ihren Mutterzellen unterscheiden, was auf Versuche mit solchen Zellen großen Einfluss haben kann.^[101] Um bei Veränderungen der Zelllinien jederzeit auf definiertes Ausgangsmaterial zurückgreifen zu können, wurde eine Tumorbank nach dem Seed-Stock-Konzept angelegt.^[102]

Dazu wurden die Zelllinien in niedrigen Passagen vermehrt und anschließend in Ampullen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Man hat somit die Möglichkeit, wenn beispielsweise die Zellkultur aufgrund einer Kontamination mit Pilzen, Bakterien oder Mykoplasmiden unbrauchbar wird, die gelagerten Zellen wieder aufzutauen und

zu kultivieren. Von fundamentaler Bedeutung ist somit eine fortlaufende Kontrolle der verwendeten Zellkulturen, welche neben mikrobiologischen Routinetests auch morphologische, zytochemische, zytogenetische (Chromosomenzählung) und biochemische Untersuchungen beinhaltet.

3.1.2 Verwendete Zelllinien

Die Zelllinien J82 (ATCC HTB-1)^[103] und UROtsa^[104] (Abbildung 12) sind Bestandteil einer Tumorbank des Lehrstuhls für Pathologie, Prof. Dr. F. Hofstädter, die nach dem Seed-Stock-Konzept angelegt wurde. Dazu werden diese Zelllinien in möglichst frühen Passagen eingefroren. Die Zelllinie J82 wurde von einem gering differenzierten invasiven Urothelkarzinom vom Grad G3 abgeleitet. Etabliert wurde sie von einem 58-jährigen kaukasischen Mann, der an einem Urothelkarzinom (TCC) litt. Die Zellen sind in ihrem Wachstum nicht kontaktinhibiert und besitzen ein spindelförmiges Aussehen. Als Phänotyp normalen urothelialen Gewebes wurde die Zelllinie UROtsa verwendet, deren Zellen eine tropfenförmige Morphologie besitzen. UROtsa-Zellen wurden aus normalem Urothel gewonnen und durch ein SV 40 T-Antigen-Genkonstrukt immortalisiert.

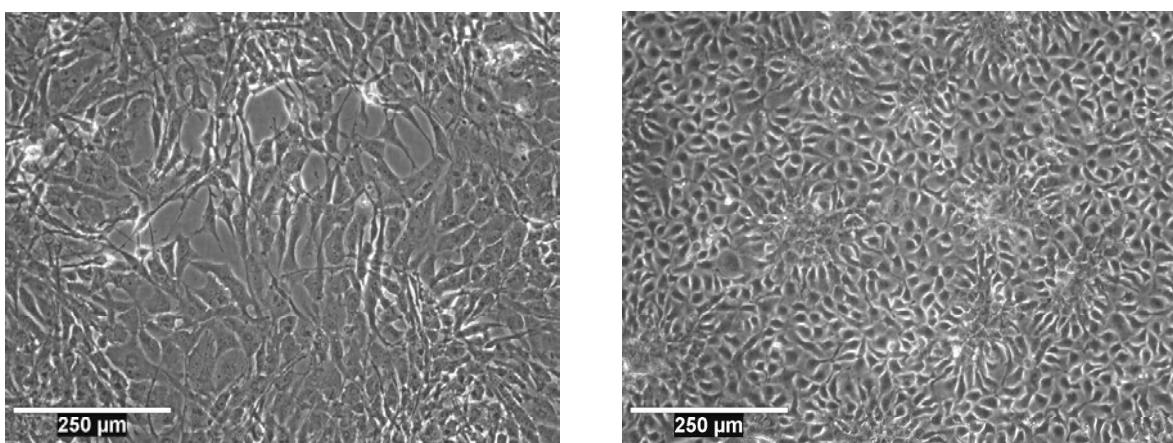


Abbildung 12: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von J82-Zellen (links) und UROtsa-Zellen (rechts).

3.1.3 Kultivierung der Zelllinien

Beide verwendeten Zelllinien wurden in 75 cm²-Gewebekulturflaschen (T75) als „Monolayer“ kultiviert und dreimal wöchentlich mit frischem Medium (EMEM mit 5 % FCS, 1 % L-Glutamin (v/v), 1 % Natriumpyruvat (v/v)) versorgt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Zur Weiterkultivierung und zur Aussaat für Versuche wurden die Zellen mit 0,1 % Trypsin/0,4 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in PBS („phosphate buffered saline“) vom Boden der Kulturflaschen gelöst, zentrifugiert, in frischem Medium oder PBS resuspendiert und in definierter Zellzahl in das entsprechende Kulturgefäß gegeben (Tabelle 1). Die Passage der Zellen wurde einmal wöchentlich durchgeführt. Für sämtliche Versuche wurden die Zellen im postkonfluenten Wachstumszustand verwendet.

Tabelle 1: Aussaatzahlen ($\cdot 10^6$) bei 8 Tagen Wachstumszeit.

Zelllinie/Kulturgefäß	T75	6 Well	PetriPERM	pro cm ²
J82	0,42	0,056	0,112	0,0056
UROtsa	0,60	0,080	0,160	0,0080

3.1.4 Zellzahlbestimmung und Volumenmessung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wurden die Zellen von der Kulturflasche gelöst und in PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde mit PBS in der Weise verdünnt, dass in den Gruppenquadranten der Neubauer-Zählkammer 50 bis 60 Zellen vorhanden waren. Anschließend wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt. Mit dem bekannten Volumenwert über einem Gruppenquadrat und der gemittelten gezählten Zellzahl in einem Grup-

penquadrat der Neubauer-Zählkammer konnte die Anzahl Zellen pro ml bestimmt werden.^[105]

Um eine Volumennormierung der Messwerte bei der Fluoreszenzspektroskopie und der Atomabsorptionsspektroskopie vornehmen zu können, wurde das Zellvolumen mit Hilfe eines Pulsfächenanalysegeräts (CASY 1) bestimmt. Grundlage der Volumenmessung ist die Widerstandsmessung der Zellen beim Durchtritt durch eine Kapillare ($\varnothing = 150 \mu\text{m}$) mit äußerlich anliegendem elektrischen Feld.^[106] Der hierbei gemessene Widerstand ist proportional der Querschnittsfläche der Zelle. Durch eine sehr hohe Abtastung (MHz-Bereich) wird jede Zelle virtuell in sehr viele Scheiben mit bekanntem Flächeninhalt zerlegt. Daraus wird durch Auswertealgorithmen das Zellvolumen ermittelt. Abschließend wird aus der erhaltenen Häufigkeitsverteilung der Volumina das mittlere Volumen bestimmt. Mit den in Suspension vorliegenden Zellen (ca. $2 \cdot 10^4/\text{ml}$) wurden vom Gerät drei Messungen durchgeführt (mit $400 \mu\text{l}$ Aliquots) und automatisch gemittelt. Um osmotische Effekte zu umgehen, wurden die Zellen unmittelbar nach dem Abtrypsinieren vermessen.

3.1.5 Chromosomenpräparation

3.1.5.1 Vorbehandlung der Objektträger

Damit zytologische Untersuchungen auf Objektträgern durchgeführt werden konnten, mussten die Objektträger zuvor nach der Methode von Rooney und Czepulkowsky (1986)^[107] 24 Stunden lang in ethanolischem Salzlösung (6 ml konz. HCl + 200 ml 70 %iges Ethanol) entfettet werden. Die entfetteten Objektträger wurden anschließend zehnmal mit Millipore-Wasser gespült und getrocknet.

Zum Kultivieren von Zellen auf den Objektträgern mussten diese noch autoklaviert werden. Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgte unter sterilen Bedingungen.

3.1.5.2 Fixierung und Färbung der Chromosomen

J82- und UROtsa-Zellen wurden auf den sterilen, entfetteten Objektträgern in Quadriperm 4-Well-Lux-Multiplates angezüchtet und bis zu einer Konfluenz von 30-50 % kultiviert. Die kondensierten Chromosomen wurden in der Metaphase durch Zugabe des Spindelgifts Colcemid arretiert. Dazu wurde die Colcemid-Lösung in einer Endkonzentration von 0,04 µg/ml dem Medium in den Objektträgerkammern steril zugegeben. Danach wurden die Kulturen 3 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt und zur Lyse der Zellen durch eine 37 °C warme hypotone KCl-Lösung (75 mM) für 30 Minuten ersetzt. Anschließend wurde die gleiche Menge eiskalten, frisch bereiteten Fixativs (Methanol/Eisessig; 3/1; v/v) zugeführt. Diese Mischung wurde sofort vorsichtig abgesaugt und zweimal durch eiskaltes, frisches Fixativ ersetzt, das jeweils nach 10 Minuten entfernt wurde. Schließlich wurden die Objektträger aus den Kammern genommen, beschriftet und getrocknet. Die Chromosomen wurden zur Färbung für 8 Minuten mit einer Färbelösung aus 20 ml Giemsa-Stammlösung und 180 ml 0,025 M KH₂PO₄ (pH 6,8), welche zuvor durch ein Faltenfilter filtriert wurde, versetzt. Anschließend wurden die Objektträger mit entionisiertem Wasser gründlich gewaschen, getrocknet und mit DePex eingedeckelt.

3.1.5.3 Chromosomenzählung

Die Chromosomen von 50 gut ausgebreiteten Metaphasenplatten wurde mit Hilfe eines Olympus BH-2 Mikroskops mit einem 60x bzw. 100x SplanApo-Objektiv (Öl) bestimmt.

3.2 Bestrahlung von 96-Loch-Mikrotiterplatten

Für die Bestrahlung der 96-Loch-Mikrotiterplatten-Kulturen diente eine Waldmann PDT 700-Lampe als Lichtquelle. Die Waldmann PDT 700-Lampe besteht aus einer Metallhalogenlampe und dichroitischen Kantenfiltern und sendet somit inkoheräntes Licht im Wellenlängenbereich von 600 bis 730 nm aus.

Um jedes einzelne Mikrotiterloch mit derselben Lichtintensität zu bestrahlen, wurden die Mikrotiterplatten in eine schwarzlackierte 96-Loch-Aluminiumschablone gesetzt, wobei die gestanzten Löcher der Aluminiumschablone genau mit den 96 Löchern der Mikrotiterplatte fluchten. Damit wurden auch Streuungseffekte innerhalb der Mikrotiterplatte durch seitlich einfallendes Licht minimiert. Die Bestrahlung dieser Einheit mit der Waldmann PDT 700-Lampe erfolgte von unten, um weitere Streuungseffekte zu verhindern. Zusätzlich konnte so gewährleistet werden, dass jedes Loch mit derselben Lichtintensität bestrahlt wurde. Bestrahlt wurde in einem Abstand von 50 cm zwischen dem Lampenauslass und der Unterkante Mikrotiterplatte, was eine gemessene Leistungsdichte von etwa 40 mW/cm^2 an der Position der Zellen ergab. Bei einer 10-minütigen Bestrahlungszeit bedeutete dies eine Energiedichte von 24 J/cm^2 .^[108]

3.3 Chemosensitivitätstest

3.3.1 Dunklexperiment

Um *in vitro* das Ansprechverhalten von Zelllinien gegenüber verschiedenen Chemothapeutika zu testen, wurde das von Reile^[109] optimierte Verfahren verwendet.

Dazu wurden je 2 vertikale Reihen (16 Löcher) der 96-Loch-Platten für eine Testsubstanz vorgesehen. Als Kontrollkulturen erhielten die Reihen 5 und 6 jeder Platte nur das jeweilige Lösungsmittel der Testsubstanzen in frischem Medium. Um das Zellwachstum zu unterschiedlichen Zeitpunkten stoppen zu können, wurden die Platten in 5facher Ausfertigung präpariert. Eine zusätzliche Platte diente zur Bestimmung der initialen Zelldichte zum Zeitpunkt der Substanzzugabe t_0 .

3.3.1.1 Aussäen der Zellkulturen

Die Zellen einer konfluenten Kultur wurden mit Trypsin/EDTA vom Boden abgelöst und in der benötigten Menge Medium suspendiert. Die Zellsuspension wurde während der Aussaat ständig durch einen Rührfisch leicht bewegt, um sie möglichst homogen zu halten. Mit einer 12-Kanal-Pipette wurden 100 μ l der Zellsuspension in jedes Loch der 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Die Konzentration der Zellsuspension wurde so gewählt, dass im Gesichtsfeld des Umkehrmikroskops bei 320facher Vergrößerung ca. 15 Zellen zu sehen waren. Die beschickten Mikrotiterplatten wurden umgehend in den Inkubator gestellt und bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert.

3.3.1.2 Herstellung und Lagerung der Wirkstofflösungen

Die Stammlösungen der in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Zytostatika wurden in Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-2}$ M und 10^{-2} M mit 70 % Ethanol als Lösungsmittel bei -20 °C gelagert. Für den Porphyrin-liganden **L** und für die Porphyrin-Platin(II)-

Komplexe **K1** und **K2** wurde steriles H₂O dest., für **La**, **K1a**, **K2a**, Cisplatin und Hämatoporphyrin wurde DMF als Lösungsmittel verwendet.

3.3.1.3 Substanzzugabe

Nach 2-3 Tagen, je nach Wachstumsverhalten der Zellen, erfolgte die Substanzzugabe. Dazu wurde das alte Medium vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und gegen testsubstanzhaltiges Kulturmedium (200 µl/Loch) ersetzt. Die Testsubstanzen wurden dem Medium unmittelbar vor Gebrauch als 1000fach konzentrierte Stammlösung zugegeben. Für die Kontrollreihen wurde Medium, nur mit dem jeweiligen Lösungsmittel der Testsubstanzen vermischt, verwendet. Nach der Substanzzugabe wurden die Kulturplatten in den Brutschrank zurückgestellt und weiter inkubiert.

Auf der Platte zur Bestimmung der initialen Zelldichte t_0 wurde das Medium ebenfalls mit einer Pasteurpipette abgesaugt, um die dadurch entstehenden Zellverluste zu berücksichtigen, und mit Glutardialdehyd fixiert.

Neben Dauerexpositionen wurden auch Vorinkubationsexperimente und Kurzzeitexperimente durchgeführt.

Bei den Vorinkubationsexperimenten wurden die Testsubstanzen unterschiedlich lange (0 h, 2 h, 6 h, 12 h und 24 h) mit Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre vorinkubiert. Erst dann erfolgte die Substanzzugabe zu den Zellen. Hierbei wurde das alte Medium abgesaugt und durch das neue, wirkstoffhaltige und vorinkubierte Medium ersetzt. Für die restliche Inkubationsdauer wurde kein weiterer Mediumwechsel mehr vorgenommen.

Bei den Kurzzeitexperimenten wurden die Substanzen verschieden lange (3 h, 6 h, 12 h, 24 h und Dauerinkubation) auf den Zellen belassen, bevor das Medium vorsichtig abgesaugt und durch neues, testsubstanzfreies Medium ersetzt wurde. Mit den t_0 -Platten wurde ebenfalls so verfahren, bevor sie abgestoppt wurden.

3.3.2 Chemosensitivitätstest mit und ohne Bestrahlung

Das Aussäen der Zellkulturen, die Herstellung und Lagerung der Wirkstofflösungen und die Substanzzugabe erfolgten in Analogie zu Kapitel 3.3.1. Für die Bestrahlungsexperimente wurde kein weiterer Mediumwechsel mehr durchgeführt.

24 Stunden nach der Substanzzugabe erfolgte die 10-minütige Bestrahlung mit einer Energiedichte von 24 J/cm^2 (siehe Kapitel 3.2). Die 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden nach der Bestrahlung in den Inkubator zurückgestellt und bei 37°C , 5 % CO_2 und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert. Sofort nach der Bestrahlung wurde der erste Zeitpunkt dieser Zellkulturexperimente genommen. Die weiteren folgten in 24-stündigen Abständen.

Parallel zu den Bestrahlungsversuchen wurden immer unbestrahlte 96-Loch-Mikrotiterplatten mitgeführt. Mit Ausnahme der Bestrahlung wurden diese sogenannten Dunkelkontrollen gleich behandelt.

3.3.3 Ermittlung der Zellmasse mit dem Kristallviolett-Assay

Zur Ermittlung der Zellmasse wurde der von Reile^[109] und Bernhardt^[110a] entwickelte Kristallviolett-Assay verwendet.

3.3.3.1 Fixieren der Zellen

Nach verschiedenen Zeitpunkten – idealerweise in Abständen von etwa 24 Stunden – wurde je ein Satz Kulturplatten aus dem Brutschrank entnommen, das Medium abgegossen und zur Fixierung der am Boden haftenden Zellen pro Loch mit $100 \mu\text{l}$ einer frisch bereiteten 1 %igen Glutardialdehyd-Lösung in PBS versetzt. Nach 25-30 Minuten wurde das Fixativ abgeschüttet und durch $180 \mu\text{l}$ PBS-Lösung ersetzt.

Die Platten wurden bis zur Färbung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

3.3.3.2 Kolorimetrische Messung der Zelldichte

Die Färbeprozess erfolgte simultan für alle Kulturplatten eines Versuchs. Hierfür wurde PBS gegen 100 µl einer 0,02 %igen Kristallviolett-Lösung (N-Hexamethyl-*para*-rosanilin · HCl in Wasser) ausgetauscht. Nach exakt 20 Minuten wurde die Färbelösung abgeschüttet. Die Platten wurden zur Entfernung überschüssigen Farbstoffs dreimal mit demineralisiertem Wasser gewaschen und 20 Minuten gewässert. Das Wasser wurde abgeklopft und die Platten wurden auf Zellstoff vorsichtig trocken geklopft.

Um bei der nachfolgenden photometrischen Messung Streulichteffekte zu vermeiden, wurde der in den Zellen vor allem an Nukleoproteine gebundene Farbstoff durch Zugabe von 180 µl 70 %igem Ethanol und durch anschließendes Schütteln auf einem Köttermann 4010-Schüttler (2-3 h) möglichst quantitativ in Lösung gebracht.

Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines UV/Vis-Spektrometers für Mikrotiterplatten (Bio-Tek Instruments) bei $\lambda = 578$ nm gemessen und nach Übertragung der Daten auf einem Olivetti M24 PC auf Diskette gespeichert.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe eines hierfür entwickelten Rechenprogramms.^[109, 110b] Nach Leerwertkorrektur der einzelnen Extinktionen wurde von korrespondierenden Messwerten die mittlere optische Dichte und die Standardabweichung errechnet. Werte außerhalb des Konfidenzintervalls (95 %) wurden aus dem Messwertkollektiv entfernt. Anschließend erfolgte erneut die Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung.

3.4 Fluoreszenzspektroskopie

3.4.1 Molekülphysikalische Grundlagen

Die Wechselwirkung von Farbstoffmolekülen wie Photosensibilisatoren mit Licht wird durch die Molekülphysik beschrieben. Die aus der Quantentheorie abgeleiteten Energiezustände der Moleküle werden in einem Energieschema (Jablonski-Diagramm, Abbildung 13) dargestellt. Anders als bei Atomen, bei denen man nur von „erlaubten“ und „verbotenen“ Übergängen spricht, gibt es bei Molekülen alle Zwischenstufen zwischen erlaubten und verbotenen Übergängen. Die Übergangswahrscheinlichkeiten werden durch die elektronische Struktur von Ausgangs- und Endzustand bestimmt.

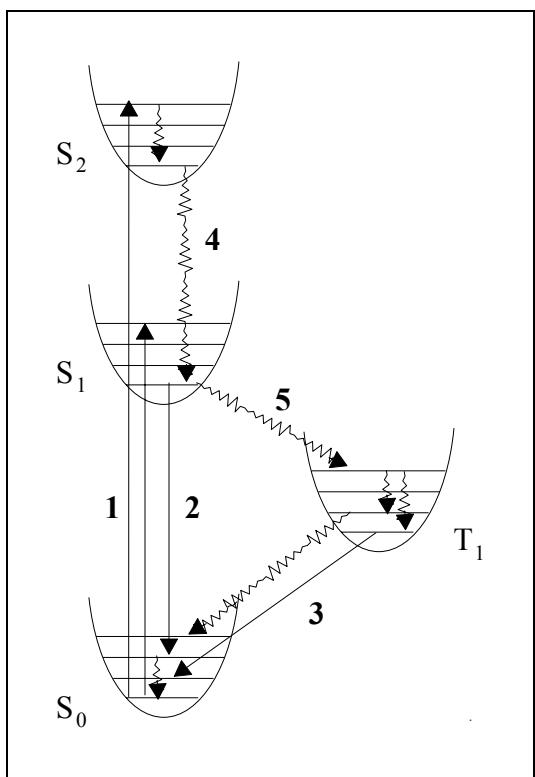


Abbildung 13: Jablonski-Termschema;

- 1: Absorption;
- 2: Fluoreszenz;
- 3: Phosphoreszenz;
- 4: Relaxation (strahlungsfrei);
- 5: Intersystem Crossing (strahlungsfrei).

Der Grundzustand der meisten Moleküle ist ein Singulett-Zustand (S_0). Aus diesem Singulett-Zustand, in dem alle Elektronen gepaart sind, wird das Molekül durch Absorption eines Photons in einen angeregten Zustand versetzt. Dabei geht ein Elektron in ein unbesetztes Molekülorbital über und kann nun mit seinem Spin parallel oder antiparallel zu dem Spin des zurückgebliebenen Elektrons vorliegen. Das angeregte Elektronsystem hat bei antiparalleler Ausrichtung den Gesamtspin $S = 0$ mit nur einem magnetischen Unterzustand (Singulett-Zustand S_1, S_2, \dots). Ein Triplet-Zustand (T) mit drei magnetischen Un-

terzuständen liegt im Fall der parallelen Ausrichtung, $S = 1$, vor. Der angeregte Triplet-Zustand ist meist energetisch tiefer als der angeregte Singulett-Zustand. Jedes elektronische Energieniveau kann weiterhin in mehreren Vibrations- und Rotationsunterzuständen vorliegen. Elektromagnetische Übergänge zwischen zwei Zuständen unterliegen quantenmechanischen Auswahlregeln.^[111]

Als Fluoreszenz bezeichnet man strahlende Übergänge aus den Schwingungsniveaus (gewöhnlich dem niedrigsten) eines (gewöhnlich des ersten) elektronischen Anregungszustands (S_1) in die Schwingungsniveaus des Grundzustands (S_0) (Abbildung 13). Die Fluoreszenz erfolgt bei Quantenenergien, die kleiner oder höchstens gleich sind wie diejenigen der Absorption.

3.4.2 Spektrale Eigenschaften

Porphyrine zeigen ausgeprägte Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften im sichtbaren Wellenlängenbereich des Spektrums. Das Absorptionsmaximum von **K1** liegt bei ca. 400 nm, die sogenannte Soretbande. Des Weiteren besitzen die Porphyrinverbindungen vier zusätzliche Absorptionsbanden zwischen 450 und 650 nm. Allgemein gilt für Porphyrinderivate, dass die genaue Lage und relative Intensität der Absorptionsmaxima von der Art der Seitenketten, der Konzentration des Porphyrins und den Eigenschaften des Mediums abhängen, in dem das Molekül gelöst ist. Bei einer Anregung mit 405 nm ergibt sich ein Emissionsmaximum für **K1** bei 604 nm (Abbildung 14).

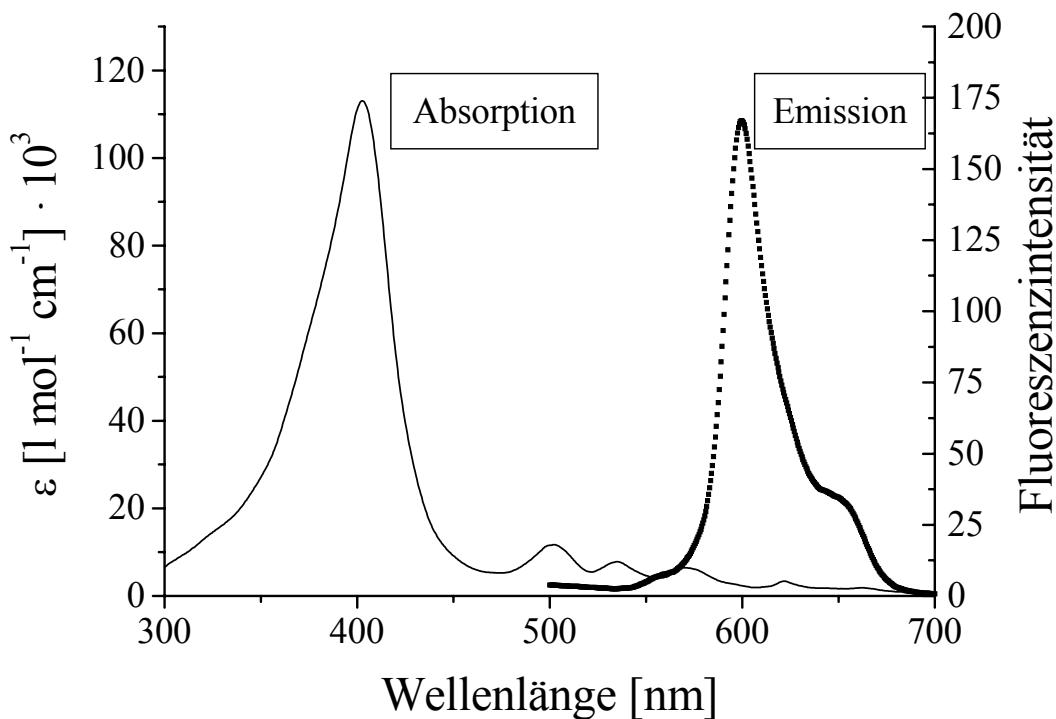


Abbildung 14: Absorptions- und Emissionsspektrum von **K1** in H_2O dest.

3.4.3 Bestimmung des Porphyringehalts in J82- und UROtsa-Zellen mittels Fluoreszenzspektroskopie

3.4.3.1 Kalibrierung

Zur Erstellung der Kalibriergerade wurde die Intensität von sechs verschiedenen Eichlösungen mit 10, 50, 100, 150, 200 und 250 nmol/l **L**, **K1**, **K2** bzw. Hämatoporphyrin am Fluoreszenzspektrophotometer bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 604 nm für den Ligand **L** und die Porphyrin-Platin(II)-Verbindungen (**K1** und **K2**) und 600 nm für Hämatoporphyrin gemessen (Abbildung 15). Als **L**, **K1**, **K2** (in Wasser) bzw. Hämatoporphyrin-Standards (in DMF) wurden 10^{-5} bzw. 10^{-6} molare Lösungen verwendet, die zu den

entsprechenden Eichlösungen mit 1,0 M Perchlorsäure und Methanol (1/1; v/v) verdünnt wurden.

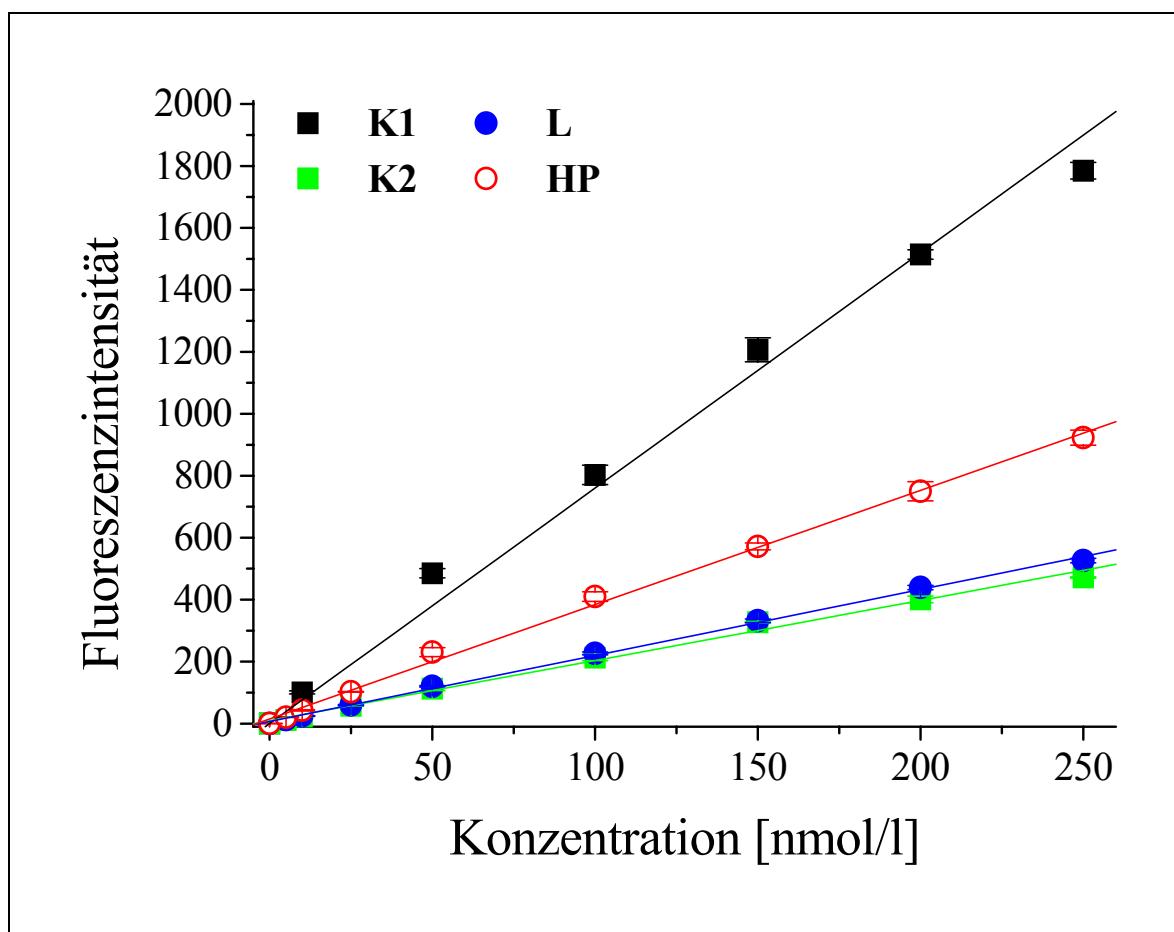


Abbildung 15: Kalibriergeraden für **L**, **K1**, **K2** (Anregung bei 405 nm, Emission gemessen bei 604 nm) und Hämatoporphyrin (**HP**, Anregung bei 405 nm, Emission gemessen bei 600 nm).

3.4.3.2 Quantifizierung von zellassoziiertem L, K1, K2 bzw. Hämatoporphyrin in J82- und UROtsa-Zellen

3.4.3.2.1 Inkubation der Zellen mit L, K1, K2 bzw. Hämatoporphyrin

Für die Aufnahmekinetiken wurden die Zellen in 75 cm²-Kulturflaschen kultiviert. Pro Zeitpunkt benötigt man eine Flasche. Die Substanzzugabe erfolgte, wenn der Boden der Kulturflaschen etwa zu $\frac{3}{4}$ mit Zellen bedeckt war. Stammlösungen der Testsubstanzen **L**, **K1**, **K2** und Hämatoporphyrin ($5 \cdot 10^{-4}$ M bzw. $5 \cdot 10^{-3}$ M) wurden mit Kulturmedium 1:1000 verdünnt. Je 20 ml substanzhaltiges Medium wurden nach Absaugen des alten Mediums zu den Zellen pipettiert. Während der gesamten Inkubationsdauer wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre belassen.

3.4.3.2.2 Probenvorbereitung für die Proteinbestimmung und Fluoreszenzmessung

Nach verschiedenen Zeitpunkten (0, 4, 7, 16 und 24 Stunden für 0,5 µM Inkubation und 0, 1, 2, 4, 7, 16 und 24 Stunden für 5 µM Inkubation) wurde das substanzhaltige Medium sorgfältig abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit etwa 20 ml PBS gewaschen. Nach Einwirkung von Trypsin/EDTA wurden die Zellen mit 10 ml Medium abgelöst. Nach Zentrifugation (170 g, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen nochmals mit 10 ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 1000 µl frisch angesetztem Extraktionsmittel (1,0 M HClO₄/Methanol; 1/1; v/v) resuspendiert und die Suspension 20 Minuten bei 45 °C im Dunkeln geschüttelt (ThermoMixer, 1400 U/min).^[112] Nach Ablauf der Extraktion wurden die unlöslichen Proteine pelletiert (Biofuge Pico, 13000 U/min, 3 min). Der Überstand wurde mit 1000 µl Extraktionsmittel verdünnt und in einer Quarzküvette am Fluoreszenzspektrometer vermessen (Anregung 405 nm, Emission 600 nm bzw. 604 nm). Über die registrierten Intensitäten der Emissionsmessung wurde der Porphyringehalt der Proben über die entsprechende Kalibriergerade berechnet.

Die Bestimmung der Zahl an extrahierten Zellen erfolgte indirekt über die Protein-gehaltsbestimmung eines Aliquots. Dieses wurde vor der Extraktion entnommen und mittels Lysepuffer aufgeschlossen. Verwendung fand der Kit der Firma Pierce, dem eine Weiterentwicklung der Biuret-Reaktion zugrunde liegt. Cu^{2+} in alkalischer Lösung wird von Proteinen reduziert. Cu^{1+} reagiert mit zwei Molekülen BCA (= bicinchoninic acid) zu einem farbigen Komplex^[113] dessen Konzentration anschließend über sein Absorptionsmaximum bei 562 nm bestimmt wird. Mit der beigefügten Proteinstammlösung (BSA in Glasampullen, 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) als Standard, wurde eine Kalibrierung der Absorption gegenüber dem Proteingehalt durchgeführt.

Durchführung: 25 μl -Proben wurden in 96-Well-Platten mit 200 μl Testreagenz versetzt, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und am Mikrotiterplatten-Lesegerät (MWG-Biotech) ausgewertet. Um die Genauigkeit (Pipettierfehler, ungenügende Probendurchmischung) der Proteinbestimmung zu erhöhen, wurden von jeder Probe vier Aliquots parallel bestimmt und anschließend gemittelt.

Über die entsprechenden Kalibrierungswerte wurde die exakte Porphyrinkonzentration ermittelt. Mit Hilfe der gemessenen Proteinmenge, dem mittleren Zellvolumen und der mittleren Proteinmenge einer Zelle konnte die zellassoziierte Porphyrinkonzentration in mol/l bestimmt werden (siehe Kapitel 4.2.1).

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Prinzipieller Aufbau

Die Durchflusszytometrie gestattet es, mehrere Parameter an Zellen mit Hilfe der Fluoreszenz und des Streulichtverhaltens gleichzeitig zu bestimmen.^[114, 115]

Dazu werden die Zellen in Suspension vorgelegt. Die vorgelegte Zellsuspension wird über eine Düse unter laminaren Bedingungen in den Strom einer Trägerflüssigkeit (isotonische Kochsalzlösung) eingebracht. Dies führt zu einer „hydrodynamischen Fokussierung“ (Abbildung 16), sodass im Idealfall jede einzelne Zelle ohne die umgebende Lösung bei der Passage durch die Küvette getrennt angeregt und deren Fluoreszenz vermessen werden kann. Das erhaltene Fluoreszenzsignal wird folglich nicht durch (Re-)absorption oder Streuung an anderen Zellen wie im Falle der konventionellen Küvettenmessung geschwächt. Überdies wird dieses von der einzelnen Zelle stammende Signal durch die schnelle Erfassung großer Zellzahlen statistisch repräsentativ. Durch die laminaren Strömungsbedingungen wird eine Durchmischung von Probenlösung und Trägerflüssigkeit verhindert.

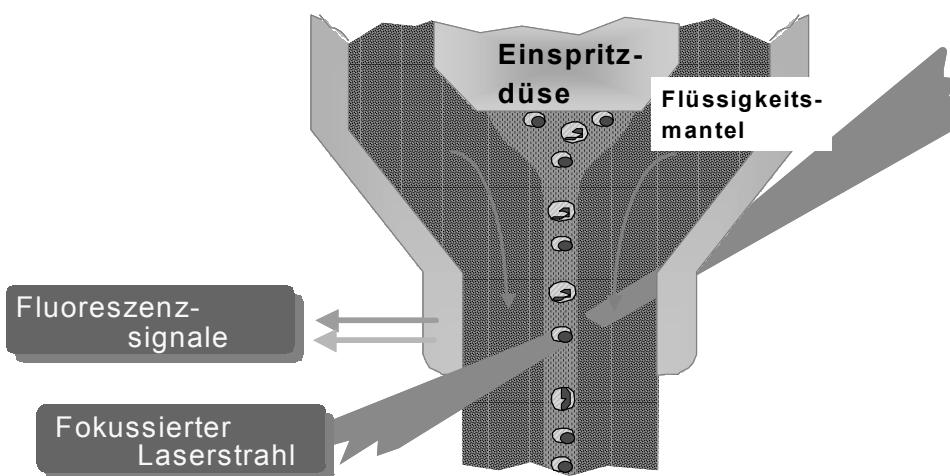


Abbildung 16: „Hydrodynamische Fokussierung“ der Zellen an der Einspritzdüse des Durchflusszytometers.

Die Fluoreszenz wird durch entsprechende Laser induziert, was die Selektivität und Effizienz der Anregung erhöht. Über ein System von dichroitischen Spiegeln, optischen Linsen und Filtern werden gestreutes Licht und Fluoreszenz zu Photodiode bzw. Photomultiplier (PMT) geleitet und detektiert (Abbildung 17). Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter light, FSC) der Zellen wird im Winkel zwischen $1,5^\circ$ und 10° zur Strahlenrichtung des anregenden Lasers (488 nm) gemessen. Die Vorwärtsstreulicht-Intensität ist annähernd proportional zur Zellgröße, wobei aber auch die innere Struktur der Zelle zum Tragen kommt. So ist bei reifen polymorphkernigen Granulozyten die Streulichtintensität höher als bei den größeren Monozyten. Die Intensität der Seitwärtsstreuung (SSC, gemessen im 90° -Winkel) hingegen korreliert mit dem Brechungsindex (der Granularität) der Zelle. Das eigentliche Fluoreszenzsignal wird ebenfalls in 90° -Richtung erfasst.

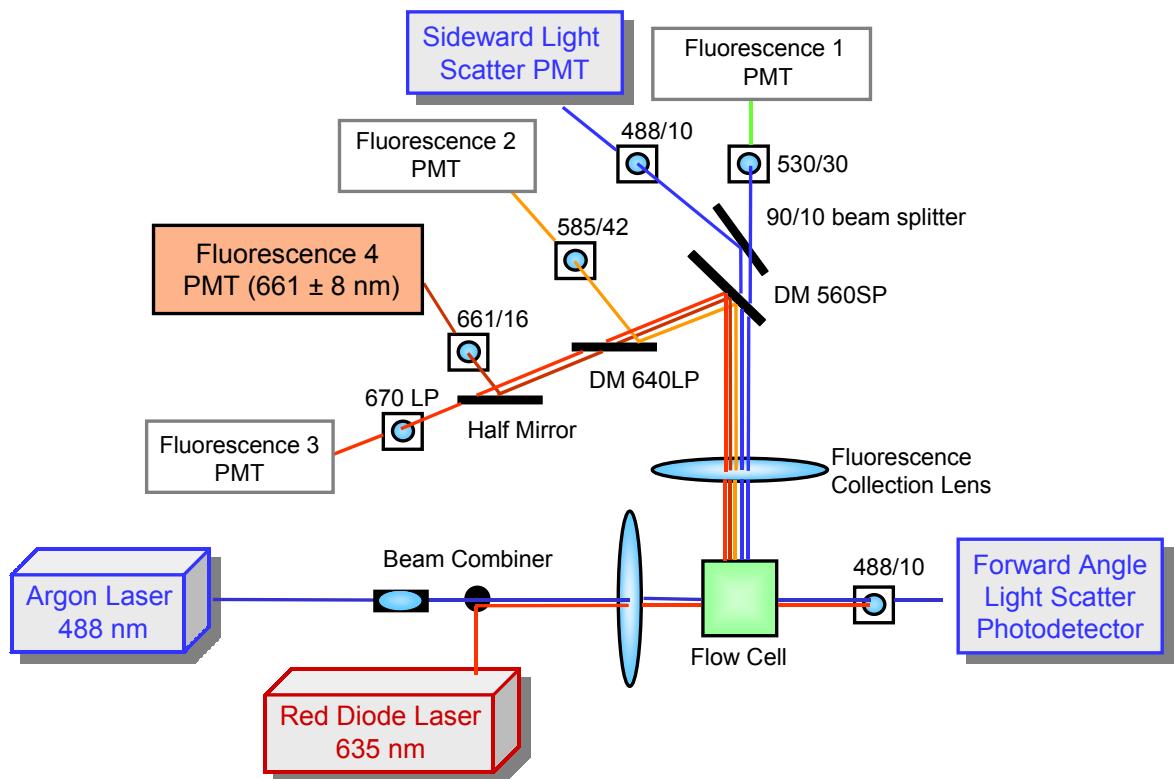


Abbildung 17: Schematische Darstellung des optischen Systems des FACSCalibur™ LP: Langpassfilter, SP: Kurzpassfilter, für die Bandpassfilter ist die maximale Transmission und Bandweithälfte angegeben.

Durch geeignete dichroitische Spiegel wird es vom SSC abgetrennt. Ferner erfolgt eine Aufspaltung über weitere Filter und dichroitische Strahlenteiler in die vier folgenden Fluoreszenzkanäle: Fluoreszenz 1: 530 ± 30 nm, Fluoreszenz 2: 585 ± 42 nm, Fluoreszenz 3: > 670 nm und Fluoreszenz 4: 661 ± 16 nm. Jeder dieser Kanäle ist mit einem PMT gekoppelt, dessen Verstärkerspannung an die jeweilige Signalintensität angepasst werden kann.

3.5.2 Auswertung und Interpretation der Daten

Neben den Streulichtsignalen in Vorwärts- und Seitwärtsrichtung wurde die Rotfluoreszenz der gemessenen Porphyrinverbindungen im FL3-Kanal als Parameter detektiert und als „list mode file“ gespeichert. Zur Korrektur der Autofluoreszenz der erhaltenen Werte für die Porphyrinfluoreszenz wurde zu jeder Versuchsreihe eine nicht inkubierte Kontrolle mitgemessen.

Zur quantitativen Auswertung wurden die gespeicherten Daten auf ein IBM-PC-kompatibles Format konvertiert und mit Hilfe der Software WinMDI (J. Trotter, <http://facs.scripps.edu>) ausgewertet. In der zweidimensionalen Darstellung der Streulichtsignale wurde ein gate auf den Bereich der Zellen gesetzt, um Debris und Zellschrott von der weiteren Auswertung auszuschließen. Bei der Bestimmung der mittleren Rotfluoreszenz wurden nur Ereignisse innerhalb dieses gates berücksichtigt. Die Quotientenbildung aus den Intensitätswerten der Rotfluoreszenz von Probe und nicht inkubierter Kontrolle beseitigte Einflüsse der Autofluoreszenz und ermöglichte den Vergleich und die gemeinsame Auswertung der einzelnen Versuchsreihen.

3.5.3 Bestimmung der Langzeitkinetik

Die Zellen wurden in 25 cm^2 -Kulturflaschen kultiviert, nach entsprechender Wachstumszeit geerntet, gezählt und in 3,6 ml Medium resuspendiert. Nach Zugabe von $400 \mu\text{l}$ einer 0,05 mM Porphyrinlösung wurde im Dunkeln durchflusszytometrisch die Porphyrinaufnahme über die Zeit verfolgt (Tabelle 2). An das FACS-

Calibur wurde ein Wasserbad (37 °C) adaptiert, welches das Probenröhrchen für die Dauer der Messung temperierte. Um das Sedimentieren der Zellen zu verhindern, wurde die Probe fortwährend gerührt. Das Programm CellQuest gestattet es, neben Fluoreszenzparametern auch die Zeit zu messen. Die Rate wurde auf ca. 250 Events/Sekunde justiert und bei einer Auflösung von 1 Sekunde/Kanal 1024 Sekunden lang kontinuierlich die zunehmende Porphyrinfluoreszenz detektiert.

Tabelle 2: Geräteparameter zur kontinuierlichen Detektion der Porphyrinaufnahme.

Kanal	Verstärkung	Modus
FSC	E-01	logarithmisch
SSC	200 V	logarithmisch
FL3	600 V	logarithmisch
Schwellenwert	FSC = 500	

3.6 Mikroskopie

3.6.1 (Auflicht)-Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie^[116] ist eine Weiterentwicklung der Hellfeldmikroskopie. Zur Illumination der Objekte wird das hochenergetische Licht einer Quecksilberdampf- oder Xenonlampe verwendet. Über ein Filtersystem im Beleuchtungsstrahlengang kann in Grenzen die Anregungswellenlänge vorgegeben werden. Im Abbildungsstrahlengang sitzen Filter, welche zum einen das Anregungslicht aussperren, zum anderen aber das Fluoreszenzlicht der Probe passieren lassen (Tabelle 3). Diese Anordnung dient dem Schutz der Augen, vor allem aber der Erhöhung des Kontrasts, da nunmehr die fluoreszierenden Objekte auf schwarzem Hintergrund erscheinen.

Tabelle 3: Filtersätze (Wellenlängen in nm) der Fluoreszenzmikroskopie.

Anregung	360/20	480/15	560/20
Emission	460/25	535/20	630/30

Zur Anwendung kam ein Bildverarbeitungssystem der Firma Visitron Systems, basierend auf einem konventionellen inversen Mikroskop (Zeiss). Für Fluoreszenzuntersuchungen stand als Anregungsquelle eine Quecksilberhochdrucklampe (50 W HBO, Osram) zur Verfügung. Die Fluoreszenzen wurden mittels einer Pelterelement gekühlten (-15 °C) CCD-Kamera (4096 Graustufen, 1317 x 1035 Pixel) akquiriert. Die generierten Bilder konnten mittels der Software MetaMorph weiter bearbeitet werden (Kontrastverstärkung, Filterung, Multi-Überlagerung), die auch die Mikroskopsteuerung übernahm.

3.6.2 Phasenkontrast- und Hellfeldmikroskopie

Die Phasenkontrastmikroskopie wurde bei den Arbeiten in der Zellkultur herangezogen und diente auch als Aufnahmeverfahren von lebenden, ungefärbten Zellen. Die Hellfeldmikroskopie wurde zur Aufnahme der Hämatoxylin-Eosin-Färbung bei den 3-D-Zellaggregateexperimenten (Sphäroide) verwendet.

3.6.3 Sensibilisatorlokalisierung

Die Kultivierung der Zellen zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der intrazellulären Porphyrin-Platin(II)-Komplexverteilung erfolgte in petriPERM-Kulturschalen (In Vitro Systems & Services). Die Porphyrinverbindungen wurden in einer Konzentration von 1 μ M bzw. 5 μ M (1:1000 Verdünnung der Stammlösung mit Medium) bei einer Inkubationsdauer von 24 Stunden eingesetzt. Bei geeigneter Wachstumsdichte wurden die Zellen entweder zunächst mit einer Porphyrinverbindung oder mit einem der Organellenfarbstoffe inkubiert, bevor die Zweitfärbung durchgeführt wurde. Die Zellen wurden unmittelbar am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Für die Aufnahmen wurde das 63x/1,4 Plan Apochromat-Objektiv am Axiovert S 100-Mikroskop (Zeiss) verwendet.

3.6.3.1 Kolokalisationsexperiment mit Lysosomen

Während der letzten 30 Minuten der Porphyrininkubation wurde der Organellenfarbstoff LysoTracker Green DND 26 (Abbildung 18, Molecular Probes) in einer Endkonzentration von 50 nM zur Gegenfärbung der Lysosomen zugegeben.^[117] Nach Ablauf der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und in den petriPERM ein Deckglas (24 x 40 mm) platziert. Die beiden Fluoreszenzen wurden über spezifische Filtersätze angeregt und detektiert (Tabelle 4).

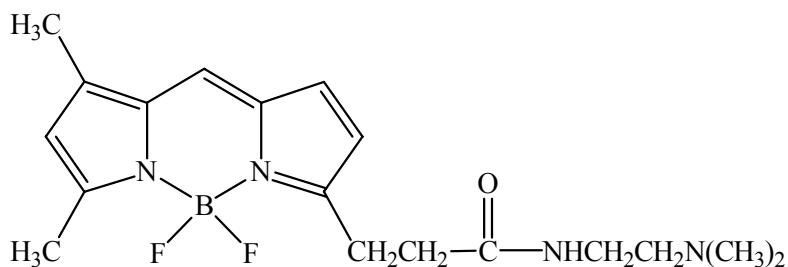


Abbildung 18: Strukturformel von LysoTracker Green DND 26.

3.6.3.2 Kolokalisationsexperiment mit Mitochondrien

In den letzten 30 Minuten der Porphyrininkubation wurde ein Organellenfarbstoff zur Doppelfärbung von Mitochondrien, entweder MitoTracker Green FM (Abbildung 19, Endkonzentration 100 nM) oder Rhodamin 123 (Abbildung 20, Endkonzentration 40 μ M) zugegeben.^[117, 118] Zusätzlich wurde auch eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der zuerst die Organellenfärbung mit MitoTracker Green FM für 30 Minuten und anschließend die Inkubation mit der Porphyrinverbindung für 24 Stunden erfolgte. Die Daten der verwendeten Filtersätze sind in Tabelle 4 spezifiziert.

Tabelle 4: Filtersätze (Wellenlängen in nm) zur Kolokalisation von Porphyrinverbindungen mit Lysosomen und Mitochondrien.

	Anregung	Emission
LysoTracker Green DND 26	480/15	535/20
MitoTracker Green FM	480/15	535/20
Rhodamin 123	480/15	535/20
Porphyrin	560/20	630/30

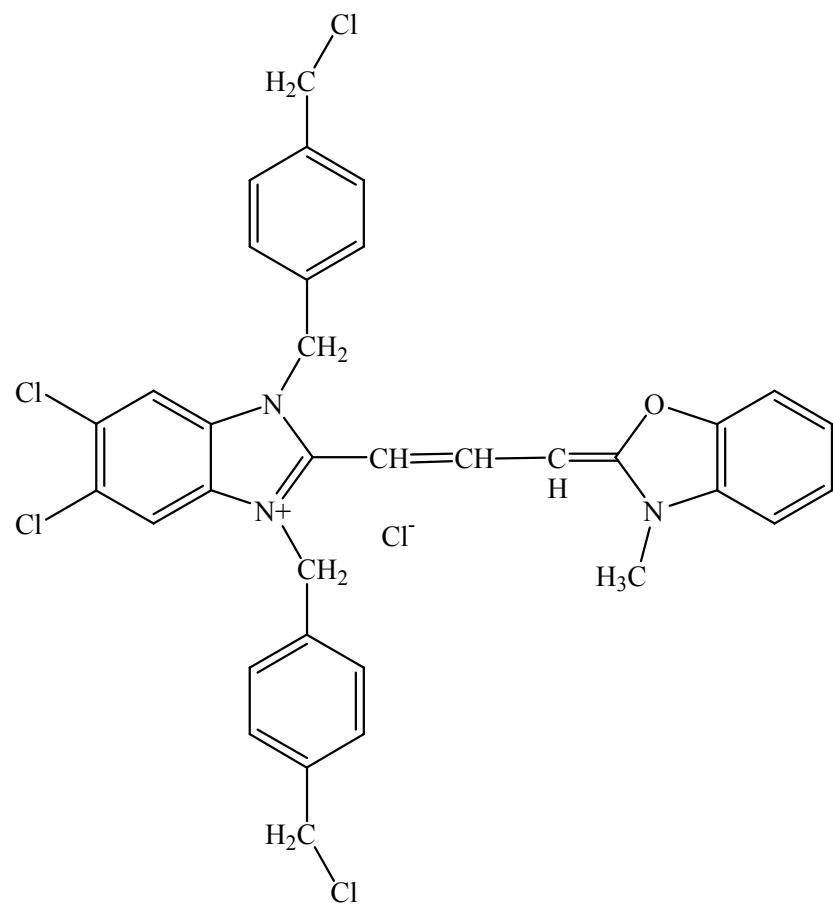


Abbildung 19: Strukturformel von MitoTracker Green FM.

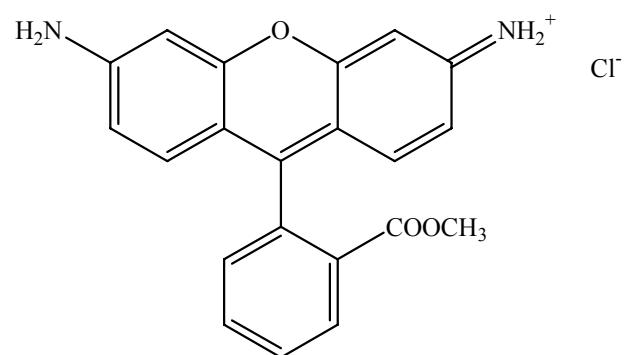


Abbildung 20: Strukturformel von Rhodamin 123.

3.6.3.3 Intrazelluläre Lokalisation: Golgi-Apparat

Zur Klärung der Fragestellung, ob die Porphyrinverbindungen auch im Golgi-Apparat lokalisiert sind, wurde als Organellenfarbstoff BODIPY FL C₅-Ceramid (Abbildung 21) verwendet.^[119] Die Zellen wurden bei passender Wachstumsdichte 30 Minuten bei 4 °C mit 5 µM Endkonzentration von BODIPY FL C₅-Ceramid-BSA-Komplex in gepufferter Lösung versetzt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit frischem EMEM für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde 1 Minute eine 5 µM DAPI-Lösung (4',6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid, Abbildung 22) zur Färbung der Zellkerne zugegeben. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Tabelle 5).

Tabelle 5: Filtersätze (Wellenlängen in nm) zur Lokalisation von Porphyrinverbindungen im Golgi-Apparat.

	Anregung	Emission
BODIPY FL C ₅ -Ceramid	480/15	630/30
DAPI	360/20	460/25

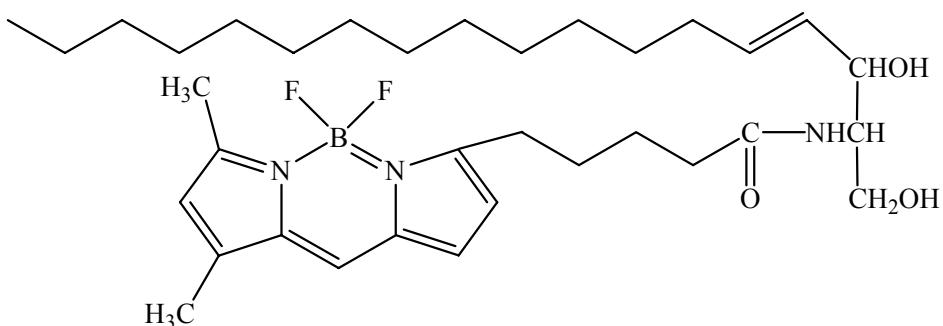


Abbildung 21: Strukturformel von BODIPY FL C₅-Ceramid.

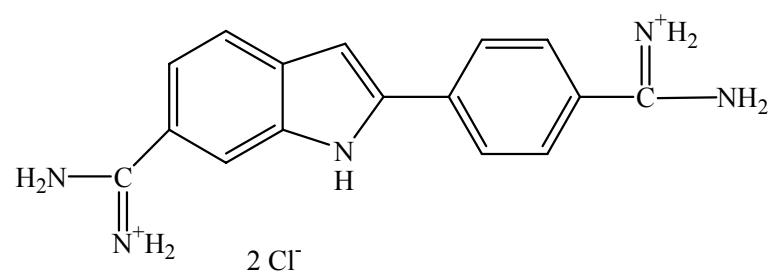


Abbildung 22: Strukturformel von DAPI.

3.7 Sphäroide als 3-D-Kulturmodelle

Neben dem im Bereich der Forschung weit verbreiteten zweidimensionalen Kultursystem der Monolayer-Kultur gibt es die Möglichkeit, komplexe Interaktionen innerhalb von Tumorgewebe in dreidimensionalen Kultursystemen zu untersuchen. Eines dieser 3-D-Modelle für Untersuchungen *in vitro* sind die multizellulären Tumorsphäroide mit, im Gegensatz zu Monolayern, ausgeprägter Extrazellulärmatrix (ECM).

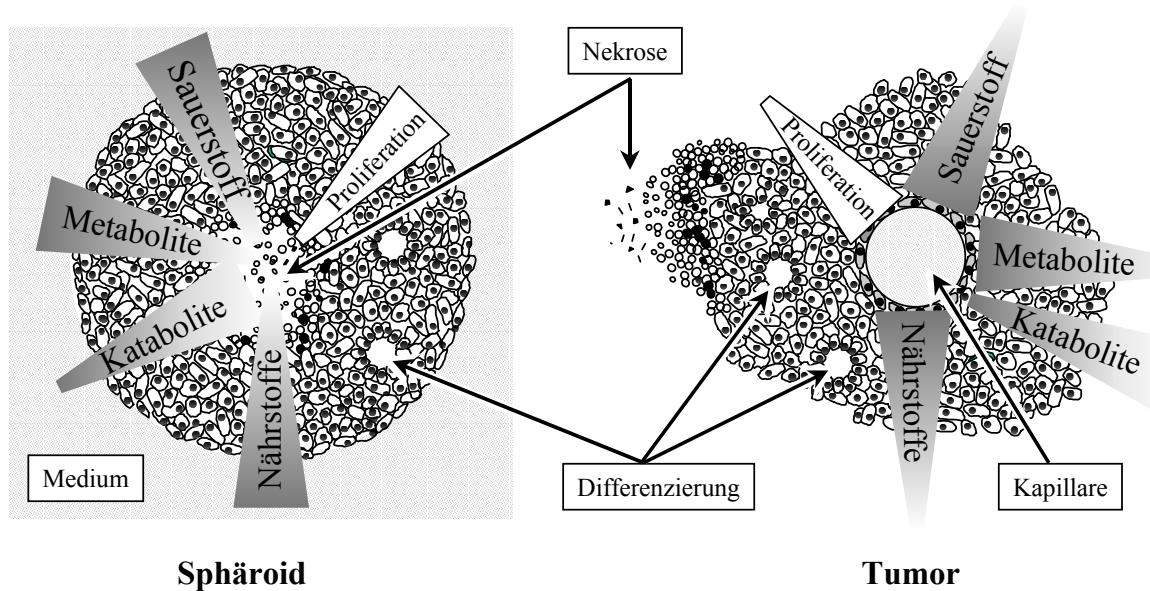


Abbildung 23: Vergleich Tumor mit Sphäroid.

Tumorsphäroide spiegeln die *in vivo*-Situationen in kleinen avaskulären Tumoren bzw. Mikrometastasen wider (Abbildung 23)^[120] und ihr Einsatz erlaubt im Bereich der Tumorforschung Studien unter gut definierten Bedingungen, die bessere Aufschlüsse über die Vorgänge in natürlichem humanem Gewebe geben als dies durch Untersuchungen an Monolayer-Kulturen möglich ist. Mit diesem dreidimensionalen Kultursystem besteht somit unter anderem die Möglichkeit, Penetrationseigenschaften von neuen Verbindungen in dreidimensionalen Tumorsphäroiden zu untersuchen.^[121]

3.7.1 Kultivierung der 3-D-Aggregate

Bei der verwendeten Liquid-Overlay-Technik^[122] wurden dreidimensionale Zellaggregate in mit Agarose beschichteten 96-Well-Platten gezüchtet. Dazu wurde 1,5 % Agarose in Medium (EMEM) ohne Zusätze aufgenommen, autoklaviert und noch heiß in die Vertiefungen der Platte pipettiert (100 µl pro Well). Nach dem Erkalten konnten die Platten luftdicht verpackt und bis zu einer Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden. Vor Verwendung wurden sie im Brutschrank auf 37 °C äquilibriert.

Die Initiation der Sphäroide erfolgte aus Einzelzellsuspensionen. Diese wurden auf definierte Zellkonzentrationen eingestellt (Tabelle 6) und mit einer Multipipette auf die Vertiefungen verteilt (je 200 µl). Um eine erfolgreiche Aggregation zu gewährleisten, wurden die Platten erschütterungsfrei drei Tage im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Der regelmäßige Medienwechsel erfolgte durch vorsichtiges Absaugen von ungefähr 100 µl Medium und zupipettieren von 100 µl frischem Medium. Der Wachstumsverlauf der Sphäroide von J82 und UROtsa wurde durch ein im Okular des Mikroskops eingraviertes Lineal, mit dessen Hilfe der Durchmesser der 3-D-Aggregate gemessen werden konnte, verfolgt. Als ideal stellte sich für J82-Sphäroide eine Wachstumszeit von 7 Tagen und für UROtsa-Sphäroide von 5 Tagen heraus. Zusätzlich wurde zur Größen- und Wachstumsbeeinflussung der Sphäroide EMEM mit 10 % FCS als Medium, im Gegensatz zu den Monolayer-Versuchen mit EMEM + 5 % FCS, verwendet.

Tabelle 6: Initiationszahlen für 3-D-Aggregate.

Zelllinie	Zellzahl pro Well (200 µl)
J82	6000
UROtsa	8000

3.7.2 Inkubation der Sphäroide mit Porphyrinverbindungen

Zur Inkubation der 3-D-Aggregate wurden die Sphäroide mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette aus den 96-Well-Platten gesammelt und in eine mit Agarose beschichtete Petrischale überführt. Nach mehrmaligem Waschen der Sphäroide mit PBS wurden 10 ml Inkubationslösung dazugegeben. Die Inkubationslösung wurde durch Verdünnen einer $5 \cdot 10^{-3}$ molaren Stammlösung der Porphyrinverbindungen mit EMEM + 5 % FCS (1:1000; v/v) erhalten. Nach Ablauf der Inkubationszeit (1 h, 4 h und 24 h) wurden die Sphäroide dreimal mit PBS gewaschen und in „frozen section Medium“ (Killik) eingefroren. Anschließend wurden die J82- wie auch die UROtsa-Sphäroide im Kryostaten bei -20 °C (2800 Frigocut, Reichert-Jung) in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und nacheinander auf einen Objektträger aufgebracht. Sowohl für die J82- als auch für die UROtsa-Zelllinie wurden Sphäroide als Kontrolle mitgeführt, die nicht mit Porphyrinverbindungen inkubiert wurden.

3.7.3 Mikroskopische Aufnahme der Porphyrinfluoreszenz

Zur Detektion und Lokalisation der Porphyrinfluoreszenz der 5 µm dick geschnittenen Sphäroidscheiben wurde das oben beschriebene Fluoreszenzmikroskop (siehe Kapitel 3.6.1) verwendet. Dazu wurden jeweils die Mittelschichten der Sphäroide bei den verschiedenen Inkubationszeitpunkten und Zelllinien gesucht und dann aufgenommen. Für die Aufnahmen wurde das 20x/0,30 Plan Neofluare-Objektiv am Axiovert S 100-Mikroskop (Zeiss) benutzt.

3.7.4 Quantifizierung der Porphyrinfluoreszenz

Mittels der zum Fluoreszenzmikroskop gehörigen Software MetaMorph konnte die Porphyrinfluoreszenz für die generierten Sphäroidbilder quantifiziert werden. Dabei wurden die Sphäroide in drei Bereiche geteilt: äußere Zelllagen, mittlere Zelllagen und Zentrum. Sowohl für J82- als auch für UROtsa-Sphäroide wurden zur Bestimmung der Porphyrinfluoreszenz gleich große Sektorenflächen gewählt. Bei der

Quantifizierung wurde jeweils die zellspezifische Autofluoreszenz berücksichtigt.^[123] Zusätzlich wurde für die äußereren Zelllagen der Sphäroide die Signifikanz mit dem Mann-Whitney-U-Test unter dem Statistikprogramm SPSS (Version: SPSS für Windows 10.0.7, SPSS Inc.) berechnet. Für p-Werte kleiner 0,05 wurde der Unterschied signifikant genannt.

3.7.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die lichtmikroskopische Referenzbeurteilung der Fluoreszenzaufnahmen wurden die Präparate nach einem Routineprotokoll^[124] mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dient der deutlichen Visualisierung von Kern- und Zytoplasmastrukturen und kann somit zur morphologischen Beurteilung von zellhaltigen Präparaten herangezogen werden. Jeweils der zur Fluoreszenzaufnahme gehörige Objektträger wurde für 10 Minuten in Mayers Hämalaun gefärbt und anschließend für weitere 10 Minuten in warmem Leitungswasser gebläut. Im zweiten Färbeschritt wurden die Objektträger wenige Sekunden in Eosin getaucht und anschließend zweimal mit Leitungswasser gespült. Danach wurden die Zellen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 bis 100 %), Isopropanol (100 %) und Xylol fixiert. Nach dem Abtropfen des Objektträgers wurden die Präparate unter Verwendung von Entellan eingedeckelt und nach dessen Trocknung im Mikroskop begutachtet und aufgenommen.

3.8 Platinbestimmung durch AAS

3.8.1 Quantitative Platinbestimmung mit der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Die Bestimmung von Platin-Konzentrationen in biologischen Materialien erfolgt heute hauptsächlich mit HPLC^[125, 126] und AAS.^[127] Die Vorteile einer Bestimmung mittels HPLC liegen in der Unterscheidungsmöglichkeit zwischen einzelnen Platinverbindungen, wie z. B. Carboplatin und seinen aktivierte Komplexen. Jedoch ist eine HPLC-Analytik nur durchführbar, wenn entsprechend detektierbare Chromophore in den Testsubstanzen vorhanden sind. Dies trifft auf Cisplatin nicht zu. Für die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe ist derzeit keine HPLC-Analytik etabliert, wohingegen die AAS-Analytik standardmäßig zur Platinbestimmung, vor allem von Platinaddukten mit Bionukleophilen, verwendet wird. Mit AAS ist eine Substanzunterscheidung nicht möglich, da man nur in der Lage ist, die gesamte Konzentration des Platins zu bestimmen. Als Vorteile der AAS jedoch sind eine höhere Empfindlichkeit sowie eine leichte und schnelle Durchführung der Bestimmung zu nennen. Die Proben können direkt in das AAS-Gerät eingespritzt werden, ohne dass die Analyten vorher extrahiert werden müssen.

3.8.2 Prinzip der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Das Prinzip der AAS beruht darauf, dass ein durch ein angeregtes Atom emittiertes Lichtquant von einem nicht angeregten Atom des gleichen Elements absorbiert werden kann. Dazu lässt man die Analysenprobe verdampfen und schickt durch diesen Dampf das Licht desjenigen Elements, das man bestimmen will. Daher wurde für die Analyse von Platin eine Platin-Hohlkathodenlampe mit einer Emissionswellenlänge von 265,9 nm verwendet. Die quantitative Bestimmung des Platins ergibt sich aus dem Intensitätsverlust der Strahlung (Absorption durch das Platin) beim Durchtritt durch den Atomnebel.

Zur Erzeugung von Atomen kommen in der AAS generell zwei Verfahren zur Anwendung: zum einen die Atomisierung durch Einbringen der Probe in eine Flamme, die sogenannte Absorptionsflammenphotometrie und zum anderen die elektrische Atomisierung, bei der sich die Probe auf einem heizbaren Probenträger befindet, die sogenannte flammenlose AAS, im Speziellen die GF AAS (graphite furnace AAS). Die elektrothermische Atomisierung, die zur Erzeugung von Platinatomen verwendet wird, hat gegenüber der Atomisierung durch eine Flamme einige Vorteile. Hierbei wird ein elektrisch leitender Probenträger aus einem chemisch inerten Material, das hohe Temperaturen aushält, aufgeheizt. Der gebräuchlichste Träger ist ein kleines Rohr aus Graphit, das innen mit einer Schicht aus pyrolytisch abgeschiedenem Kohlenstoff ausgekleidet ist, um ein Versickern der Probelösung im ansonsten porösen Graphit zu verhindern. Ein weiterer Vorteil der Beschichtung ist, dass durch die kürzere Kontaktzeit zwischen dem Platin und dem Graphit (kein Versickern) die Möglichkeit der Bildung schwerlöslicher Carbide erschwert ist. Zum Schutz des Rohrmaterials und anderer Teile, die heiß werden, wird während des Aufheizvorgangs ständig ein Edelgas, meist Argon, durchgeblasen. Die Verwendung eines Schutzgases kann jedoch die Alterung der Graphitrohre nur hinauszögern, aber nicht verhindern. Durch den Angriff der Graphitschicht und durch Ablagerungen werden die Messsignale ständig geringer, bis schließlich nach ca. 60 Messungen das Graphitrohr ausgewechselt werden muss.

Insgesamt gesehen lässt sich Platin mit GF AAS relativ problemlos bestimmen, wenn auch nicht mit allzu hoher Empfindlichkeit. Unter bestimmten Voraussetzungen (keine störenden Matrixeffekte, wie z. B. erhebliche Signalerniedrigung durch NaCl) liegt die charakteristische Masse^[*] von Platin in einem längsgeheizten Atomisator mit einer Atomisierungstemperatur von 2650 °C bei 100 pg.

* Bei dem Begriff *charakteristische Masse* handelt es sich um die Masse des Analyten, die mit einer Extinktion $A = 0,0044$ (1 % Absorptionsgrad) oder einer zeitintegrierten Extinktion $A_{int} = 0,0044$ s gemessen wird.

Die Messung selber kann in drei Phasen unterteilt werden: eine Trocknungs-, eine Veraschungs- und eine Atomisierungsphase. In der Trocknungsphase werden die Lösungsmittel verdampft. Um ein Verspritzen der Probe zu verhindern, muss die Trocknung bis ca. 200 °C relativ langsam erfolgen. Im nächsten Schritt wird die Probe verascht. Hier erfolgt durch eine Abspaltung von Kristallwasser, durch eine Entfernung von höher siedenden organischen Komponenten und durch Verdampfen oder Sublimieren von anorganischen Salzen, die Matrix-Spur-Trennung. Während dieser Phase kann es bei bestimmten Matrices sinnvoll sein, statt Argon kurz Sauerstoff durchzublasen, um die Verbrennung zu verbessern oder durch Zusatz von so genannten Veraschungshilfen wie z. B. Salpetersäure störende Begleitstoffe leichter flüchtig zu machen. Im letzten Schritt erfolgt die eigentliche Atomisierung, wobei das Rohr schnell auf die zur Atomisierung des Platins nötige Temperatur von 2650 °C aufgeheizt wird. Während der Atomisierung wird der Gasstrom meist unterbrochen, um die Atome möglichst lange im Atomisierungsraum zu halten.

Das ganze Aufheizen dauert etwa 2-3 Minuten. Danach wird das Rohr durch Wasserkühlung wieder auf Raumtemperatur gebracht.

Weitere Details über die Atomabsorptionsspektroskopie sind in der Monographie von Welz^[128] nachzulesen.

3.8.3 Durchführung der Platinbestimmung

Die quantitative Bestimmung von Platin in biologischen Materialien wurde mit dem von Koch (1993)^[129] optimierten Verfahren mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) durchgeführt.

3.8.3.1 Das Ofenprogramm

Um reproduzierbare Werte zu erhalten und eventuell auftretende Matrixeffekte zu vermeiden, ist ein spezielles Ofenprogramm zur Veraschung der Probe nötig (Tabelle 7).

Tabelle 7: Ofenprogramm zur quantitativen Platinbestimmung aus biologischen Materialien.

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Gasfluss [l/min]	Gasart	Signaldetektion Ja / Nein
75	20	3	Argon	Nein
80	15	3	Argon	Nein
90	30	3	Argon	Nein
120	15	3	Argon	Nein
300	20	3	Argon	Nein
500	10	3	Argon	Nein
600	10	3	Sauerstoff	Nein
600	10	3	Argon	Nein
1200	15	3	Argon	Nein
1200	2	3	Argon	Nein
1250	2	0	Argon	Nein
2650	0,7	0	Argon	Ja
2650	1	0	Argon	Ja
2650	2	3	Argon	Nein

Die Probe wurde anfangs durch langsames Aufheizen des Graphitrohrs, wodurch ein Verspritzen der Probe vermieden wurde, getrocknet. Während des Aufheizvorgangs

wurde ständig ein konstanter Strom von Argon als Schutzgas durch das Rohr geleitet, was die Alterung des Graphitrohrs hinauszögert. Bei 600 °C wurde für einige Sekunden Sauerstoff eingeleitet, um die Probe vollständig zu veraschen. Während der Atomisierung des Platins bei 2650 °C wurde der Gasfluss kurzzeitig unterbrochen, damit die Atome möglichst lange im Atomisierungsraum gehalten werden konnten und ihre Absorption bei $\lambda = 265,9$ nm gemessen werden konnte.

Zu bedenken ist bei der graphite furnace AAS die Alterung der Graphitrohre. Zwar kann die Abnutzung der Graphitrohre durch ständiges Einleiten des Schutzgases Argon verzögert werden, doch gänzlich verhindern kann man sie nicht. Aus diesen Gründen wurde das alte Graphitrohr nach etwa 60 Einzelmessungen gegen ein neues ausgetauscht.

3.8.3.2 Kalibrierung

Eine Ampulle des Titrisol-Platinstandards ($[H_2(PtCl_6)]$, MERCK) wurde nach Vorschrift in einem Liter Millipore-Wasser gelöst und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Konzentration dieser Stammlösung betrug 1,0 mg Pt/ml. Der Arbeitsstandard, der zu jeder AAS-Messreihe frisch hergestellt wurde, wurde durch Verdünnung 1:100 mit 0,5 % HNO_3 erhalten.

Vor jeder Messung wurde zunächst eine Kalibriergerade mit Platinstandards im Bereich zwischen 0,5 und 6 ng Pt pro Einspritzung (jeweils 10 μ l) erstellt. Dazu wurde der Arbeitsstandard, eine wässrige Lösung von $H_2[PtCl_6]$ mit einer Konzentration von 10 μ g Pt/ml, mit 0,5 %iger HNO_3 zu den jeweiligen Eichlösungen verdünnt. Es wurden fünf verschiedene Eichlösungen mit 0,5 ng Pt/Einspritzung dazu 1, 2, 4 und 6 ng Pt/Einspritzung jeweils dreifach vermessen, gemittelt und daraus eine Kalibriergerade erstellt. Da die Graphitrohre relativ schnell altern, wurde eine Rekalibrierung nach jeder dritten Probe durchgeführt und bei Bedarf das Graphitrohr gewechselt. Der Arbeitsstandard und die Eichlösungen wurden vor jeder Messreihe neu hergestellt. Als Nullwert wurde 0,5 % HNO_3 eingesetzt.

3.8.4 Quantifizierung von zellassoziiertem Platin in J82- und URotsa-Zellen

3.8.4.1 Inkubation der Zellen mit Platinkomplexen

Für die Aufnahmekinetiken wurden die Zellen aus einer Passage in 175 cm²-Kulturflaschen kultiviert. Pro Zeitpunkt benötigt man eine Flasche. Die Substanzzugebung erfolgte in Analogie der Aufnahmekinetik bei der Fluoreszenzspektroskopie (siehe Kapitel 3.4.3.2). Entsprechend wurden die Tumor- und Normalzellen auch hier mit einer Konzentration von 3 µM und 5 µM **K1** und **K2** bzw. Cisplatin im Kulturmedium inkubiert. Während der gesamten Inkubationsdauer wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre belassen.

3.8.4.2 Probenvorbereitung für die Proteinbestimmung und AAS

Nach verschiedenen Zeitpunkten (0, 1, 2, 4, 7, 16 und 24 Stunden) wurde das substanzhaltige Medium sorgfältig abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit etwa 20 ml PBS gewaschen. Nach Einwirkung von Trypsin/EDTA wurden die Zellen mit 10 ml Medium abgelöst. Nach Zentrifugation (170 g, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen noch zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 1,25 ml H₂O dest. aufgenommen und die Suspension mit Hilfe eines Ultraschallstabs (output control: 4, % duty cycle: 60, pulsed) innerhalb 2 Minuten unter Eiskühlung homogenisiert. Für die AAS-Messungen wurde diese Lösung entweder direkt oder nach geeigneter Verdünnung mit H₂O dest. eingesetzt. Zur Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Kapitel 3.8.4.3) wurde die Suspension 1:20 mit H₂O dest. verdünnt.

3.8.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford^[130]

Das Arbeitsreagenz wurde durch Verdünnung des Bio-Rad-Farbstoffkonzentrats mit vier Volumenteilen entmineralisiertem Wasser hergestellt. Es wurde in einer braunen Glasflasche aufbewahrt und ist maximal 2 Wochen stabil.^[131]

Zur Proteinbestimmung wurden 2,5 ml Arbeitsreagenz mit 50 μ l Probe versetzt und durch vorsichtiges Umschwenken gemischt. Nach 5 Minuten wurde die Extinktion im Photometer bei 595 nm gemessen.

Zur Erstellung der Kalibiergeraden wurden unterschiedlich konzentrierte HSA-Lösungen in Wasser hergestellt. Dazu wurde ein Stammlösung durch Einwaage von 2,0 mg pulverförmigem HSA in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß und Auffüllen mit 2000 μ l H₂O dest. vorbereitet. Hiervon wurden jeweils 50, 100, 200, 400 und 600 μ l entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit H₂O dest. auf 1000 μ l aufgefüllt. Auf diese Weise ergaben sich 50, 100, 200, 400 und 600 μ g HSA/ml Wasser. Auch hier wurden jeweils 50 μ l der Eichlösungen und 2,5 ml des Arbeitsreagenzes vermischt und bei 595 nm vermessen.

3.8.4.4 Ultrafiltration

Eine $5 \cdot 10^{-3}$ M Stammlösung der Platinkomplexe **K1**, **K2** und Cisplatin wurde 1:1000 mit PBS-Lösung verdünnt. Diese Proben wurden zum einen direkt in das AAS-Gerät eingespritzt. Zum anderen wurden 400 μ l der nicht filtrierten Proben durch ein Nanosep 10K- oder 30 K-Filter ultrafiltriert (4300 g, 15 min, 4 °C). Sofort im Anschluss wurden auch die ultrafiltrierten Proben zur Platinbestimmung im Atomabsorptionsspektrometer vermessen.

3.8.5 Quantifizierung von DNA-gebundenem Platin in J82- und UROtsa-Zellen

3.8.5.1 Inkubation der J82- und UROtsa-Zellen mit Platinkomplexen

Für die Quantifizierung von DNA-gebundenem Platin wurden die Zellen aus einer Passage in 175 cm²-Kulturflaschen kultiviert. Pro Messpunkt wurden 5 175 cm²-Kulturflaschen benötigt. Die Substanzzugabe erfolgte entsprechend Kapitel 3.4.3.2.1. Als Testsubstanzkonzentrationen wurden 3 µM bzw. 5 µM eingesetzt. Während der gesamten Inkubationsdauer wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre belassen.

Nach 24 Stunden Inkubation wurde das substanzhaltige Medium sorgfältig abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit etwa 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin/EDTA abgelöst, entsprechend inkubierte Zellen vereint und pelletiert. Nach Zentrifugation (500 g, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen noch zweimal mit je 20 ml PBS gewaschen und anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.8.5.2 Lyse mit Proteinase K

Zur Lyse der Zellen wurde über Nacht ein Verdau mit Proteinase K angesetzt. Dazu wurde zum Zellpellet eine Lösung bestehend aus 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS) und 10 mg/ml Proteinase K in Lysepuffer gegeben. Diese Mischung wurde über Nacht bei 50 °C im Wasserbad inkubiert.

3.8.5.3 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion

Nach dem Proteinase K-Verdau wurde zu den Proben eine äquivalente Menge eines Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25/24/1; v/v/v) vorsichtig pipettiert. Diese Mischung wurde leicht geschüttelt, bis eine homogene weiße Phase entstand. Bei Zentrifugation (1700 g, 10 min) trennte sich die wässrige von der or-

ganischen Phase und in der Interphase befanden sich die Proteine. Die DNA war aufgrund der polaren Gruppen des Zuckerphosphat-Rückgrats in der oberen wässrigen Phase. In der unteren organischen Phase verblieben hydrophobe Lipide. Die obere DNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen. Um die Reinheit der DNA-Isolierung zu erhöhen, wurde diese Prozedur der Phenol/Chloroform/Isoamyl-alkohol-Extraktion solange wiederholt, bis sich keine Interphase mehr bildete, d. h. keine kontaminierenden Proteine mehr vorhanden waren.^[132]

3.8.5.4 Ethanolfällung der DNA

Zur DNA-haltigen Flüssigkeit wurde zur Konzentration und Erhöhung der Reinheit der DNA ein Volumenäquivalent an 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Volumenäquivalente an 100 % Ethanol gegeben. Der Ansatz wurde nun vorsichtig gemischt. Die Sedimentation der gefällten DNA erfolgte durch Zentrifugation bei 1700 g für 2 Minuten. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde zur Entfernung von Salzen und Phenol mehrmals mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit der Öffnung nach unten auf sauberes, saugfähiges Papier zur Trocknung gestellt. Danach wurde das DNA-Pellet in 250 µl TE-Puffer aufgenommen.^[133]

3.8.5.5 Bestimmung der DNA-Konzentration und des Reinheitsgrads

DNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Zur Bestimmung des DNA-Gehalts der Proben wurden diese in einem UV/Vis-Spektralphotometer gegen einen Nullwert (TE-Puffer) gemessen. Die Messung erfolgt in 1 ml-Quarzküvetten und die Extinktion wurde bei 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte von 1 entspricht ca. 50 µg/ml doppelsträngige DNA, ca. 40 µg/ml RNA bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide. Zur Bestimmung des Reinheitsgrads der Proben wurden diese zusätzlich bei 280 nm vermessen, einem Absorptionsmaximum von Proteinen, denn aus dem Quotienten der optischen Dichte von 260 nm zu 280 nm können Aussagen zur Reinheit einer DNA-Probe gemacht werden. Werte für eine reine Präparation

liegen zwischen 1,8 und 2,0. Nur Proben, die dieser Reinheit entsprachen, wurden für die Messung der Platingehalte verwendet.

3.8.5.6 AAS-Messung des Platingehalts der isolierten DNA

Für die AAS-Messungen wurden obige DNA-Proben direkt eingesetzt. Die DNA-Platinierung wird als Anzahl der Basenpaare pro Platinatom angegeben, was mit Hilfe des bestimmten Platingehalts und der oben gemessenen DNA-Konzentration berechnet werden kann.

3.9 Absorptionsspektren

Bei der Aufnahme von Absorptionsspektren wird Licht mit variabler Wellenlänge durch die zu untersuchende Probe geleitet, die sich in einer Küvette mit definierter optischer Weglänge befindet. Aus dem Verhältnis der Intensität des durch die Probe transmittierten Lichts und des auf die Probe auftreffenden Lichts wird die Extinktion bestimmt. Über das Lambert-Beer'sche Gesetz

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

mit

E = Extinktion

ε = molarer Extinktionskoeffizient in $1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

c = Konzentration in mol l^{-1}

d = Schichtdicke in cm

kann der molare Extinktionskoeffizient ε berechnet werden. Für die Aufnahme des Absorptionsspektrums von **L**, **K1** und **K2** sowie der Bestimmung der DNA-Konzentration und des Reinheitsgrads der isolierten DNA diente ein Uvikon 930 UV-Spektrophotometer (Kontron).

3.10 Bestimmung der Glutathionkonzentration und des Einflusses von Buthioninsulfoximin auf J82- und UROtsa-Zellen

Resistenzerscheinungen sind inzwischen das Hauptproblem bei der chemotherapeutischen Behandlung von Tumoren mit Platinverbindungen. Bestimmte Tumorarten, z. B. das Mammakarzinom, sprechen von Anfang an nicht auf eine Cisplatin-Behandlung an (intrinsische Resistenz), während sich bei anderen Tumoren das Resistenzverhalten erst im Laufe der Therapie entwickelt (erworbene Resistenz). Dabei werden heute verschiedene Mechanismen diskutiert, wie z. B. Variationen im Folat-Metabolismus^[134] und in der Expression von Onkogenen,^[135] Veränderungen des transmembranen Transports von Cisplatin,^[136] oder verbesserte DNA-Reparaturfähigkeit.^[137]

Der Glutathionspiegel in den verschiedenen Zellen spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle.^[138] Platinkomplexe können mit der Sulfhydrylgruppe von Glutathion abreagieren, was möglicherweise durch das Enzym Glutathion-S-Transferase katalysiert wird, und stehen dann für die Platinierung der DNA nicht mehr zur Verfügung.^[139] Durch Zugabe von Buthioninsulfoximin (BSO), ein Hemmstoff der Glutathionbiosynthese, kann die Konzentration an Glutathion erniedrigt werden, was sich in einer Erhöhung der Sensitivität der Zellen gegenüber Cisplatin auswirken sollte.^[140] Neben Glutathion können auch andere intrazelluläre Thiole wie Metallothionein^[141] Platinverbindungen deaktivieren.

3.10.1 Chemosensitivitätstest mit BSO

Untersucht wurde eine mögliche Veränderung des wachstumshemmenden Effekts der Platinverbindungen bei Mitinkubation von 50 µM BSO auf J82- und UROtsa-Zellen.^[142] Dazu wurde eine $5 \cdot 10^{-2}$ M BSO-Stammlösung in sterilem PBS hergestellt. Die Durchführung des Chemosensitivitätstests, das Aussäen der Zellkulturen,

die Herstellung und Lagerung der Wirkstofflösungen und die Substanzzugabe erfolgten in Analogie zu Kapitel 3.3.1. Getestet wurde das Proliferationsverhalten von J82- und UROtsa-Zellen unter Platinkomplex-, Platinkomplex- und 50 µM BSO- und nur 50 µM BSO-Inkubation. Der erste Zeitpunkt des Chemosensitivitätstests wurde 48 Stunden nach der Substanzinkubation genommen.

3.10.2 Ellman-Assay

Die Quantifizierung des Gesamt-SH-Gehalts (d. h. SH-Gruppen in Proteinen und in niedermolekularen Verbindungen) und des SH-Gehalts von niedermolekularen Verbindungen (d. h. L-Cystein und vor allem Glutathion) in biologischen Materialien kann spektralphotometrisch nach der Methoden von Ellman erfolgen.^[143] 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoësäure) (DTNB, Ellman's Reagenz) wird durch SH-Gruppen zu einem Äquivalent 2-Nitro-5-mercaptopbenzoësäure reduziert (Abbildung 24). Das Säureanion von 2-Nitro-5-mercaptopbenzoësäure ist intensiv gelb gefärbt und kann somit zur Bestimmung von SH-Gruppen verwendet werden. Hierzu wird die Extinktion bei 412 nm im UV/Vis-Spektrophotometer gemessen.

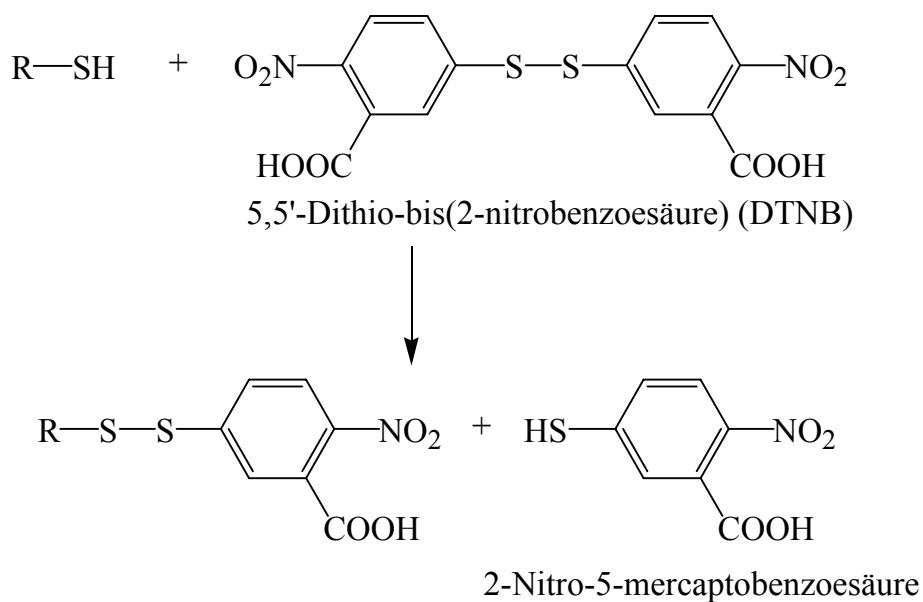


Abbildung 24: Reaktionsschema von 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoësäure) mit SH-Gruppen zur spektralphotometrisch detektierbarem 2-Nitro-5-mercaptopbenzoësäure.

3.10.2.1 Inkubation der J82- und UROtsa-Zellen

Für die Bestimmung des Gesamt-SH-Gehalts und des SH-Gehalts von niedermolekularen Verbindungen^[144] in J82- und UROtsa-Zelllinie wurden die Zellen aus einer Passage in 175 cm²-Kulturflaschen kultiviert. Pro Zelllinie wurden zwei Flasche benötigt. Die BSO-Zugabe erfolgte, wenn der Boden der Kulturflaschen etwa zu $\frac{3}{4}$ mit Zellen bedeckt war. Dabei wurde zu jeweils einer 175 cm²-Kulturflasche 50 μ M BSO-haltiges Medium nach Absaugen des alten Mediums pipettiert. In der zweiten Kulturflasche wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Während der gesamten Inkubationsdauer wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ in einer waserdampfgesättigten Atmosphäre belassen. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium sorgfältig abgesaugt, die Zellen wurden zweimal mit etwa 20 ml PBS gewaschen und anschließend abtrypsinert. Nach Zentrifugation (170 g, 10 min, 4 °C) und nochmaligem Waschen mit PBS wurde jeweils die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden mittels Ultraschall unter Eiskühlung homogenisiert. Für die Bestimmung des Gesamt-SH-Gehalts und des SH-Gehalts von niedermolekularen Verbindungen wurden die Zellhomogenisate von unbehandelten und mit BSO-behandelten Zellen nochmals aufgeteilt, wobei jeweils eine Zellsuspension zusätzlich mit 10 % Trichloressigsäure, für die Bestimmung des SH-Gehalts von niedermolekularen Verbindungen, versetzt wurde. Abschließend wurden alle Proben zentrifugiert (3000 g, 5 min) und konnten nun in den Ellman-Assay eingesetzt werden.

3.10.2.2 Vorbereitung der Glutathionstandards

Reduziertes Glutathion wurde in 20 mM Triethanolamin zu einer Endkonzentration von 20 mM aufgelöst. Vor jeder Messreihe wurde aus dieser Stammlösung der Arbeitsstandard hergestellt. Der Arbeitsstandard (1 mM) erhielt man durch Verdünnung 1:20 mit 20 mM Triethanolamin. Für die eigentliche Glutathionstandardreihe

wurden Lösungen mit den Glutathionkonzentrationen 0, 50, 100, 250, 500, 1000 μM durch Verdünnen des Arbeitsstandards erneut mit Triethanolamin vorbereitet.

3.10.2.3 Gesamt-SH-Gehalt in J82- und UROtsa-Zellen

Zu 40 μl von Glutathionstandard und nicht Trichloressigsäure behandelten Proben wurden je 150 μl Tris/HCl-Puffer (pH 8,2), 50 μl einer 150 μM DTNB-Lösung (DTNB in Methanol gelöst) und 800 μl Methanol gegeben. Nach Zentrifugation (3000 g, 5 min) wurden die Proben bei 412 nm im UV/Vis-Spektrophotometer vermessen.

3.10.2.4 SH-Gehalt von niedermolekularen Verbindungen in J82- und UROtsa-Zellen

Zu 200 μl des Überstands der Trichloressigsäure-Fällung oder den Glutathion-standards wurden 800 μl Tris/HCl-Puffer (pH 8,9) und 80 μl einer 150 μM DTNB-Lösung (DTNB in Methanol gelöst) pipettiert. Anschließend wurden die Proben bei 412 nm vermessen.

Mit Hilfe der jeweiligen Kalibrierung konnte so der Gesamt-SH-Gehalt und der SH-Gehalt von niedermolekularen Verbindungen von unbehandelten und mit BSO-vorbehandelten J82- und UROtsa-Zellen bestimmt werden. Aus der Differenz ließe sich der proteingebundene Anteil berechnen.

3.11 Statistische Auswertung

Für jede analytische Untersuchung wurden jeweils mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben (Excel).

4 Kapitel

Ergebnisse

In vitro-Untersuchungen der wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexe K1 und K2

4.1 Chemosensitivitätstest

Das Ansprechverhalten von J82- und UROtsa-Zellen auf die beiden Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** wurde in einem In-vitro-Screening-Verfahren untersucht.^[110] Bei diesem Verfahren werden J82- oder UROtsa-Zellen in 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät. Die Mikrotiterplatten-Kulturen werden dann während ihrer „exponentiellen“ Wachstumsphase mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Verbindungen behandelt. Nach definierten Inkubationszeiten wird der Anteil der Zellmasse durch Färbung der Nukleoproteine mittels Kristallviolett kolorimetrisch (578 nm) bestimmt. Die Intensität der Zellfärbung ist der Zellzahl direkt proportional.^[145]

Eine Beurteilung der zytotoxischen Wirkung der Substanzen erfolgte nach einer Einteilung in vier Gruppen:

- *Keine Wirkung* - es ist keine signifikante Änderung der Wachstumskurve im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.
- *Wachstumshemmende Wirkung* - die Zellen werden geschädigt und zeigen ein deutlich langsameres Wachstum als die Kontrolle, erreichen aber schließlich den Kontrollwert.
- *Zytostatische Wirkung* - die Zellteilung wird verhindert, die Zellmasse bleibt konstant.
- *Zytozide Wirkung* - die Substanzen bewirken den Tod und die Lyse der Zellen. Die Zellmasse fällt während der Inkubation unter den Anfangswert.

Die Wirkung einer Substanz wird nach

$$T/C_{\text{corr.}} [\%] = \frac{T - C_0}{C - C_0} \cdot 100 [\%]$$

berechnet, mit

T = mittlere Absorbanz der behandelten Zellen

C = mittlere Absorbanz der Kontrolle

C_0 = mittlere Absorbanz der Zellen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe.

Das Ausmaß zytozider Substanzwirkungen wird unabhängig vom Wachstum der Kontrolle berechnet. Die spezifische Wachstumsrate Zytozidie [%] ergibt sich somit nach:

$$\text{Zytozidie} [\%] = \frac{C_0 - T}{C_0} \cdot 100 [\%]$$

Die Ergebnisse sind als Wachstumskurven durch Auftragung der Absorbanz für die Kontrolle, $T/C_{\text{corr.}} [\%]$ oder Zytozidie [%] gegen die Inkubationszeit dargestellt. Die korrigierten T/C -Werte spiegeln die Hemmung des Zellwachstums wider. Dabei stellen die Werte zwischen 0 und 100 % den Wirkbereich dar, wobei 0 % ein zum Stillstand gekommenes Zellwachstum bedeutet (*zytostatische Wirkung*), während

100 % ein der unbehandelten Referenzplatte (Kontrolle) entsprechendes Wachstum anzeigt (*keine Wirkung*). Auch Werte über 100 % sind in der Testmodalität vorgesehen; diese signalisieren eine Stimulation des Zellwachstums durch den Wirkstoff. Im Gegensatz dazu hieße 100 % Zytozidie eine vollständige Lyse der Tumor- oder Normalzellen vom Boden der 96-Loch-Mikrotiterplatten. Aufgrund der Versuchsdurchführung sind jedoch maximale Zytozidie-Werte von etwa 90 % zu erreichen. E_{578} , die im Rahmen der Chemosensitivitätstests nach Kristallviolett-Färbung gemessene Absorbanz (Extinktion) bei $\lambda = 578$ nm, ist die Ordinate für die Wachstumskurve der Kontrolle. Der verschiedenartige Kurvenverlauf der Wachstumskurven der Kontrollen ist die Folge einer unterschiedlichen Aussaatdichte der Tumor- oder Normalzellen (siehe Kapitel 3.3.1.1).^[110b] Der Übersichtlichkeit halber wurden die Fehler in den Wirkungsspektralen nur zu einer Seite hin aufgetragen.

4.1.1 Chemosensitivitätstest verschiedener Zytostatika an humanen Harnblasen-Zelllinien

Zunächst wurde das Ansprechverhalten der beiden Zelllinien, J82 und UROtsa, auf die antiproliferative Wirkung von verschiedenen Zytostatika hin untersucht. Dabei wurden Zytostatika ausgewählt, die in der klinischen Behandlung von Harnblasenkarzinomen Anwendung finden. Neben den in der Standard-Polychemotherapie eingesetzten Verbindungen, Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin,^[146] wurden auch neue in der Literatur diskutierte Verbindungen, wie Gemcitabin, Paclitaxel und Mitomycin C getestet.^[147] Die Auswahl der verwendeten Konzentrationen erfolgte in Anlehnung an in der Literatur beschriebene Chemosensitivitätstests. Generell lässt sich festhalten, dass alle verwendeten Zytostatika ein ähnliches Wirkungsspektrum im Vergleich J82- zu UROtsa-Zellen zeigen (Abbildung 25 bis Abbildung 28). Mögliche Gründe für ein derartiges Ergebnis könnten die bekannte geringe Selektivität von Zytostatika zu neoplastischem Gewebe sein.

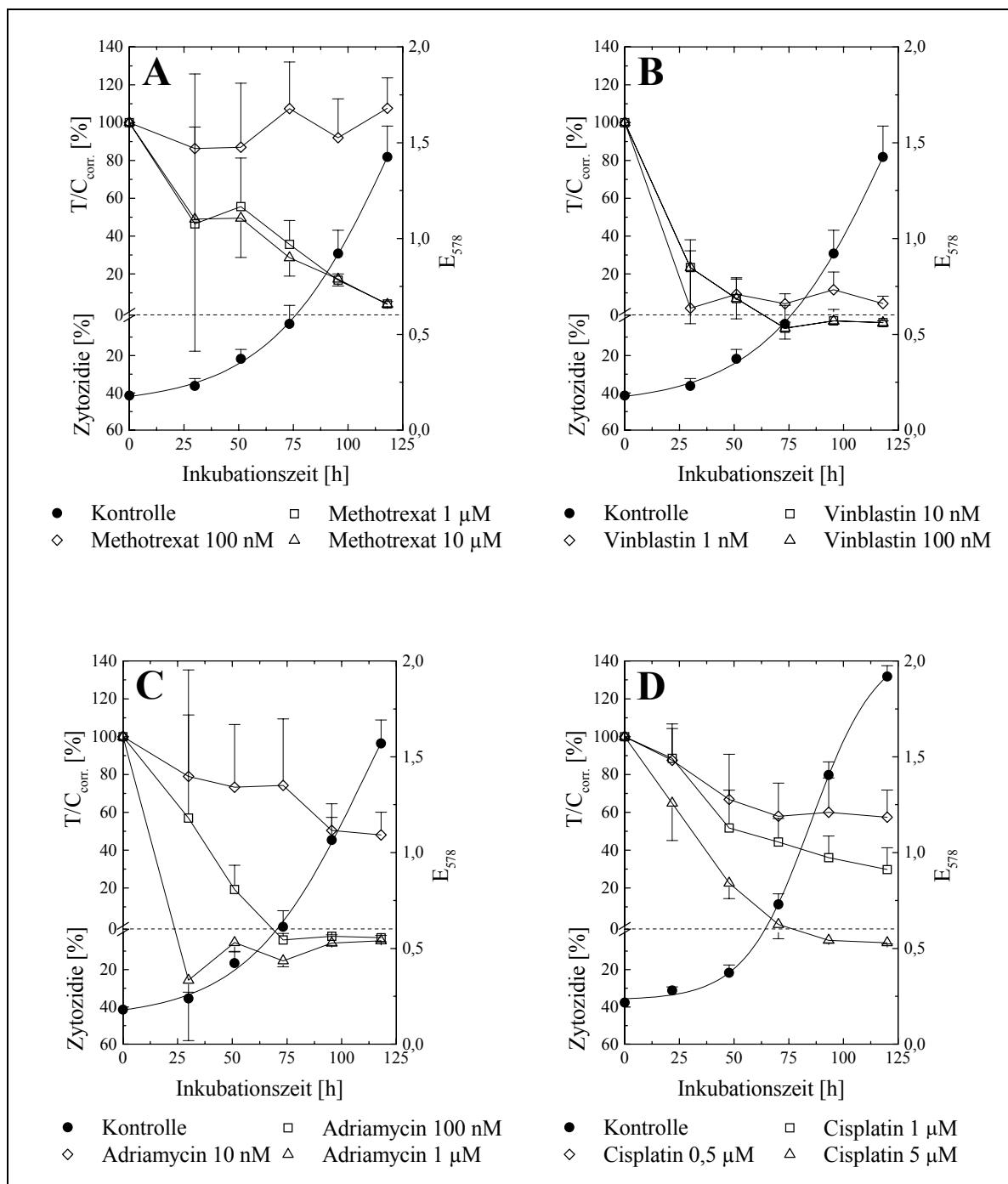


Abbildung 25: Antiproliferative Wirkung verschiedener Zytostatika in unterschiedlichen Konzentrationen auf J82-Zellen (19. Passage) bei Dauerinkubation. A: Methotrexat; B: Vinblastin; C: Adriamycin und D: Cisplatin.

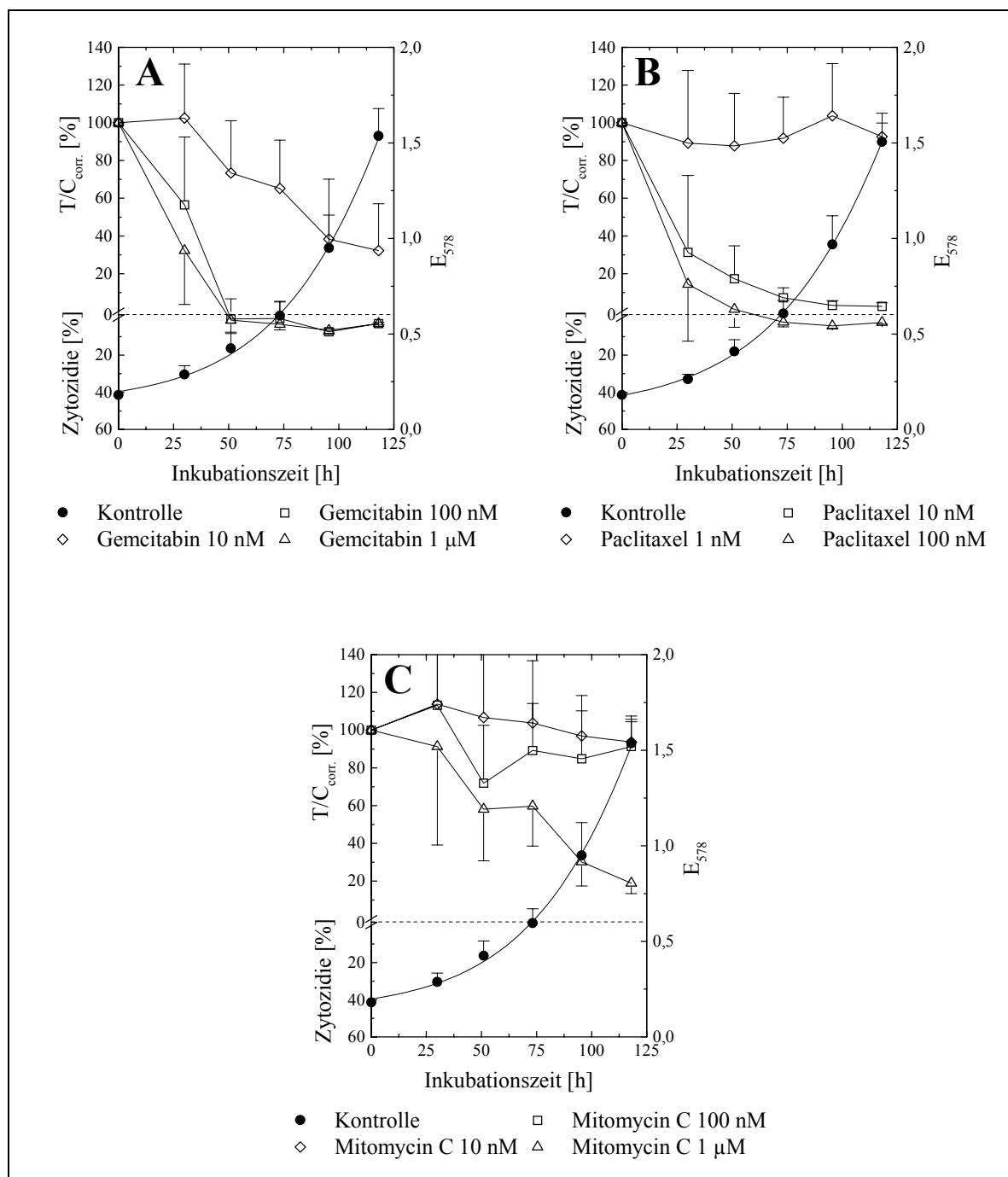


Abbildung 26: Antiproliferative Wirkung verschiedener Zytostatika in unterschiedlichen Konzentrationen auf J82-Zellen (19. Passage) bei Dauerinkubation. A: Gemcitabin; B: Paclitaxel und C: Mitomycin C.

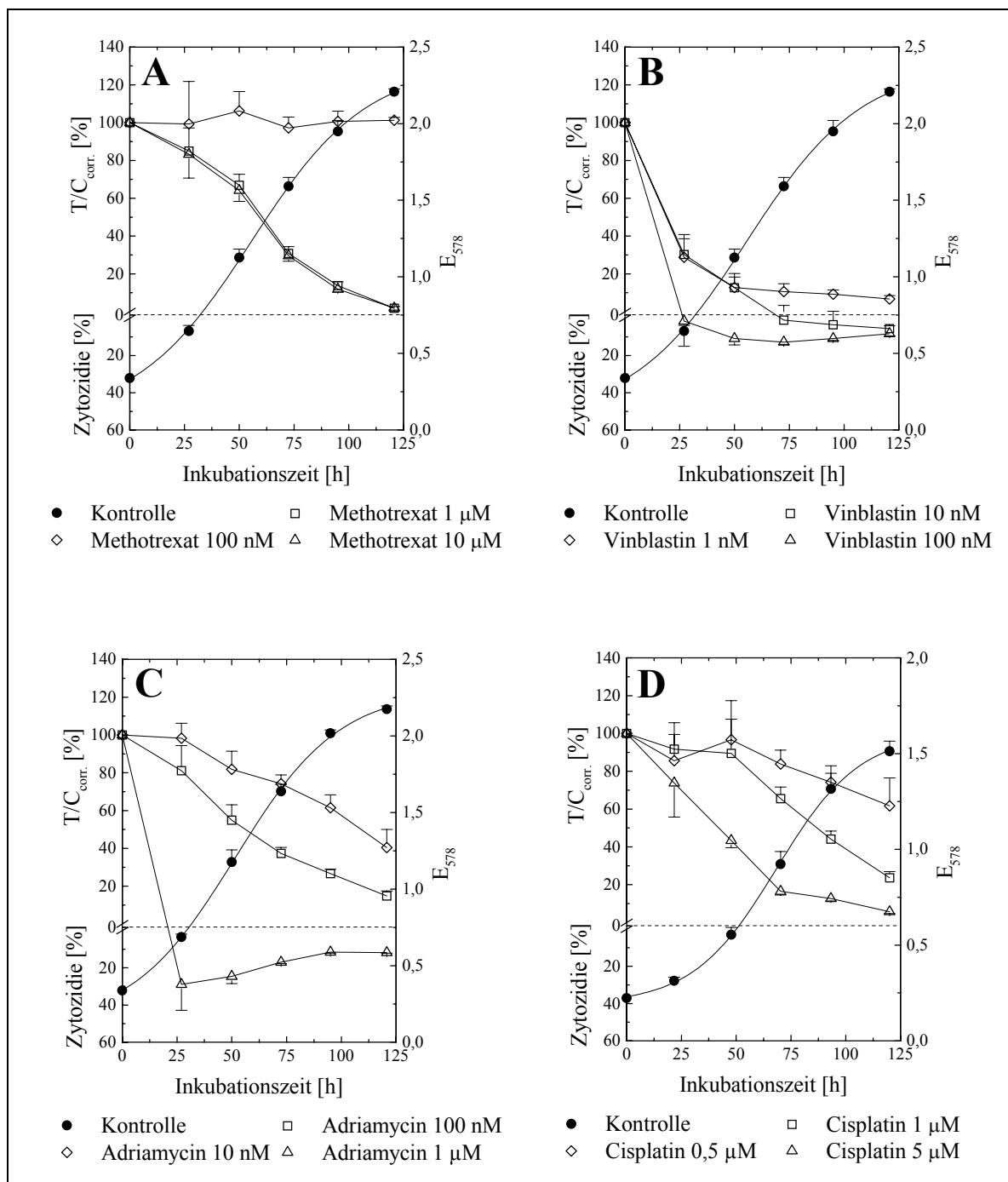


Abbildung 27: Antiproliferative Wirkung verschiedener Zytostatika in unterschiedlichen Konzentrationen auf UROtsa-Zellen (40. Passage) bei Dauerinkubation. A: Methotrexat; B: Vinblastin; C: Adriamycin und D: Cisplatin.

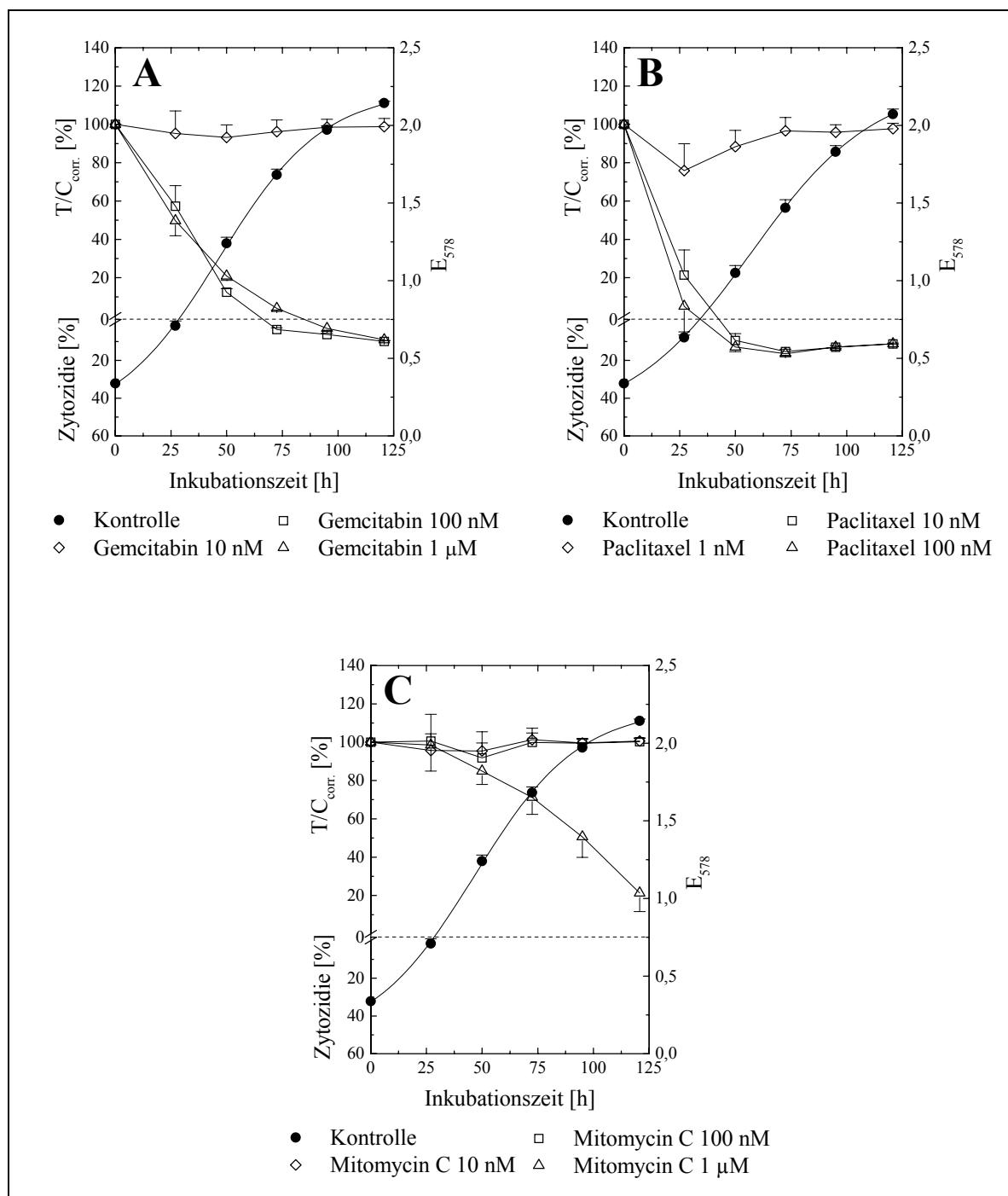


Abbildung 28: Antiproliferative Wirkung verschiedener Zytostatika in unterschiedlichen Konzentrationen auf UROtsa-Zellen (40. Passage) bei Dauerinkubation. A: Gemcitabin; B: Paclitaxel und C: Mitomycin C.

4.1.2 Chemosensitivitätstest in Dauerinkubation

An der J82- und UROtsa-Zelllinie wurde die Wirkung der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2**, dazu vom Porphyrinliganden **L** und der Referenzsubstanz Hämatoporphyrin (**HP**) für die Konzentrationen 0,5 μ M, 1 μ M und 5 μ M untersucht. Abbildung 29 und Abbildung 30 zeigen die entsprechenden Wachstumskurven.

Beide Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** wirken proliferationshemmend bzw. zytozid auf die J82- wie auch auf die UROtsa-Zellen im Dunkeln unter Dauerinkubation. Die J82-Zelllinie, als Modell für ein invasives Harnblasenkarzinom gewählt, ist im Vergleich zur Zelllinie UROtsa, die als Phänotyp normalen Urothels anzusehen ist, gegenüber dem Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** deutlich sensitiver. So nimmt $T/C_{corr.}$ bei **K1**, bei 5 μ M und J82-Zellen auf etwa 1 %, bei 1 μ M auf etwa 25 % und bei 0,5 μ M auf etwa 31 % nach 120 Stunden Dauerinkubation ab. Hingegen ist die antiproliferative Wirkung von **K1** auf UROtsa-Zellen geringer, denn die korrespondierenden $T/C_{corr.}$ -Werte sind bei 5 μ M etwa 35 %, bei 1 μ M etwa 49 % und bei 0,5 μ M etwa 78 %. In beiden Fällen, sowohl für die J82- als auch die UROtsa-Zelllinie, liegt bei **K1** ein ideales Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis vor. Die zum Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** gehörige Platin-Referenzverbindung Cisplatin schädigt jedoch J82- wie auch UROtsa-Zellen im gleichen Maße unabhängig von der eingesetzten Konzentration (siehe Abbildung 25 und Abbildung 27). Der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2** weist in Bezug auf beide Zelllinien ein ähnliches Wirkungsspektrum auf. In allen drei Konzentration zeigt **K2** eine starke antiproliferative Wirkung auf J82- und auf UROtsa-Zellen.

Für den zu den Platinverbindungen gehörigen Porphyrinliganden **L** ist ersichtlich, dass **L** einen geringfügigen zytotoxischen Effekt bei 5 μ M auf J82-Zellen ausübt. Bei den niedrigeren Konzentrationen 0,5 μ M und 1 μ M ist **L** wirkungslos. An der UROtsa-Zelllinie zeigt **L** auch in der höchsten Konzentration von 5 μ M keine wachstumshemmende Wirkung.

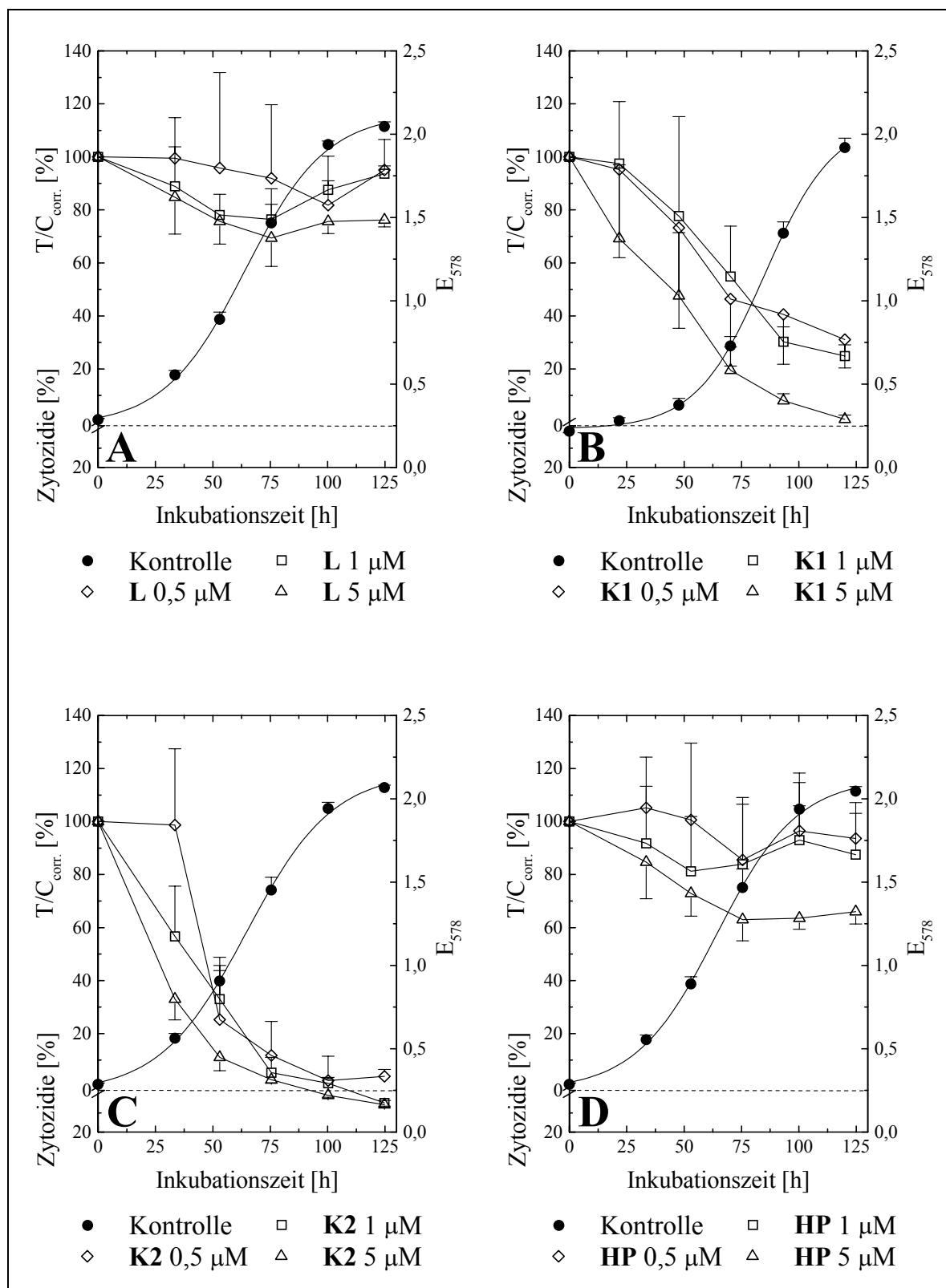


Abbildung 29: Einfluss von **L** (A), **K1** (B), **K2** (C) und Hämatoporphyrin (**HP**, D) auf das Wachstum der J82-Harnblasenkarzinom-Zelllinie (22. Passage) in Dauerinkubation.

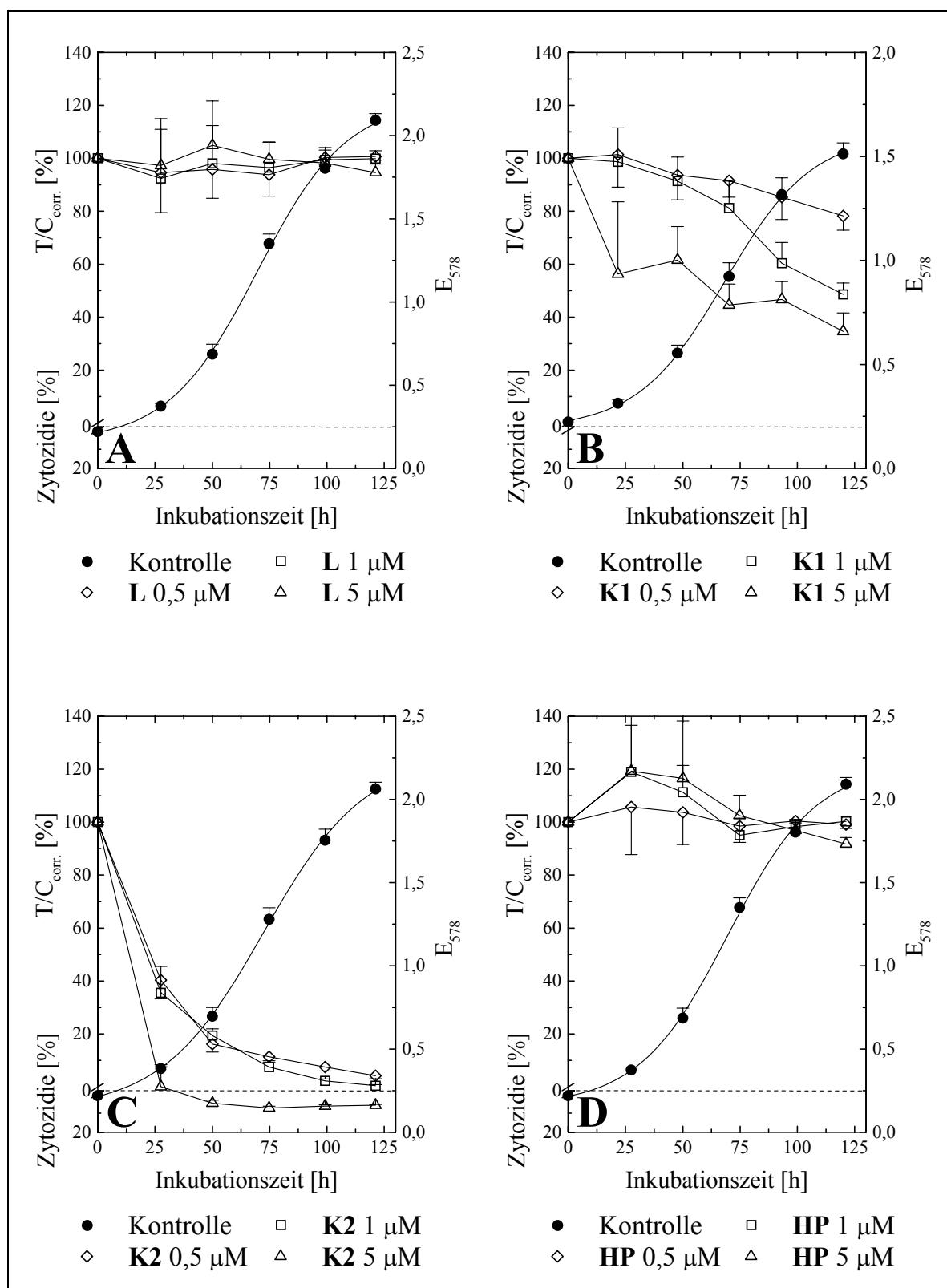


Abbildung 30: Einfluss von **L** (A), **K1** (B), **K2** (C) und Hämato porphyrin (**HP**, D) auf das Wachstum der UROtsa-Zelllinie (42. Passage) in Dauerinkubation.

4.1.3 Untersuchung zur Inaktivierung der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe K1 und K2 im Kulturmedium

Platinkomplexe können mit Nukleophilen reagieren und dadurch inaktiviert werden. Im Chemosensitivitätstest mit Vorinkubation wurde untersucht, wie lange die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** in aktiver Form im Kulturmedium vorliegen. Dazu wurden **K1**, **K2**, Cisplatin (**CP**) und der Porphyrinligand **L** in einer Endkonzentration von 5 μ M im Kulturmedium (EMEM + 5 % FCS) unter Standardbedingungen (wasserdampfgesättigte Atmosphäre mit 5 % CO₂) bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach 2, 6, 12 und 24 Stunden Vorinkubation wurde mit diesen Medien ein Chemosensitivitätstest an J82- und UROtsa-Zellen durchgeführt. Zum Zeitpunkt t = 0 wurden die mit den Substanzen versetzten Medien den Zellkulturen zugegeben. Zum Vergleich wurden die Platinkomplexe auch ohne Vorinkubation im Versuch (0 Stunden) eingesetzt. Dazu wurden die Substanzen unmittelbar vor der Substanzzugabe 1:1000 mit frischem Medium verdünnt und auf eine Endkonzentration von 5 μ M gebracht. Die Aktivitätsveränderungen der Platinkomplexe durch die Vorbehandlung wurde in einer Proliferationskinetik über 120 Stunden verfolgt.

In allen Fällen ist eine Abhängigkeit der Substanzstabilität von der Dauer der Vorinkubation im Kulturmedium zu beobachten. Nach 24-stündiger Vorinkubation nimmt bei allen Substanzen die Wirksamkeit ab (Abbildung 31 und Abbildung 32). Jedoch lässt sich für die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** festhalten, dass ihr Aktivitätsverlust im Vergleich zu Cisplatin bei der J82-Zelllinie deutlich geringer ist (Abbildung 31). In T/C_{corr.}-Werten ausgedrückt bedeutet dies für **K1** eine Erhöhung von ca. 1 % bei 0 Stunden Vorinkubation auf etwa 10 % bei 24 Stunden Vorinkubation. Für **K2** von 4,1 % zytozidem Effekt auf etwa 1 % korrigiertem T/C und für Cisplatin von 5,5 % zytozidem Effekt auf etwa 27 % korrigiertem T/C-Wert. Demnach werden die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe durch Reaktionen mit Nukleophilen im Kulturmedium, wie z. B. Aminosäuren und Serumproteine, langsamer inaktiviert als Cisplatin und sind demnach stabiler.

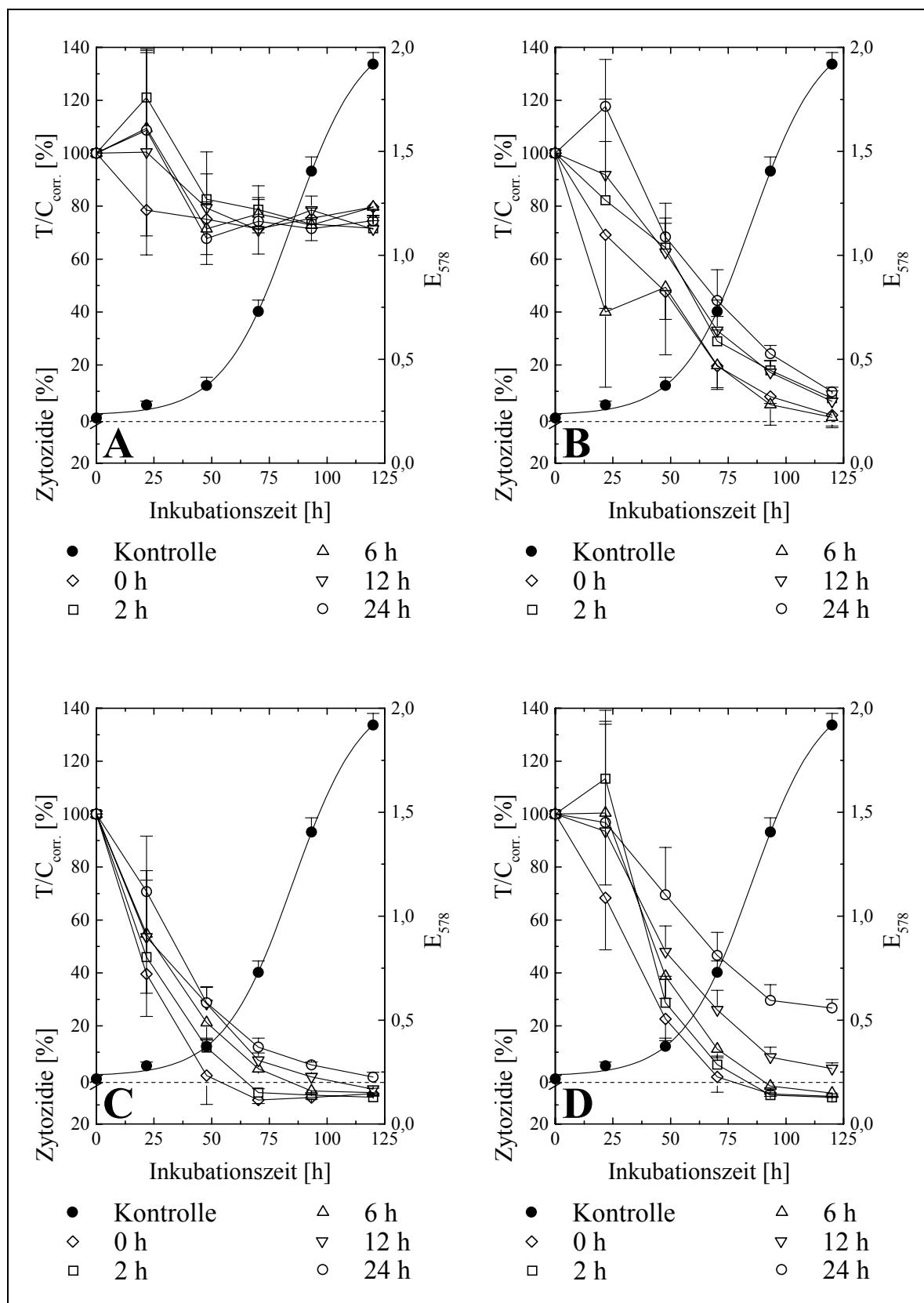


Abbildung 31: Einfluss der Vorinkubation von **L** (A), **K1** (B), **K2** (C) und Cisplatin (D) im Kulturmedium auf deren proliferationshemmende Wirkung an J82-Zellen (23. Passage).

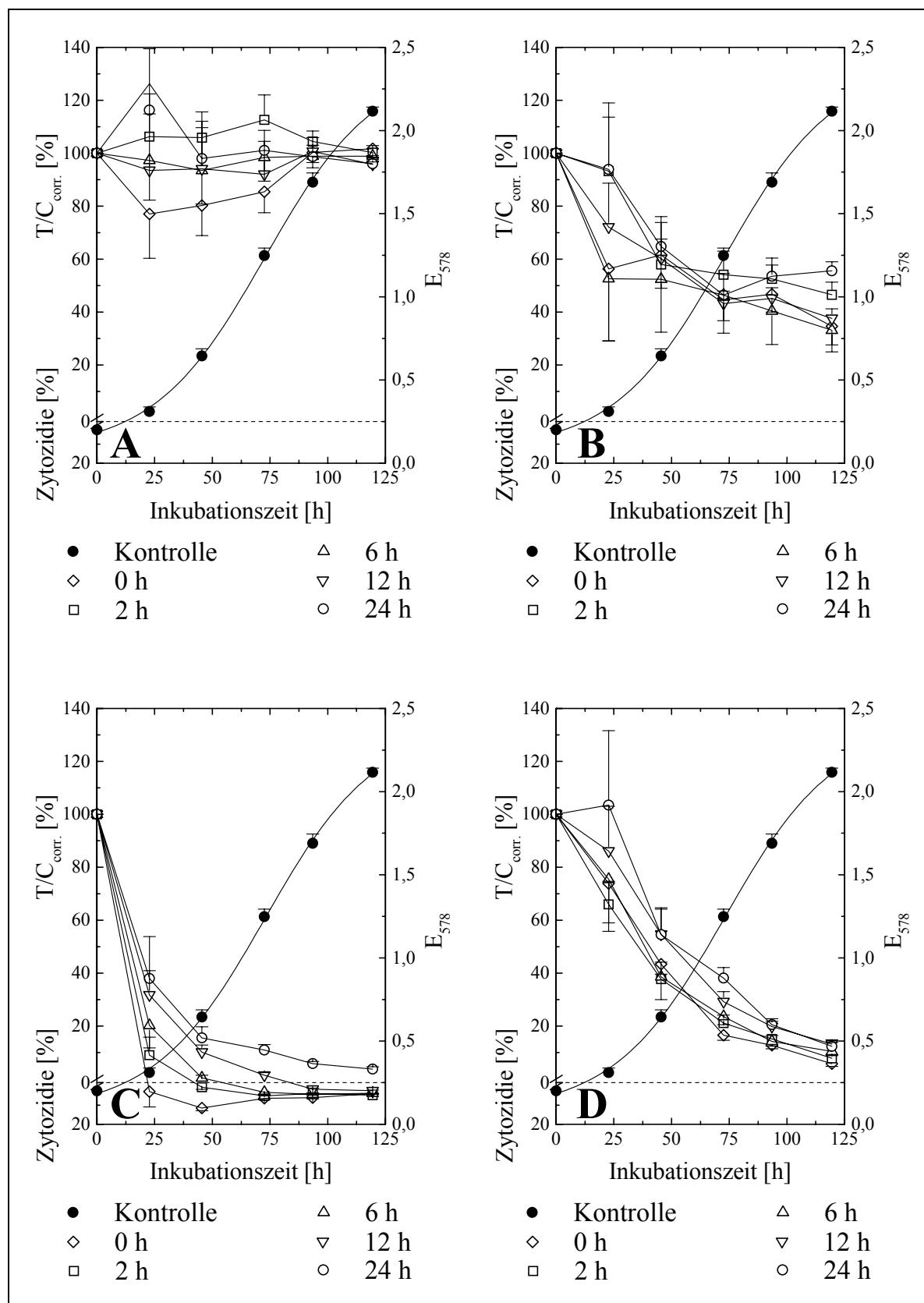


Abbildung 32: Einfluss der Vorinkubation von **L** (A), **K1** (B), **K2** (C) und Cisplatin (D) im Kulturmedium auf deren proliferationshemmende Wirkung an UROtsa-Zellen (43. Passage).

Die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** und Cisplatin zeigen bis zu 6 Stunden Vorinkubation keinen Wirkungsverlust.

Ähnliches lässt sich für die UROtsa-Zelllinie feststellen, wobei auch hier der Aktivitätsverlust von Cisplatin im Rahmen der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** liegt (Abbildung 32). Hervorzuheben ist auch hier in Übereinstimmung mit dem Chemosensitivitätstest bei Dauerinkubation (Abbildung 29 und Abbildung 30), dass **K1** auf J82-Zellen eine deutlich stärkere wachstumshemmende Wirkung aufweist als auf normale urotheliale Zellen. **K2** und Cisplatin schädigen beide Zelllinien in gleichem Maße.

Wie zu erwarten, ist der Porphyrinligand **L** im Bereich des Fehlers unbeeinflusst von der Dauer der Vorinkubation sowohl bei der J82- wie auch bei der UROtsa-Zelllinie.

4.1.4 Chemosensitivitätstests bei Kurzzeitinkubation mit **K1 und **K2****

Zur Untersuchung der für eine Hemmwirkung benötigten Kontaktzeit der Platin-komplexe mit den J82- oder UROtsa-Zellen wurden Zellversuche mit zeitlich be-grenzter Wirkstoffinkubation durchgeführt. Dabei wurden die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** und Cisplatin (**CP**) 3, 6, 12 und 24 Stunden im Dunkeln auf den Zellen belassen und danach durch frisches zytostatikafreies Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen weiter inkubiert. Bei dieser Vorgehensweise hat das Zytostatikum nur die entsprechende Substanzinkubationszeit, um in die Zellen aufgenommen zu werden und diese in ihrem Wachstum zu hemmen. Als Vergleich wurden alle Substanzen auch in Dauerinkubation mitgetestet, d. h. es wurde kein Mediumwechsel durchgeführt. Die erzielten Hemmeffekte wurden wie üblich mit dem Kristallviolett-Assay ermittelt.

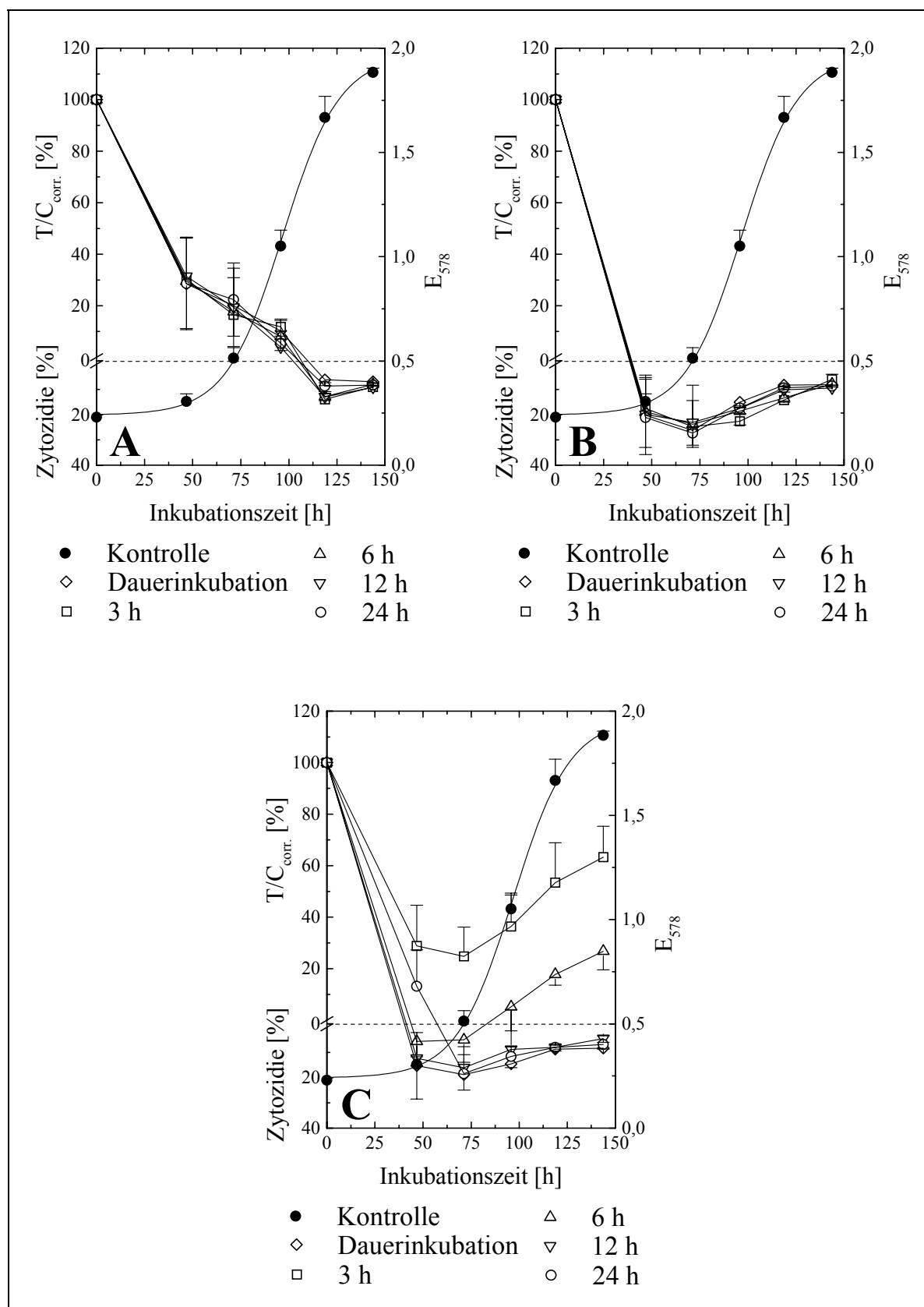


Abbildung 33: Wirkung verschiedener Kurzzeitinkubationen und der Dauerinkubation auf J82-Zellen (24. Passage) mit $5 \mu\text{M}$ **K1** (A), **K2** (B) und Cisplatin (C).

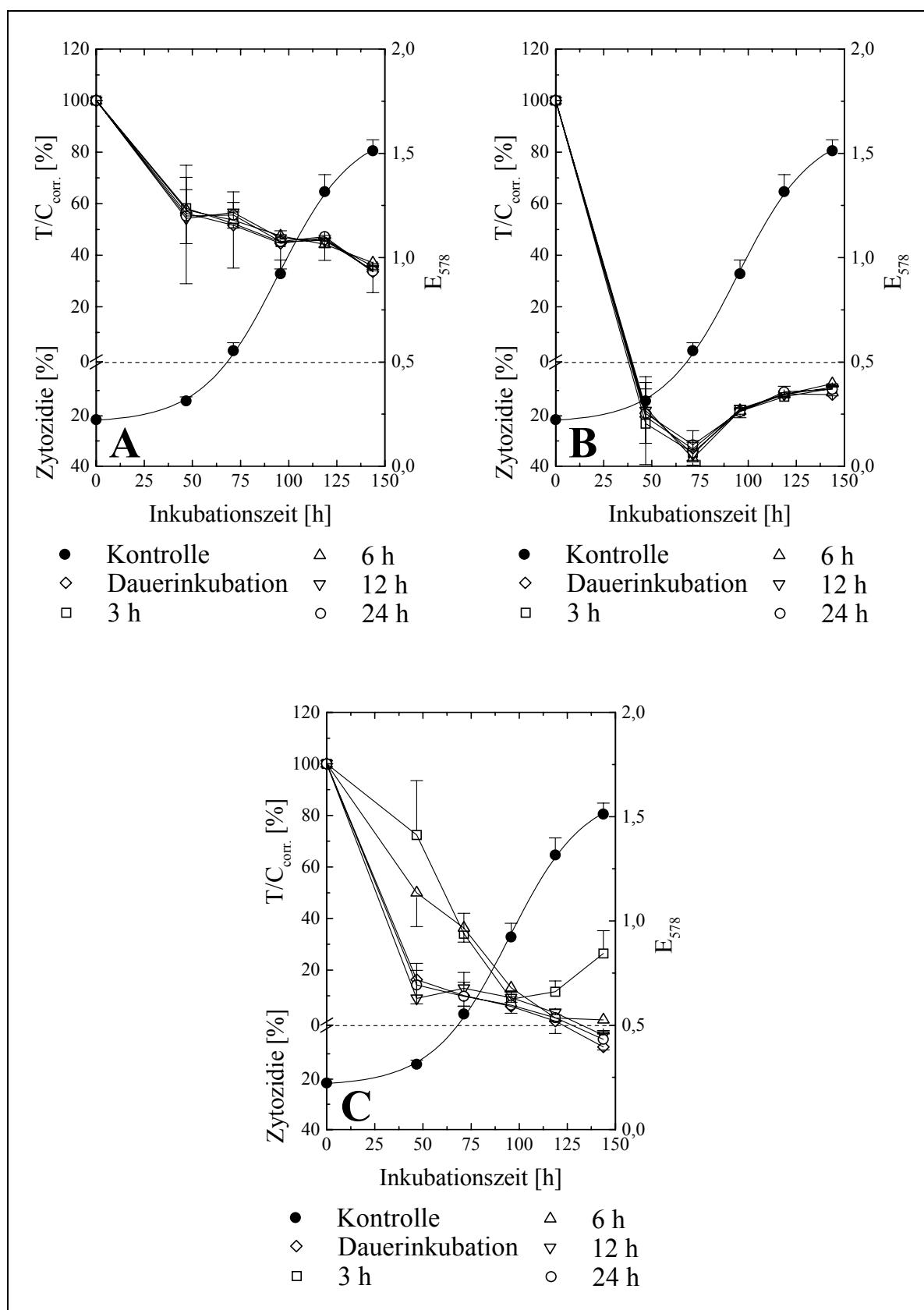


Abbildung 34: Wirkung verschiedener Kurzzeitinkubationen und der Dauerinkubation auf UROtsa-Zellen (47. Passage) mit 5 μ M **K1** (A), **K2** (B) und Cisplatin (C).

Für die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** erhält man für beide Zelllinien nach Reduzieren der Inkubationszeit von Dauerinkubation über 24 Stunden Inkubation bis zu 3 Stunden Inkubation fast identische Hemmverläufe. Die durch 5 μ M **K1** und **K2** nach bereits 3 Stunden verursachten Schäden an den J82- und UROtsa-Zellen bewirkten den vollen wachstumshemmenden Effekt wie bei Dauerinkubation (Abbildung 33 und Abbildung 34).

5 μ M Cisplatin erzielt während der 12- und 24-stündigen Kurzzeitinkubation bei J82-Zellen den vollen zytotoxischen Effekt wie bei Dauerinkubation. Nach 3- bzw. 6-stündiger Einwirkdauer ist Cisplatin jedoch nur noch vorübergehend zytostatisch und nach etwa 75 Stunden Inkubation beginnt die Kultur wieder zu wachsen. Bei Dauerinkubation wurde ein zytotoxischer Effekt nach 140 Stunden Inkubation von etwa 8 % erreicht, wohingegen bei 6 Stunden Kurzzeitinkubation der T/C_{corr.}-Wert etwa 27 % beträgt und bei 3 Stunden 63 % (Abbildung 33). Für die UROtsa-Zelllinie sind die Effekte bei Cisplatin ähnlich, jedoch geringer ausgeprägt. So nimmt hier die antiproliferative Wirkung von Cisplatin bei Dauerinkubation vom zytotoxischen Effekt 7 % hin zur 3-stündiger Inkubation auf einen T/C_{corr.}-Wert von etwa 26 % ab (Abbildung 34).

Sowohl bei der invasiven Harnblasenkarzinom-Zelllinie als auch bei den normalen urothelialen Zellen wirken die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** schneller als Cisplatin. D. h., dass das in der Klinik bereits verwendete Zytostatikum Cisplatin mehr Zeit als die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe benötigt, um die volle Wirkung zu entfalten.

4.1.5 Antiproliferative Wirkung der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe an humanen Zellen mit und ohne Bestrahlung

Zusätzlich zur Dunkeltoxizität wurden für die Untersuchung der photodynamischen Effektivität sowohl J82- als auch UROtsa-Zellen nach Porphyrin-Platin(II)-Komplex-Inkubation mit Licht der Wellenlänge 600 bis 730 nm und einer Energiedosis von 24 J/cm^2 bestrahlt. Als Vergleich zu **K1** und **K2** wurden auch der Porphyrinligand **L**, Cisplatin, Hämatoporphyrin und eine Mischung aus Cisplatin und Hämatoporphyrin bei einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ getestet. 24 Stunden nach der Substanzzugabe erfolgt die Bestrahlung analog Kapitel 3.2.

Parallel zu den Bestrahlungsversuchen wurden immer unbestrahlte 96-Loch-Mikrotiterplatten mitgeführt. Diese sogenannten Dunkelkontrollen wurden mit Ausnahme der Bestrahlung gleich behandelt.

In den folgenden Wachstumskurven bedeutet *u* unbestrahlt und *b* bestrahlt. Die Bezugswachstumskurve ist die Kontrolle auf den unbestrahlten 96-Loch-Mikrotiterplatten, angegeben als Extinktion E_{578} . Überprüft wurde die Richtigkeit der Chemosensitivitätstests mit Bestrahlung durch Bildung des Quotienten aus bestrahlter und unbestrahlter Kontrolle für jeden genommenen Zeitpunkt, der einen Wert von etwa 100 % besitzen muss. Der erste Zeitpunkt der Kinetik wurde sofort nach der Bestrahlung genommen. Alle weiteren folgten in Abständen von etwa 24 Stunden.

Wie in Abbildung 35B gezeigt, beeinflusste Hämatoporphyrin, die Referenzsubstanz für den photodynamischen Effekt, die Proliferation der J82-Zellen weder im Dunkeln noch nach Bestrahlung. Für den Porphyrinliganden **L** (Abbildung 35A) wurde ebenfalls keine intrinsische Toxizität festgestellt. Hingegen wurde durch **L** ein Reduzierung der Zellmasse durch 10-minütiges Bestrahlen mit inkohärentem Licht hervorgerufen, was in einer Zytostase mit einem T/C_{corr} -Wert von etwa 80 % resultierte.

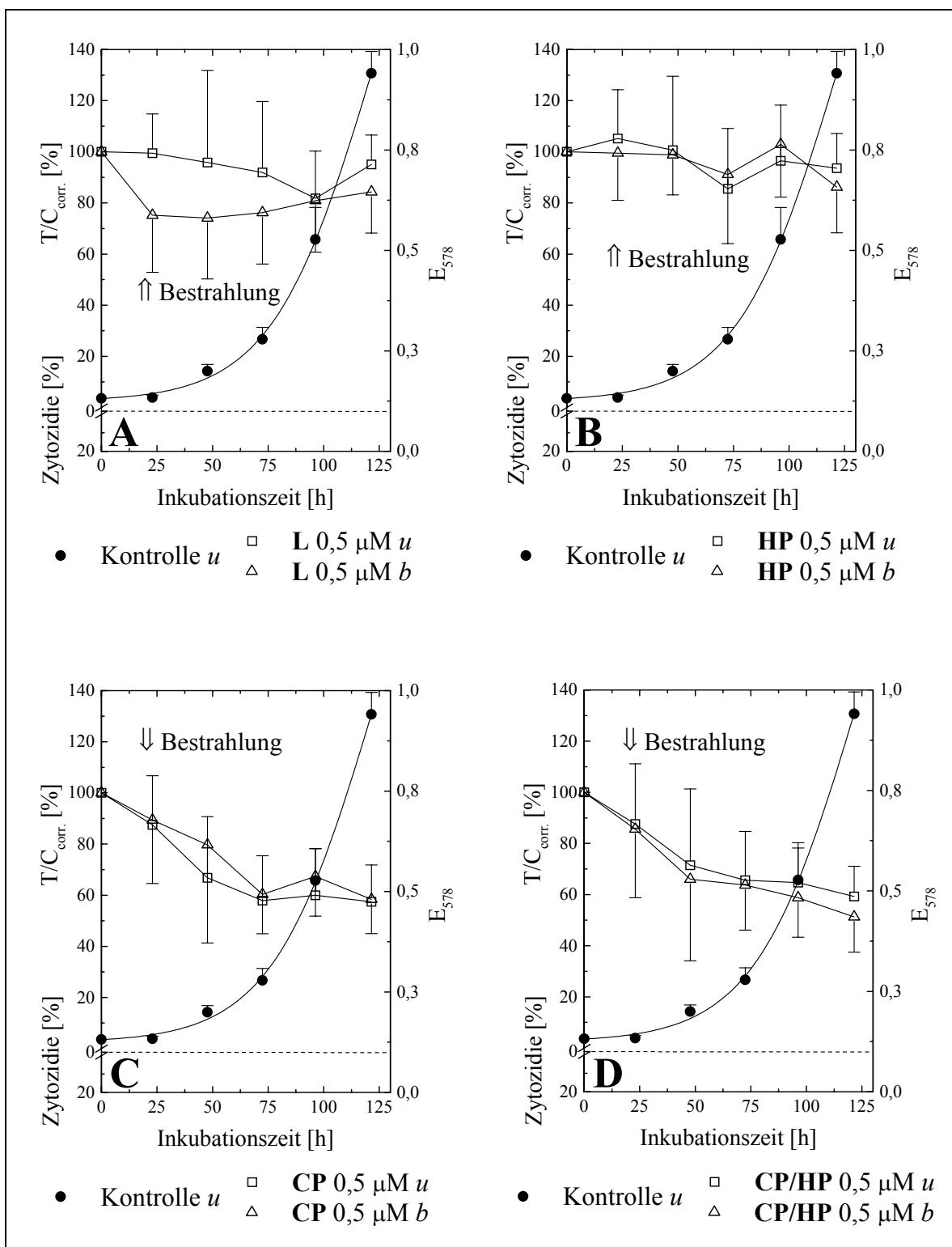


Abbildung 35: Dauerinkubationstest mit Bestrahlung: Einfluss des Porphyrinliganden **L** (A), von Hämatoporphyrin (**HP**, B), Cisplatin (**CP**, C) und einer Mischung aus Cisplatin und Hämatoporphyrin (**CP/HP**, D) auf das Wachstum der J82-Harnblasenkarzinom-Zellen (23. Passage). u: unbestrahlt; b: bestrahlt.

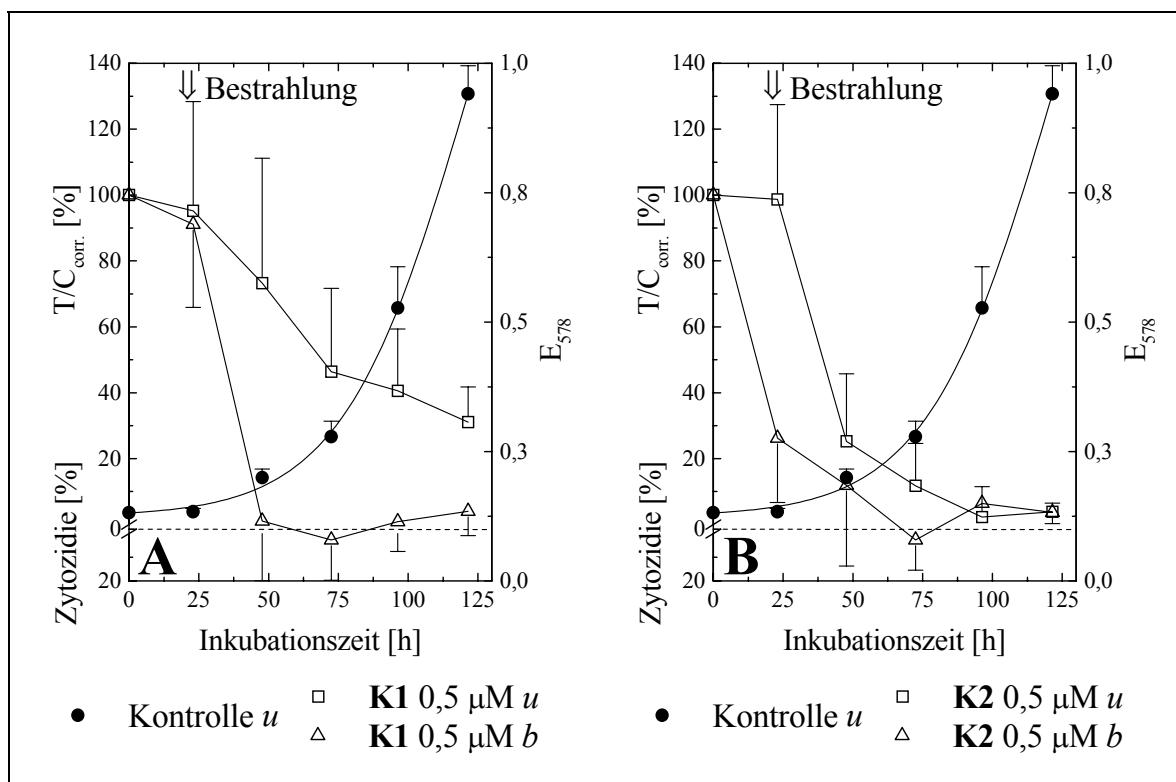


Abbildung 36: Dauerinkubationstest mit Bestrahlung: Einfluss der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** (A) und **K2** (B) auf das Wachstum der J82-Harnblasenkarzinom-Zellen (23. Passage). u: unbestrahlt; b: bestrahlt.

Die Vergleichssubstanz für den zytotoxischen Effekt Cisplatin (Abbildung 35C) weist im Chemosensitivitätstest die erwartete Unabhängigkeit von der Bestrahlung auf. Während des Experiments fiel der T/C_{corr.}-Wert von 100 % auf etwa 60 % aufgrund der Zytotoxizität von Cisplatin. Ähnliche Toxizitäten wurden für die Mischung aus 0,5 μM Cisplatin und 0,5 μM Hämatoporphyrin gemessen (Abbildung 35D). Vergleicht man die Hemmkurven aus Abbildung 35B, C und D, so zeigt sich, dass kein Wirkungs synergismus für die Cisplatin/Hämatoporphyrin-Mischung mit Bestrahlung vorliegt. Der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** zeigt im Dunkeln eine höhere Zytotoxizität auf als Cisplatin (Abbildung 36A). Nach Bestrahlung von **K1** ist ein starker Anstieg der Zytotoxizität feststellbar, was sich durch den steilen Abfall der T/C_{corr.}-Kurve unmittelbar nach der Bestrahlung äußert. Dabei wurde die Anzahl der J82-Zellen bei Bestrahlung auf die Anzahl der Zellen zu Beginn des Ex-

periments (C_0) reduziert. Die lichtinduzierte wachstumshemmende Wirksamkeit des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes **K1** übersteigt die Summe aus der Phototoxizität des zu **K1** gehörigen Liganden **L** und der Zytotoxizität von Cisplatin (Abbildung 35A, C und Abbildung 36A).

Für den Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2** lässt sich auch eine deutliche Hemmung des Wachstums der J82-Harnblasenkarzinom-Zelllinie aufgrund der Bestrahlung mit einer Energiedichte von 24 J/cm^2 feststellen. Jedoch gleichen sich die Zellzahlen im Verlaufe des Chemosensitivitätstests von Bestrahlung und Nicht-Bestrahlung an (Abbildung 36B). Somit verliert sich der phototoxische Effekt nach etwa 100 Stunden Versuchszeit und der antiproliferative Effekt wird nur noch von der intrinsischen Toxizität des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes **K2** hervorgerufen.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch im Chemosensitivitätstest mit den UROtsa-Zellen erhalten. Auch hier sind die photodynamischen Effekte des Porphyrinliganden **L** (Abbildung 37A) und Hämatoporphyrins (Abbildungen 37B und D) wenig ausgeprägt. Wie erwartet, unterscheidet sich die Proliferation der bestrahlten Zellpopulation in Anwesenheit von $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin nicht von den unbestrahlten Zellen. In beiden Fällen entspricht die resultierende Wachstumshemmung in etwa der bei den J82-Zellen. Wie bei den J82-Zellen lässt sich auch bei den UROtsa-Zellen ein synergistischer Effekt, der aus den zytostatischen und phototoxischen Eigenschaften des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes **K1** resultiert, feststellen (Abbildung 38A). Zwei Unterschiede von J82- zu UROtsa-Zellen sind jedoch auffällig. Zum einen erholen sich die UROtsa-Zellen viel schneller als die Harnblasenkarzinom-Zellen, was sich im steilen Anstieg der bestrahlten $T/C_{\text{corr.}}$ -Kurve zeigt (Abbildung 36A und Abbildung 38A). So steigt der $T/C_{\text{corr.}}$ -Wert bei den J82-Zellen von etwa 1 % bei 50 Stunden Inkubation auf lediglich 4 % bei 120 Stunden Inkubation, bei den UROtsa-Zellen aber von einem $T/C_{\text{corr.}}$ -Wert von etwa 33 % bei 50 Stunden Inkubation auf 70 % bei 120 Stunden Inkubation. Zum anderen zeigen auch diese $T/C_{\text{corr.}}$ -Werte, dass die J82-Zellen im Ganzen weitaus stärker geschädigt werden als die UROtsa-Zellen, die als Phänotyp für normales urotheliales Gewebe anzusehen sind.

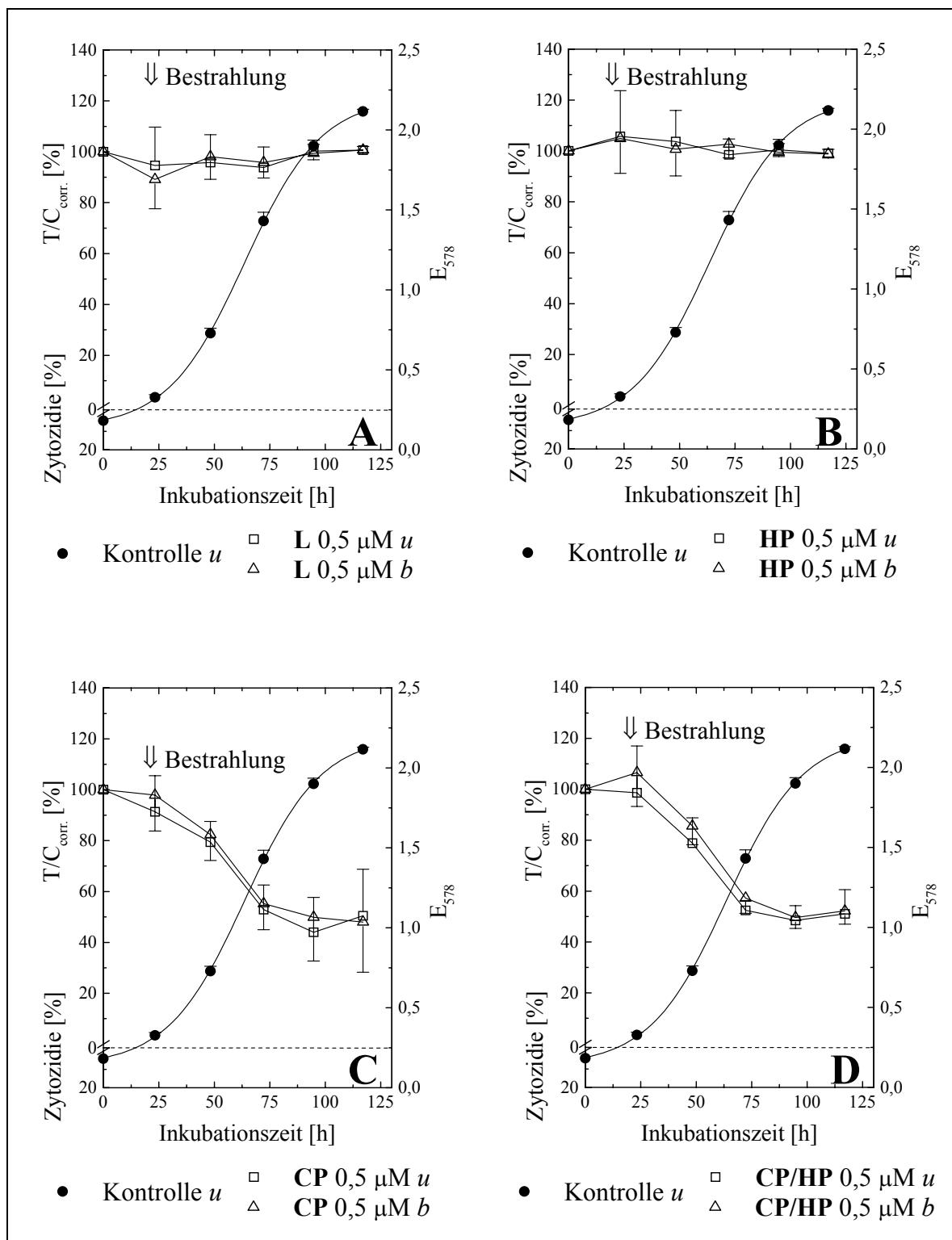


Abbildung 37: Dauerinkubationstest mit Bestrahlung: Einfluss des Porphyrinliganden **L** (A), von Hämatoxylin (HP, B), Cisplatin (CP, C) und einer Mischung aus Cisplatin und Hämatoxylin (CP/HP, D) auf das Wachstum der UROtsa-Zellen (44. Passage). u: unbestrahlte; b: bestrahlte.

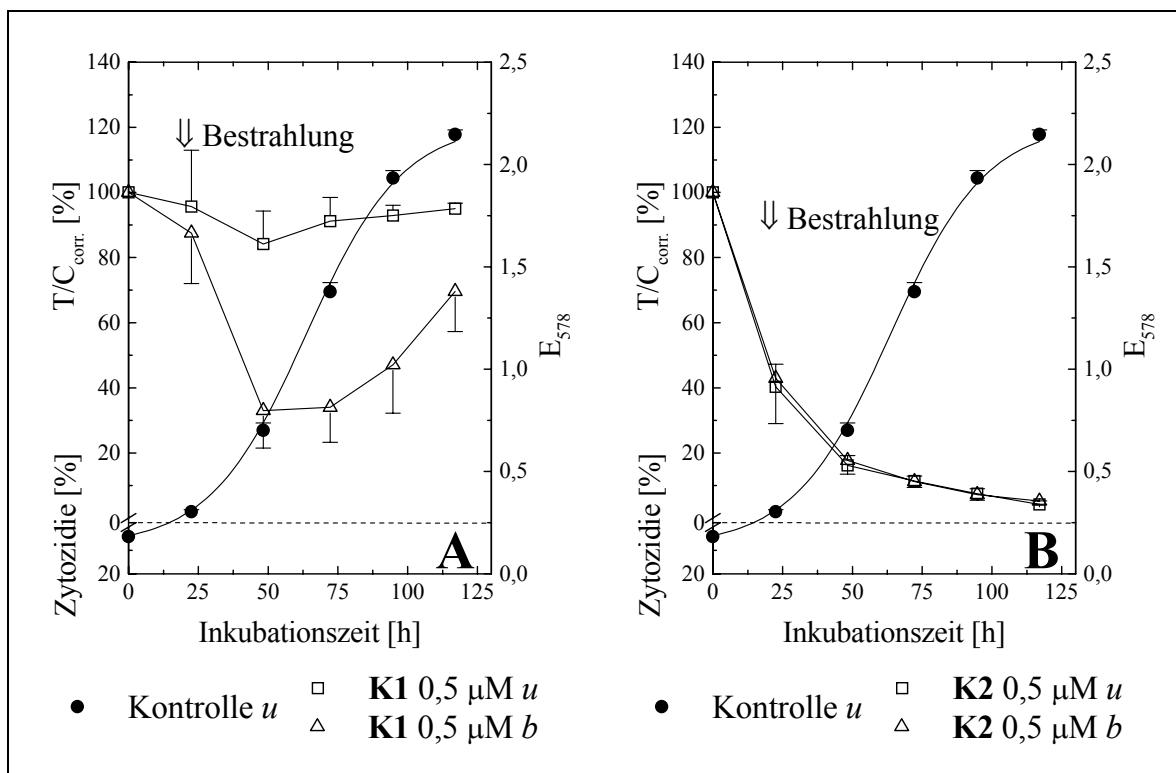
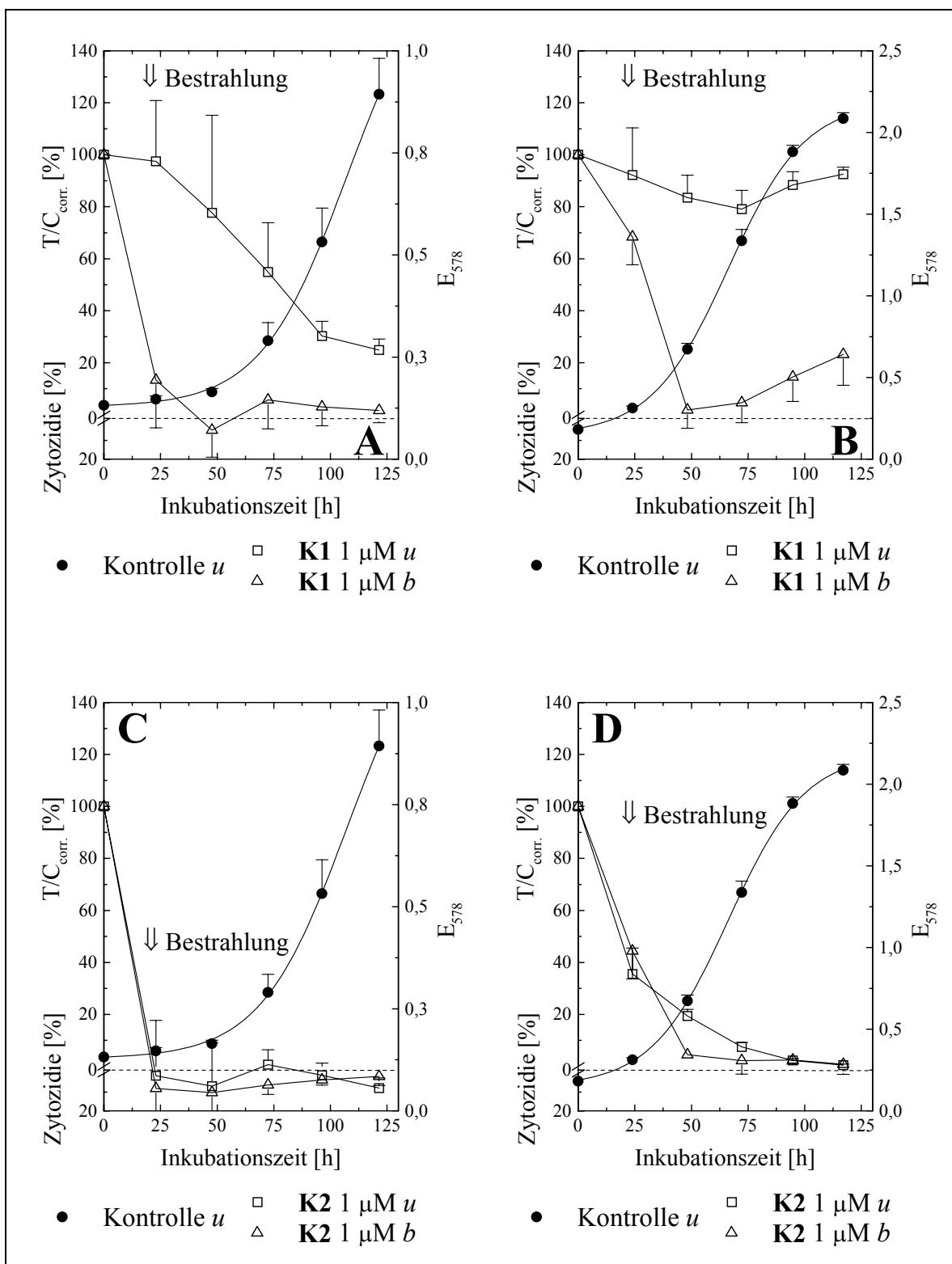


Abbildung 38: Dauerinkubationstest mit Bestrahlung: Einfluss der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** (A) und **K2** (B) auf das Wachstum der UROtsa-Zellen (44. Passage). u: unbestrahlt; b: bestrahlt.

Der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2** weist im Falle der UROtsa-Zellen keinen phototoxischen Effekt (Abbildung 38B) auf.

Eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration von 0,5 μM auf 1 μM bewirkt keine weitere Wirkverbesserung. So zeigt der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** bei den J82-Zellen (Abbildung 39A) und den UROtsa-Zellen (Abbildung 39B) ebenfalls den ausgeprägten phototoxischen Effekt, jedoch sind die Wirkunterschiede bei 1 μM weniger verschieden als bei der Substanzkonzentration von 0,5 μM .

So werden die UROtsa-Zellen nach 50 Stunden Inkubationszeit ähnlich stark geschädigt wie die Harnblasenkarzinom-Zellen und außerdem erholen sich die UROtsa-Zellen hiervon auch langsamer als bei dem Chemosensitivitätstest mit 0,5 μM Wirkstoffkonzentration (Abbildung 38A).



*Abbildung 39: Dauerinkubationstest mit Bestrahlung: Einfluss der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** auf das Wachstum der J82-Zellen (A und C) (23. Passage) und UROtsa-Zellen (B und D) (44. Passage). u: unbestrahlt; b: bestrahlt.*

Wie beim Chemosensitivitätstest mit der Endkonzentration von 0,5 μM zeigt der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2** bei 1 μM Konzentration keinen phototoxischen Effekt zusätzlich zur zytotoxischen Eigenschaft der Platinverbindung (Abbildungen 39C und D).

4.1.6 Zusammenfassung der Zellkulturexperimente

Aus den ersten Zellkulturexperimenten (Kapitel 4.1.1) zur Erschließung der Sensitivität der Harnblasenkarzinom-Zelllinie J82 und der UROtsa-Zelllinie, normalen urothelialen Zellen, mit verschiedenen, in der Klinik zur Behandlung von Harnblasenkarzinom bereits verwendeten oder experimentell untersuchten Zytostatika, ging hervor, dass beide Zelllinien für alle Chemotherapeutika ähnliche Wirkungsspektren zeigen (Abbildungen 25 bis 28). Dies verwundert nicht, da Zytostatika im allgemeinen wenig selektiv gegenüber Tumorzellen sind und sich von daher auch die zum Teil gravierenden Nebenwirkungen bei einer chemotherapeutischen Behandlung von Tumorerkrankungen erklären lassen. Somit sollte eine Erhöhung der Selektivität unter anderem eine Verbesserung der Verträglichkeit einer Chemotherapie zur Folge haben.

Die beiden Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** weisen im Zellkulturexperiment mit Dauerinkubation eine ähnlich wachstumshemmende Wirkung wie Cisplatin bei den Konzentrationen 0,5 μM , 1 μM und 5 μM auf (Abbildungen 25 und 29). Jedoch reagiert die J82-Tumorzelllinie deutlich sensitiver auf den Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** als die UROtsa-Zellen. So werden in etwa 30-50 % mehr Tumorzellen geschädigt als normale Zellen (Abbildungen 29 und 30). Die Referenzverbindung Cisplatin schädigt jedoch J82- wie auch UROtsa-Zellen in gleichem Maße, unabhängig von der eingesetzten Konzentration (Abbildungen 25 und 27).

Zu bedenken ist, dass der zu den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen **K1** und **K2** gehörige Ligand **L** in der höchsten getesteten Konzentration von 5 μM auf J82-Zellen einen geringen zytotoxischen Effekt ausübt. Bei den niedrigeren Konzentrationen

0,5 μ M und 1 μ M für J82 und bei UROtsa im gesamten untersuchten Bereich weist L keine Toxizität auf (Abbildungen 29 und 30).

Platinkomplexe gehen unter „biologischen“ Bedingungen Substitutionsreaktionen ein, die entweder eine Aktivierung und dadurch eine Antitumorwirkung auslösen (siehe Kapitel 1.2.3) oder eine Inaktivierung des Platinkomplexes hervorrufen. Die Reaktivität der Platinkomplexe gegenüber Biomolekülen wird durch die Liganden an den Platinverbindungen bestimmt. Zur Untersuchung der Inaktivierung der Platinkomplexe im Kulturmedium wurden die Verbindungen in einer Endkonzentration von 5 μ M unterschiedlich lange mit frischem Medium (EMEM + 5 % FCS) bei 37 °C, 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre vorinkubiert. Anschließend wurde die Aktivitätsveränderung durch diese Vorbehandlung im Chemosensitivitätstest an J82- und UROtsa-Zellen verfolgt (Abbildungen 31 und 32). Generell lässt sich festhalten, dass der Aktivitätsverlust der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** geringer ist als der von Cisplatin, d. h. die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe werden durch mögliche Substitutionsreaktionen im Kulturmedium langsamer inaktiviert als die Referenzverbindung Cisplatin.

Die Chemosensitivitätstests mit Kurzzeitinkubation zeigen, dass für die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** unabhängig von der Zelllinie im Prinzip eine 3-stündige Substanzinkubation gefolgt von einem Mediumwechsel zu zytostatikafreien Bedingungen zur vollen Entfaltung der antiproliferativen Wirkung ausreicht (Abbildungen 33 und 34). Anders verhält es sich bei der klinischen Referenzverbindung Cisplatin. Hier nimmt im Falle der J82-Zellen die Wirkung von einem zytosiden Effekt bei Dauerinkubation nach 140 Stunden Inkubationzeit von etwa 8 % auf einen T/C_{corr.}-Wert von 63% ab. Um bei Cisplatin eine ähnliche Wirkung wie bei Dauerinkubation zu erhalten, muss die Platinverbindung mindestens 12 Stunden auf die Zellen einwirken (Abbildung 33).

Im Chemosensitivitätsassay mit Bestrahlung (λ = 600-730 nm, 10 min, 24 J/cm²) zeigte der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** bei einer Konzentration von 0,5 μ M

einen synergistischen Wirkeffekt im Vergleich zu Cisplatin, Hämatoporphyrin und einer Mischung der beiden Referenzverbindungen (Abbildungen 35B, C, D und 36A). Ein Vergleich der Wirkspektren von **K1** auf J82- und UROtsa-Zellen macht deutlich, dass auch bei Hinzunahme der Phototoxizität des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes die normalen urothelialen Zellen deutlich weniger stark geschädigt werden als die Tumorzellen (Abbildungen 36A und 38A). So beträgt der maximale antiproliferative Effekt aus Dunkel- und lichtinduzierter Toxizität von **K1** auf J82-Zellen mit einem $T/C_{corr.}$ -Wert von 1 %, wobei dieser bei der UROtsa-Zelllinie 33 % ist. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass sich die UROtsa-Zellen von der Bestrahlung weitaus besser erholen als die Tumorzellen. Am deutlichsten waren diese Effekte bei einer Wirkstoffkonzentration von 0,5 μM ausgeprägt. Eine Erhöhung auf eine Substanzkonzentration von 1 μM bewirkte keine Wirkverbesserung. Statt dessen nahm die Wirkselektivität von Tumorzellen zu Normalzellen sogar ab (Abbildung 39). In allen Bestrahlungsexperimenten zeigte der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2** nur geringe phototoxische Eigenschaften (Abbildungen 36B, 38B und 39C, D).

Insgesamt betrachtet weisen die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe, insbesondere **K1**, bessere Wirkeigenschaften als die Referenzverbindungen Cisplatin und Hämatoporphyrin auf. Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie, der Durchflusszytometrie und weiteren Analysemethoden sollen nun weitere Eigenschaften der neuen Photosensibilisatoren mit intrinsischer Zytotoxizität im Hinblick auf Aufnahmeverhalten, intrazelluläre Lokalisation usw. untersucht werden. Noch bleibt auch die Frage zu klären, warum der klinisch bereits eingesetzte Photosensibilisator Hämatoporphyrin und auch der Porphyrinligand **L** in diesen Chemosensitivitätstests nahezu keine phototoxischen Effekte zeigten.

4.2 Fluoreszenzgestützte Untersuchungen zum Aufnahmeverhalten der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe in J82- und UROtsa-Zellen

4.2.1 Fluoreszenzspektroskopische Quantifizierung des zellassoziierten Porphyrins

Die photodynamische Therapie führt über oxidative Prozesse (Typ II-Reaktionen) zur Zellschädigung und schließlich zum Zelltod. Eine Schlüsselrolle hierin spielt der Singulett-Sauerstoff, der nach Lichtanregung und Energieübertrag durch das Porphyrinsystem gebildet wird. Der Grad der Zellschädigung ist damit eine Funktion aller Parameter, die die Bildung von Singulett-Sauerstoff beeinflussen, wie z.B. die Verfügbarkeit des Porphyrinsystems in der Zelle. Die Menge an intrazellulärem Sensibilisator ist einer der wesentlichen Faktoren, die die Wirksamkeit der photodynamischen Behandlung beeinflussen. Der Quantifizierung des zellulär vorhandenen Porphyringehalts kommt damit eine ganz zentrale Rolle bei der Charakterisierung der photodynamischen Behandlung zu.

Für die Quantifizierung des zellulären Porphyringehalts wurden die J82- und UROtsa-Zellen mit einer Konzentration von 0,5 µM bzw. 5 µM **L**, **K1**, **K2** und Hämatoporphyrin im Kulturmedium verschieden lange inkubiert, anschließend geerntet, mit 1,0 M Perchlorsäure und Methanol (1/1; v/v) umgesetzt und fluoreszenzspektrophotometrisch vermessen.

Um die zellassoziierte Porphyrinmenge exakt berechnen zu können, müssen einige zellspezifische Größen bekannt sein. Durch Bestimmung der Zellzahl (Neubauer-Zählkammer) und des Gesamtproteingehalts unterschiedlicher Zellsuspensionen wurde für die J82- und UROtsa-Zelllinie der mittlere Proteingehalt einer einzelnen Zelle errechnet. Diese Korrelation ermöglicht eine routinemäßige, schnelle und einfache Bestimmung der Zellzahl in einer unbekannten Zellsuspension über die Messung des Proteingehalts. Mit zusätzlicher Kenntnis des mittleren Zellvolumens

(bestimmbar mit Hilfe eines Pulslängenanalysegerätes (CASY 1)) (Tabelle 8) und des über Fluoreszenzspektrometrie bestimmten Porphyringehalts einer Probe lässt sich die zellassoziierte Porphyrinkonzentration $c_{\text{Por.}, Z}$ berechnen:

$$c_{\text{Por.}, Z} = \frac{\frac{n_{\text{Por.}, \text{Fluoreszenz}}}{w_{\text{Pr.}, Z} \cdot 4,9 \cdot \bar{V}_Z} \cdot 10^{-3} [\text{M}]}{\bar{m}_{\text{Pr.}, Z}}$$

mit

$n_{\text{Por.}, \text{Fluoreszenz}}$ = die durch Fluoreszenz in der Küvette ermittelte Stoffmenge an Porphyrin in nmol

$w_{\text{Pr.}, Z}$ = Proteingehalt aus der Proteinbestimmung in $\mu\text{g ml}^{-1}$

\bar{V}_Z = mittleres Volumen einer J82- oder UROtsa-Zelle in pl

$\bar{m}_{\text{Pr.}, Z}$ = mittlere Proteinmasse in einer J82- oder UROtsa-Zelle in pg.

Für die J82- und UROtsa-Zelllinie gelten folgende Zellparameter:

Tabelle 8: Parameter zur Berechnung der zellassoziierten Porphyrinkonzentration.

Zelllinie (Passage)	Mittlerer Zell- durchmesser [μm]	Mittleres Zell- volumen [pl]	Proteingehalt pro Zelle [pg]	Zellvolumen pro Proteingehalt [pl/ng]
J82 (36)	$16,90 \pm 0,10$	$2,879 \pm 0,062$	$186,3 \pm 17,4$	15,45
UROtsa (31)	$13,43 \pm 0,12$	$1,504 \pm 0,076$	$108,0 \pm 12,8$	13,93

In Abbildung 40 und Abbildung 41 ist die detektierte zellassoziierte Porphyrinmenge nach Inkubation mit **L**, **K1**, **K2** und Hämatoporphyrin in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für die Zelllinien J82 und UROtsa abgebildet.

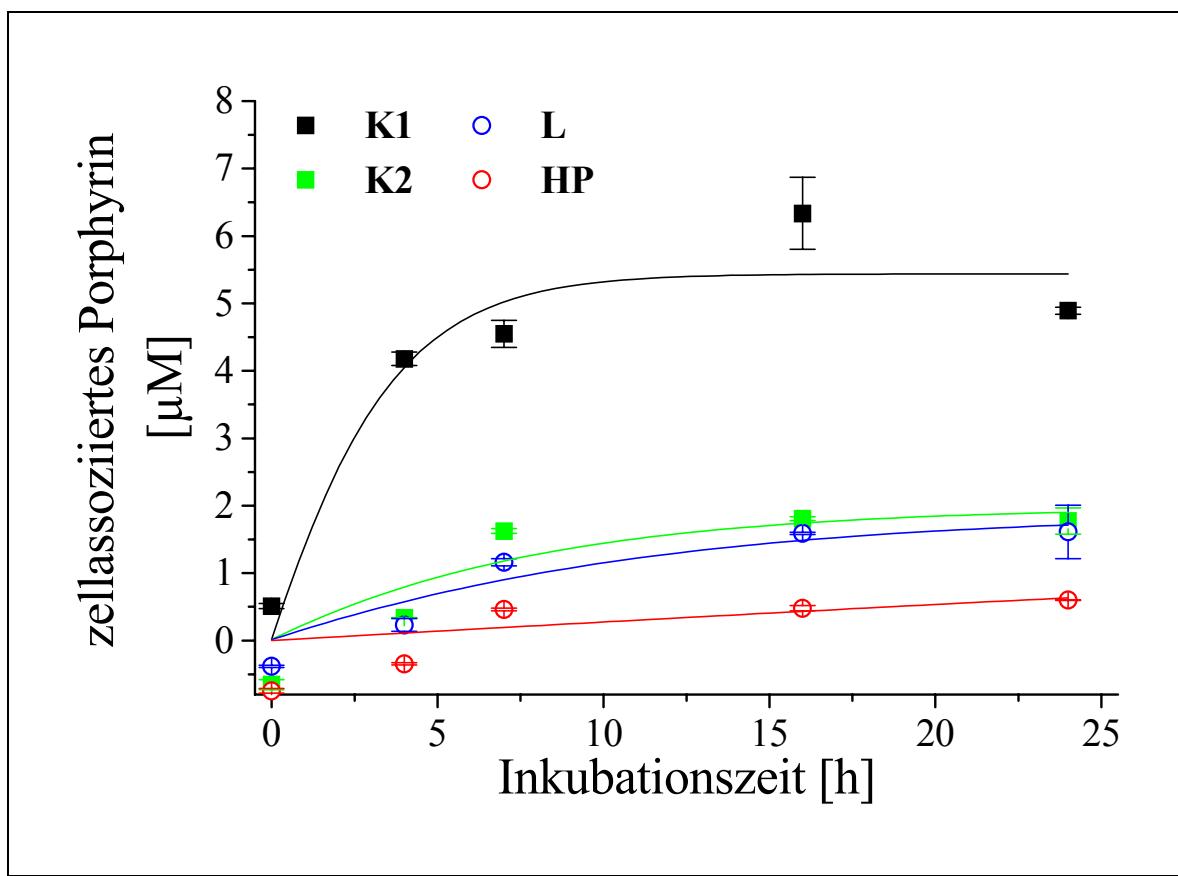


Abbildung 40: Aufnahmekinetik von $0,5 \mu\text{M}$ **L**, **K1**, **K2** und Hämatoporphyrin (**HP**) in J82-Zellen.

Beim Aufnahmeverhalten des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes **K1** fällt auf, dass dieser innerhalb von 4 Stunden schnell durch die J82- wie auch die UROtsa-Zellen aufgenommen wird. Auch für die Porphyrinverbindungen **K2** und **L** lässt sich ein nichtlinearer, scheinbar sättigbarer Anstieg feststellen, wohingegen Hämatoporphyrin eher linear mit der Zeit von den Zellen aufgenommen wird. Zudem geht aus Abbildung 40 und Abbildung 41 hervor, dass der zellassoziierte Gehalt an **K1** jeweils deutlich höher ist als der für den Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2** und auch den zu den Platinkomplexen gehörigen Porphyrinliganden **L**. Die geringste zellassoziierte Porphyrinkonzentration wurde für die Referenzverbindung Hämatoporphyrin gemessen.

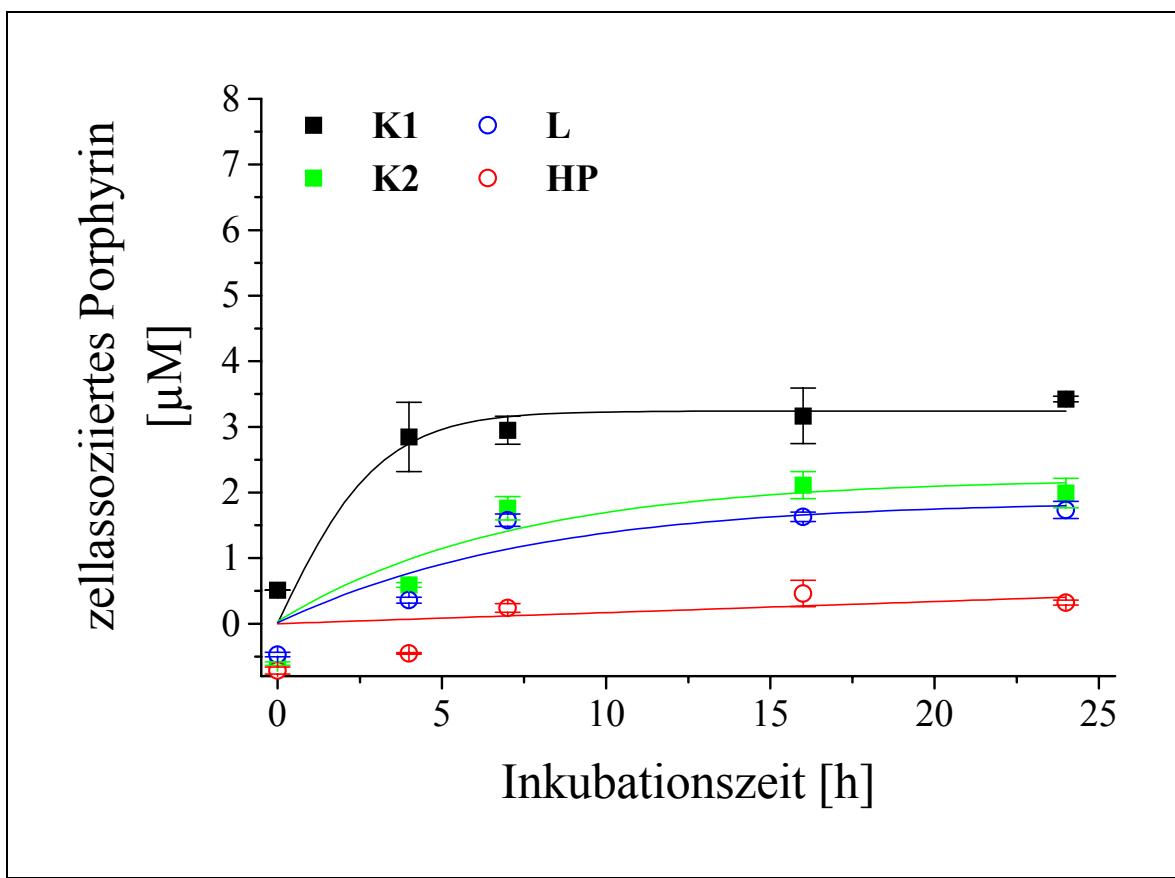


Abbildung 41: Aufnahmekinetik von $0,5 \mu\text{M}$ L, K1, K2 und Hämatoporphyrin (HP) in UROtsa-Zellen.

Trägt man die 24 Stunden-Inkubationswerte der zellassoziierten Porphyrinkonzentrationen der beiden Zelllinien für **K1**, **K2**, **L** und Hämatoporphyrin gegeneinander auf (Abbildung 42), so erkennt man eine signifikant höhere Anreicherung von **K1** in Tumorzellen um den Faktor 1,5 gegenüber normalen urothelialen Zellen. Gleiches lässt sich für Hämatoporphyrin feststellen, wohingegen für **L** und **K2** kein Unterschied in der zellassoziierten Porphyrinkonzentration von J82- und UROtsa-Zellen vorliegt. Im Vergleich zum Außenmedium reichert sich **K1** in den J82-Harnblasenkarzinom-Zellen etwa 10mal mehr an, wobei sich bei Hämatoporphyrin mehr oder weniger ein Konzentrationsausgleich eingestellt hat.

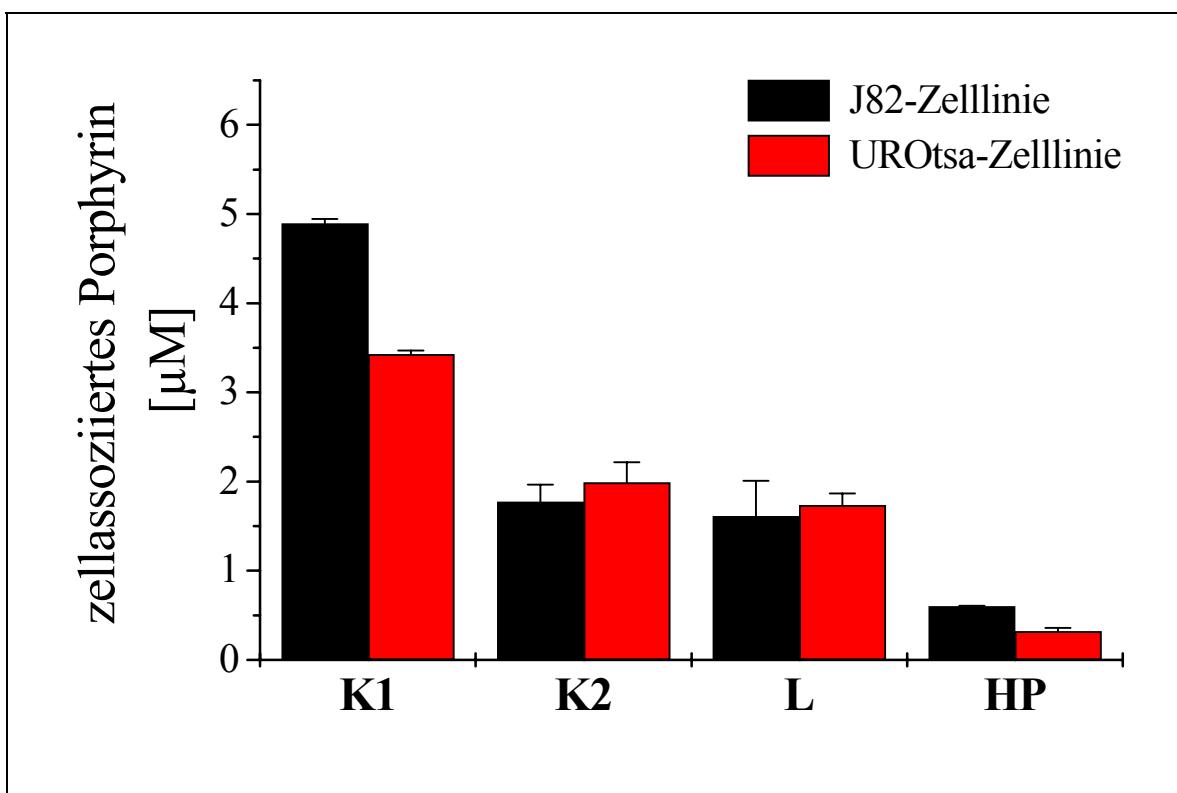


Abbildung 42: Konzentration von zellassoziiertem Porphyrin in J82- und UROtsa-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ L, K1, K2 und Hämatoporphyrin (HP).

Für das Aufnahmeverhalten von **K1**, **K2**, **L** und Hämatoporphyrin bei $5 \mu\text{M}$ Inkubationskonzentration ergeben sich jeweils ähnlich zu $0,5 \mu\text{M}$ Inkubation hyperbolische Aufnahmekinetiken (siehe Anhang 7.1). Die generellen Beobachtungen, die bei Inkubation der J82- und UROtsa-Zellen mit **K1**, **K2**, **L** und Hämatoporphyrin der Konzentration $0,5 \mu\text{M}$ gemacht wurden, treffen auch bei $5 \mu\text{M}$ Inkubation zu. So werden **K1** und Hämatoporphyrin in einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ nach 24 Stunden Inkubationszeit signifikant stärker von den Tumorzellen aufgenommen als von UROtsa-Zellen (Abbildung 43). Dies spiegelt sich im Aufnahmefaktor von 1,6 im Falle von **K1** und 7,5 für Hämatoporphyrin wider. Im Vergleich zu $0,5 \mu\text{M}$ Inkubation liegt auch bei **L** und **K2** nach 24 Stunden Inkubation mit einer Wirkstoffkonzentration von $5 \mu\text{M}$ der zellassoziierte Porphyringehalt bei den J82-Zellen deutlich höher als bei den UROtsa-Zellen. Somit scheint die Selektivität der Porphyrinver-

bindungen zu den Tumorzellen unter anderem konzentrationsabhängig zu sein, denn zum einen verschlechtern sich die Aufnahmefaktoren von J82- zu UROtsa-Zellen bei Erniedrigung der Wirkstoffkonzentration und zum anderen kann die Selektivität vollkommen verloren gehen.

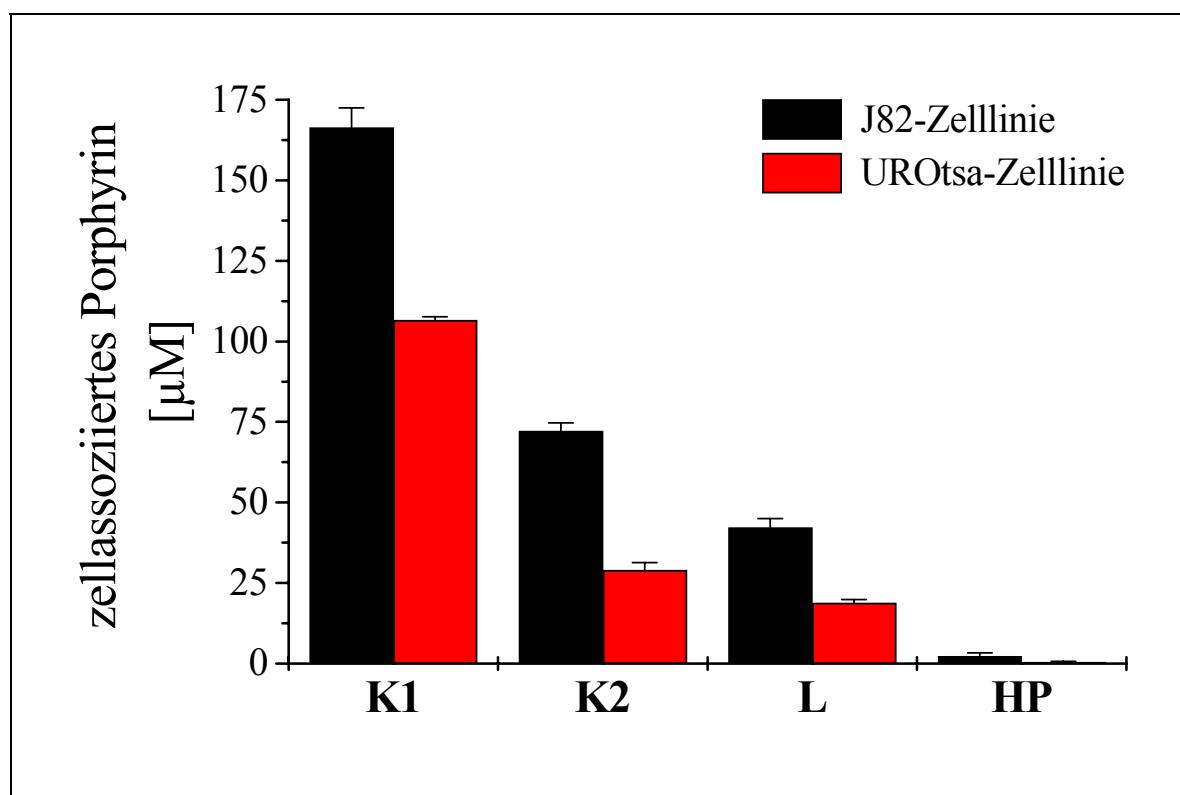


Abbildung 43: Konzentration von zellassoziiertem Porphyrin in J82- und UROtsa-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 5 μM L, K1, K2 und Hämato porphyrin (HP).

4.2.2 Durchflusszytometrische Messung der Aufnahmekinetik von K1 und K2

Wie in den Abbildungen 40, 41, 65 und 66 gezeigt, wird der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** relativ schnell in die Zellen aufgenommen. Nun stellt sich zum einen die Frage, wie schnell der Sättigungswert der Porphyrin-Platin(II)-Komplex-Aufnahme erreicht wird und zum anderen, ob von Anfang an eine gewisse Selektivität der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe zu den Tumorzellen vorhanden ist. Dazu wurde die Aufnahme von **K1**, **K2**, **L** und Hämatoporphyrin im Durchflusszytometer kontinuierlich über jeweils 17 Minuten bei einer Wirkstoffkonzentration von $5 \mu\text{M}$ gemessen. Abbildung 44 stellt exemplarisch die Originaldaten bei der Aufnahme von $5 \mu\text{M}$ **K1** in J82-Zellen dar.

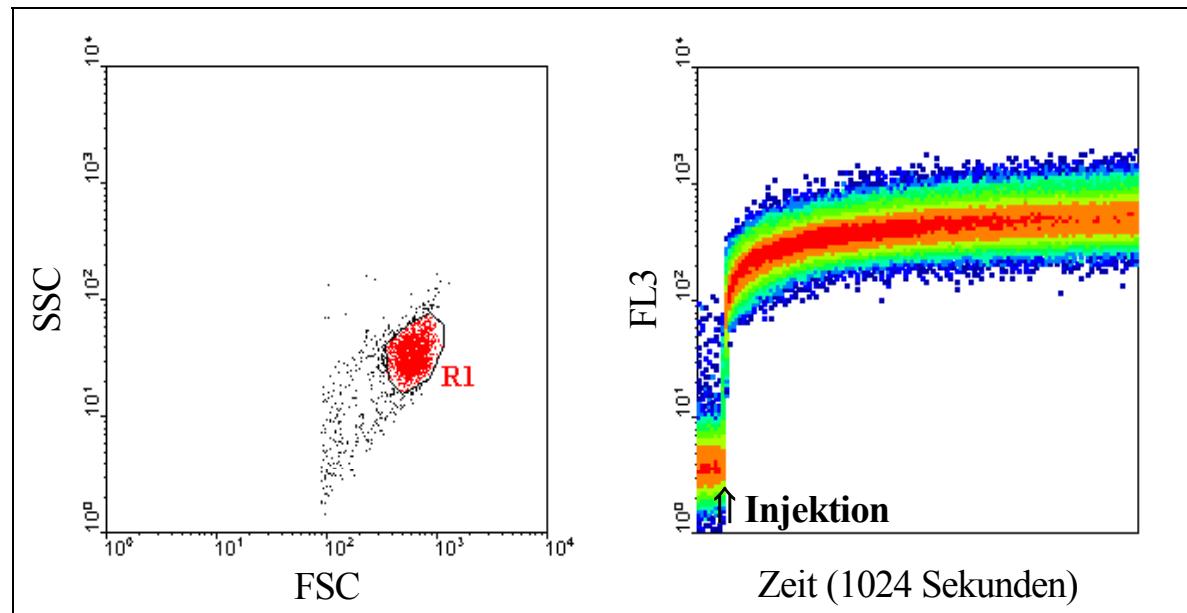


Abbildung 44: Kontinuierliche durchflusszytometrische Messung der **K1**-Aufnahme über 1024 Sekunden durch J82-Zellen; Dotplot (links) und Density Plot (rechts).

Dabei ist der Dotplot der Ausgangspunkt der Messung und schließlich auch der Auswertung. Die Auftragung von FSC zu SSC charakterisiert die gemessene Probe

bezüglich ihres Streulichtverhaltens. Um nun den Debris nicht in die weitere Messung und schließlich auch in die Auswertung mit aufzunehmen, wurde eine Region um die Zellpopulation gelegt. Anschließend wurde die Fluoreszenz, gemessen im roten Fluoreszenzkanal FL3, gegen die Zeit in einem Density Plot aufgetragen.

Die Substanzinjektion erfolgt 60 Sekunden nach Messbeginn. Damit erhält man die zelllinienspezifische Autofluoreszenz und kann dann die gemittelten Fluoreszenzwerte darauf normieren. Die gemittelten Fluoreszenzwerte wurden mittels der Software WinMDI 2.8 bestimmt, indem für die ersten 260 Sekunden Regionen im Abstand von 20 Sekunden, für die folgenden 560 Sekunden Regionen im Abstand von 40 Sekunden und für die verbleibende Zeit Regionen im Abstand von 80 Sekunden gelegt wurden. Die gemittelten normierten Fluoreszenzwerte sind für **K1**, **K2**, **L** und Hämatoporphyrin in den Abbildungen 45 bis 48 in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

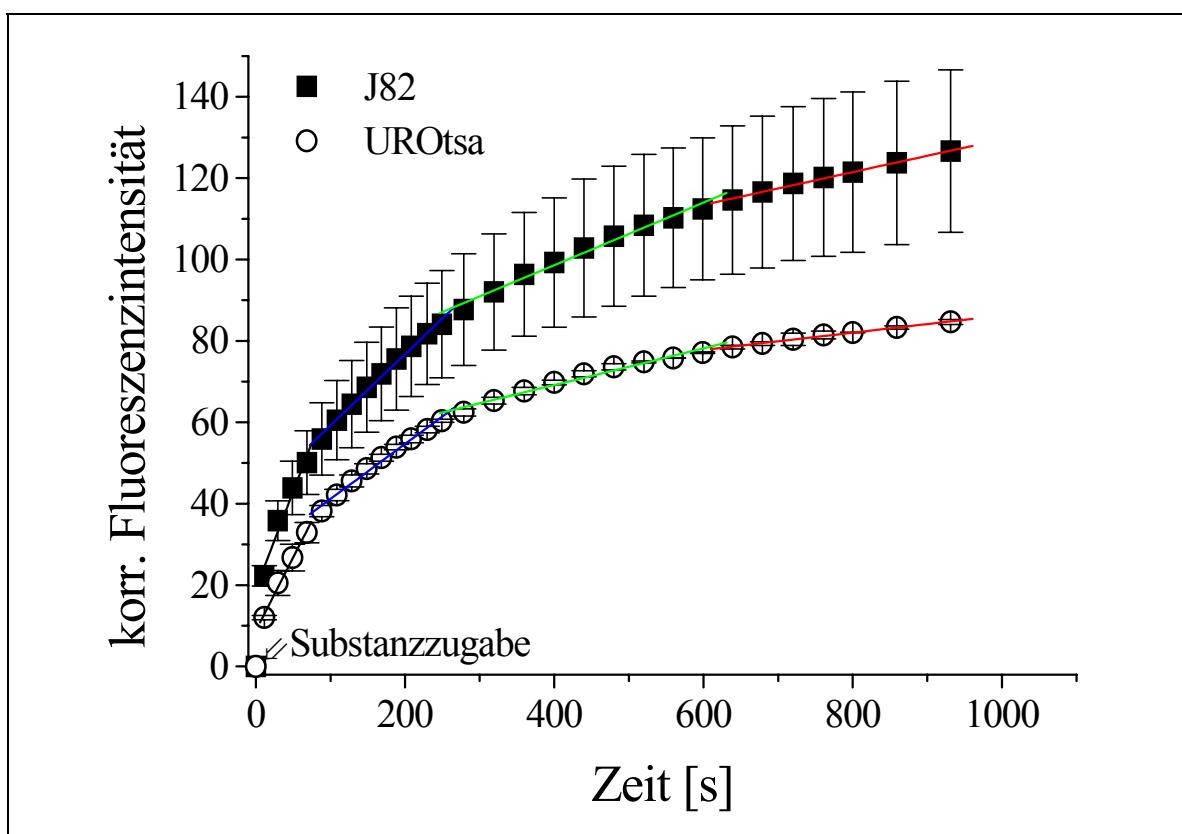


Abbildung 45: Langzeitkinetik zur Aufnahme von $5 \mu\text{M}$ **K1** in J82- und UROtsa-Zellen.

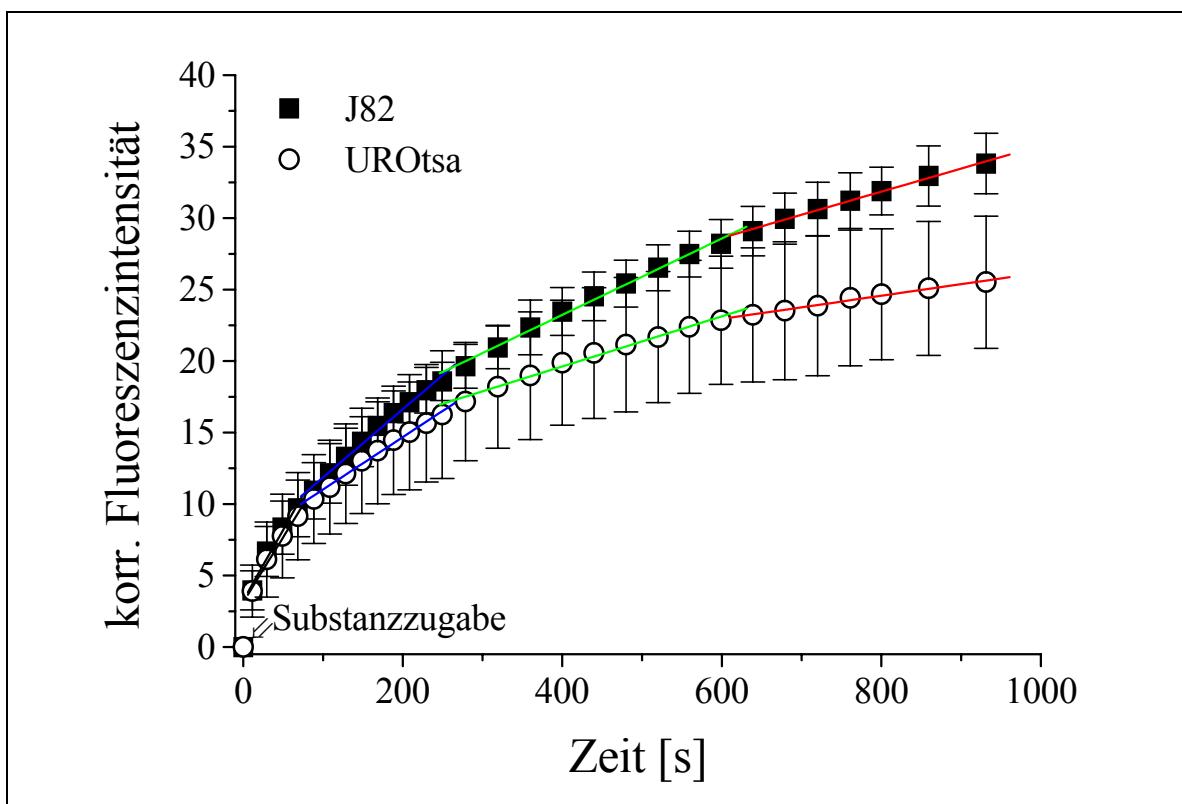


Abbildung 46: Langzeitkinetik zur Aufnahme von $5 \mu\text{M} \mathbf{K2}$ in J82- und UROtsa-Zellen.

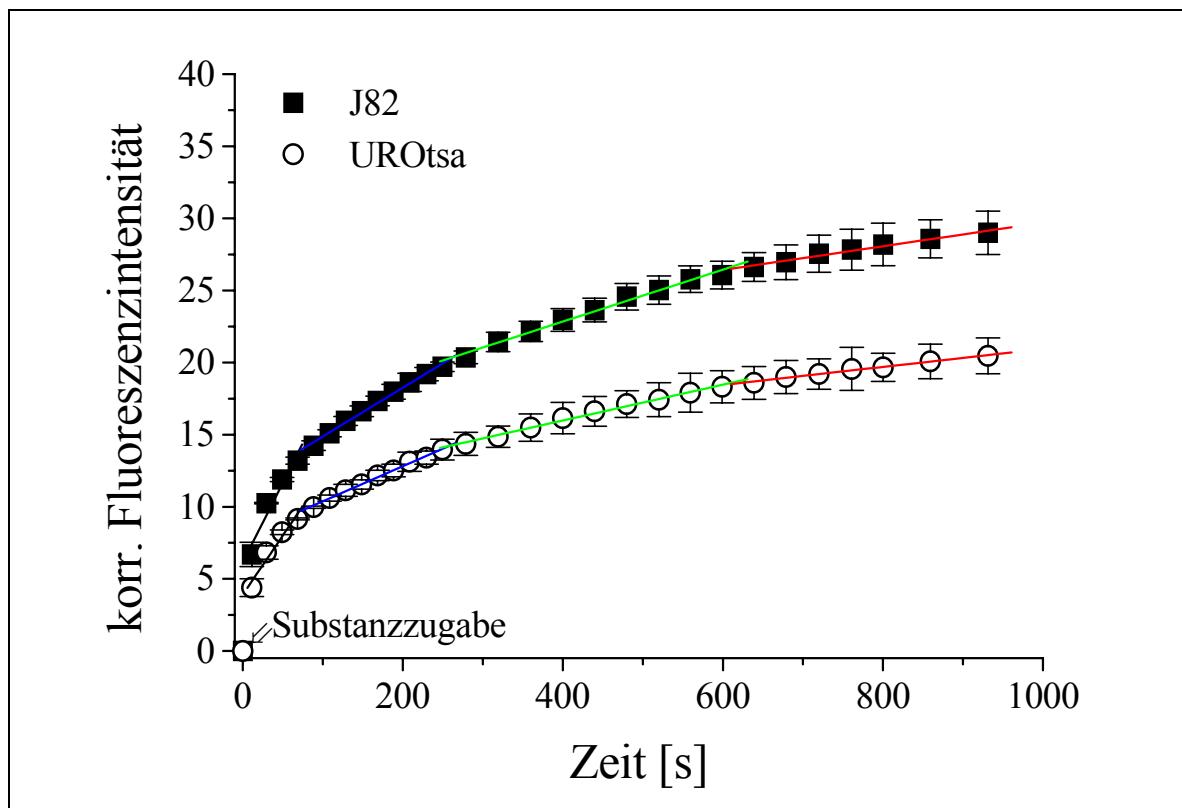


Abbildung 47: Langzeitkinetik zur Aufnahme von $5 \mu\text{M} \mathbf{L}$ in J82- und UROtsa-Zellen.

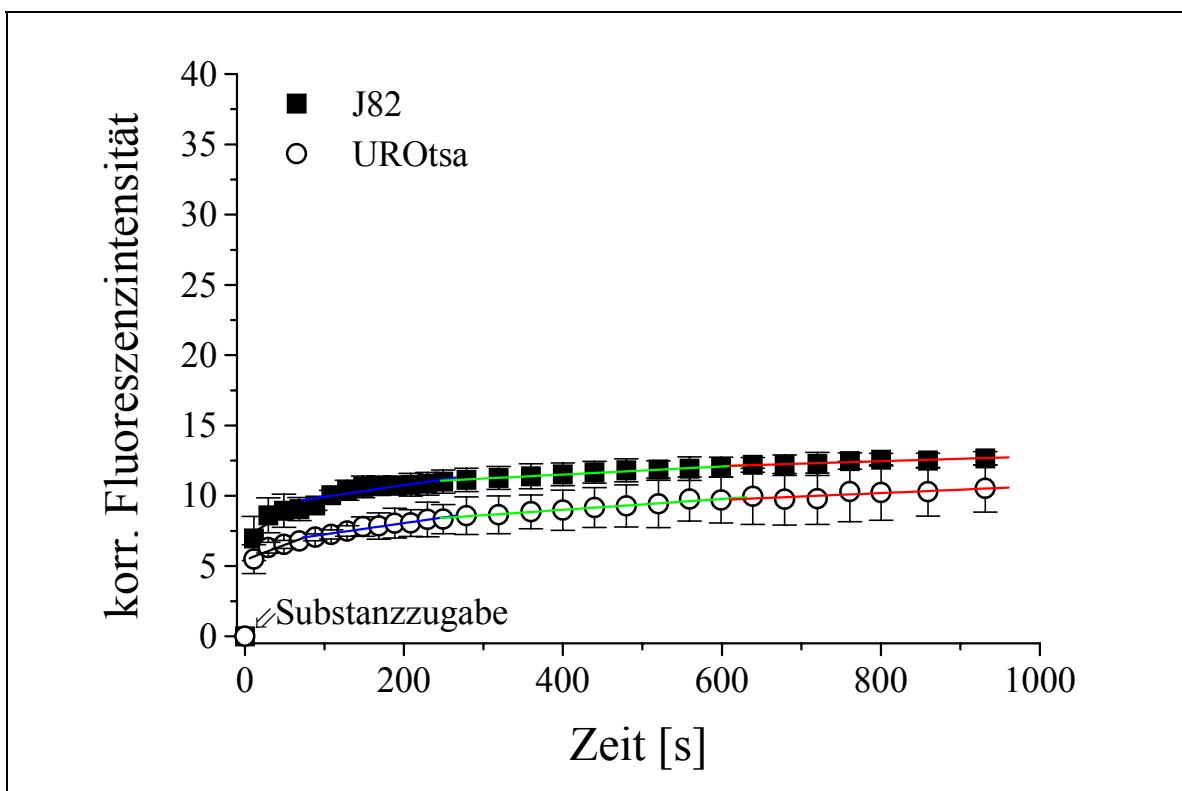


Abbildung 48: Langzeitkinetik zur Aufnahme von $5 \mu\text{M}$ Hämatoporphyrin in J82- und UROtsa-Zellen.

Aus den Abbildungen 45 bis 47 geht hervor, dass **K1**, **K2** und **L** in den ersten fünf Minuten der Zellinkubation äußerst schnell durch die Zellen aufgenommen werden. Danach flacht die Aufnahmekurve im Falle der normalen urothelialen Zellen deutlich schneller ab als für die Harnblasenkarzinom-Zelllinie J82. So tritt in Bezug auf die UROtsa-Zelllinie bereits nahezu Sättigung ein, wenn bei den J82-Zellen noch eine Aufnahme der Verbindungen zu verzeichnen ist. Bei Hämatoporphyrin ist es eher eine langsame kontinuierliche Zunahme (Abbildung 48). Des Weiteren sieht man, dass bezogen auf die Fluoreszenzintensität auch hier eine Abstufung in der Porphyrinaufnahme von **K1** zu **K2** zu **L** und schließlich zu Hämatoporphyrin wie bei der quantitativen Bestimmung des Porphyringehalts mittels Extraktion vorliegt.

Zusätzlich zur Aufnahmekinetik wurde aus den Langzeitkinetik-Experimenten die „Aufnahmegeschwindigkeit“ als korrigierte Fluoreszenzintensität pro Zeit bestimmt.

Dazu wurde die Aufnahmekinetik in 4 Zeiteinheiten unterteilt und darin jeweils die Steigung und damit die „Aufnahmegeschwindigkeit“ bestimmt. Der erste Zeitraum sind die ersten 90 Sekunden der Aufnahmekinetik (schwarz), gefolgt vom Zeitraum für die Minuten 1,5 bis 4,5 (blau), anschließend von Minute 4,5 bis 10 (grün), und der letzte Zeitraum ist von Minute 10-17 (rot) (Abbildungen 45 bis 48 und Tabelle 9). Der Korrelationskoeffizient der linearen Regression ist bei **K1**, **K2** und **L** jeweils über 0,98 und bei Hämatoporphyrin über 0,89.

Tabelle 9: Aufnahmegeschwindigkeit in J82- und UROtsa-Zellen.

		„Aufnahmegeschwindigkeit“ korr. Fluoreszenzwert pro Zeit [1 * 10 ⁻² /Sekunde]		
		J82	UROtsa	Faktor: J82 zu UROtsa
K1		47,80 ± 6,85	36,01 ± 2,59	1,33 ± 0,29
		17,53 ± 0,57	13,5 ± 0,58	1,30 ± 0,10
		7,67 ± 0,36	4,51 ± 0,28	1,70 ± 0,18
		4,02 ± 0,11	2,12 ± 0,06	1,90 ± 0,11
K2		9,86 ± 1,29	9,07 ± 0,80	1,09 ± 0,02
		4,77 ± 0,18	3,66 ± 0,13	1,30 ± 0,03
		2,67 ± 0,08	1,75 ± 0,07	1,53 ± 0,09
		1,62 ± 0,05	0,81 ± 0,04	2,00 ± 0,16
L		11,02 ± 2,09	8,19 ± 1,37	1,35 ± 0,28
		3,38 ± 0,10	2,43 ± 0,06	1,39 ± 0,08
		1,80 ± 0,07	1,24 ± 0,04	1,45 ± 0,10
		0,82 ± 0,05	0,62 ± 0,03	1,32 ± 0,14
HP		3,42 ± 1,38	2,13 ± 0,56	1,61 ± 1,07
		0,83 ± 0,17	0,81 ± 0,07	1,02 ± 0,30
		0,29 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,76 ± 0,17
		0,17 ± 0,03	0,24 ± 0,07	0,71 ± 0,33

In jeder Zeitperiode ist die „Aufnahmegeschwindigkeit“ der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** und des dazugehörigen Porphyrinliganden **L** in die J82-

Zellen höher als in die UROtsa-Zellen. Dies spiegelt sich auch in der Faktorbildung der „Aufnahmgeschwindigkeit“ von J82-Zellen zu UROtsa-Zellen wieder, die jeweils größer als 1 ist (Tabelle 9). Somit ist die **K1**-, **K2**- und **L**-Akkumulation in J82-Tumorzellen schneller als in den normalen urothelialen Zellen (UROtsa). Für Hämatoporphyrin ist die „Aufnahmgeschwindigkeit“ jeweils erheblich geringer und nahezu gleich für beide Zelllinien.

4.2.3 Zusammenfassende Diskussion

Es besteht kein Zweifel, dass der Porphyringehalt in der Zelle bzw. im Gewebe einer der bestimmenden Faktoren ist, der das Ergebnis der photodynamischen Therapie beeinflusst. Die Bestimmung des zellassoziierten Porphyringehalts nach Inkubation mit den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen **K1** und **K2** oder der Porphyrinverbindung **L** oder Hämatoporphyrin erfolgte nach Extraktion mit Perchlorsäure/Methanol fluoreszenzspektrometrisch. Für die Quantifizierung wurden mit der jeweiligen Verbindung Kalibrierungen durchgeführt. Mit dem mittleren Volumen einer Zelle und der mittleren Proteinmasse einer Zelle konnte so die Konzentration des zellassoziierten Porphyrins in mol/l berechnet werden (Abbildungen 40 bis 43). Die Durchflusszytometrie gestattet zwar eine rasche Bestimmung der Fluoreszenz, jedoch ohne eine absolute Quantifizierung. Zur Untersuchung der „Aufnahmgeschwindigkeit“ zu Beginn der Inkubation wurde die Porphyrinfluoreszenz kontinuierlich am Durchflusszytometer vermessen. Aus dem Kurvenverlauf der Aufnahmekinetik ließen sich die „Aufnahmgeschwindigkeiten“ als Fluoreszenzintensität pro Zeit bestimmen (Abbildungen 44 bis 48). Zudem konnten Aussagen über die Schnelligkeit der Aufnahme und das Erreichen des Sättigungsbereichs getroffen werden. Für den Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** konnte in den J82-Tumorzellen ein 1,5fach höherer Wert an Porphyrinkonzentration als bei den normalen urothelialen Zellen UROtsa bei einer Inkubationskonzentration von 0,5 μ M gemessen werden (Abbildung 42). Bei dieser Wirkstoffkonzentration hingegen wiesen der Porphyrinligand **L** und der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2** keine Selektivität zu den Tumorzellen auf (Abbildung 42). Eine Erhöhung der Konzentration auf 5 μ M

ließ in allen Fällen die zellassoziierte Konzentration und die Selektivität ansteigen (Abbildung 43). Zu dem in den vorliegenden Experimenten erhaltenen Unterschied zwischen Tumorzellen und normalen urothelialen Zellen von ca. 1,5:1 für **K1** sind aus der Literatur entsprechende Werte für andere Photosensibilisatoren bekannt. Für den endogenen Photosensibilisator Protoporphyrin IX, der nach 5-Aminolävulinsäure-Applizierung von den Zellen selbst erzeugt wird, ist eine 2fache Anreicherung zwischen J82-Tumorzellen und UROtsa-Zellen berichtet. Weitere Untersuchungen zur Akkumulation von ALA-induziertem PPIX wurden unter anderem auch an RT4-Tumorzellen, die aus einem hochdifferenzierten papillären Urothelkarzinom des Übergangsepithels von Grad G1 stammten,^[148] durchgeführt, wobei Kontraste zu den normalen urothelialen Zellen UROtsa von bis zu 3,8:1 erzielt werden konnten.^[149] Für Photofrin, dem bisher einzigen zugelassenen Photosensibilisator, wurden bei *in vivo*-Untersuchungen an verschiedenen Tumormodellen wie Haut-,^[150] Harnblasen-,^[151] Lungenkarzinomen^[152] oder Tumoren des Gastrointestinaltrakts^[153] Anreicherungsfaktoren zwischen Tumor- und Normalgewebe von 2:1 bis 3:1 beobachtet. Bei *in vivo*-Studien mit Photosensibilisatoren der 2. Generation wie Zink(II)-Phthalocyaninen,^[154] sulfonierten Aluminiumphthalocyaninen,^[155] Bacteriochlorinen^[156] oder Derivaten von *meta*-Tetra(hydroxyphenyl)chlorin^[157] konnten vereinzelt und unter bestimmten Bedingungen Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe von 4:1 bis 40:1 gefunden werden. Es bleibt festzuhalten, dass die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe, insbesondere **K1** im Rahmen des gewählten Zellkulturmodells, ähnliche Anreicherungsfaktoren wie andere Photosensibilisatoren aufweisen. Die vereinzelt erzielten höheren Kontraste zwischen Tumor- und Normalgewebe *in vivo* wurden unter anderem bei Verwendung spezieller Transportsysteme wie Liposomen oder Cremophor EL erreicht, die für die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe auch entsprechend untersucht werden müssten.^[158]

Zusätzlich als Ergebnis aus der Quantifizierung des Porphyringehalts mittels Extraktion lässt sich anführen, dass der Sättigungsbereich für alle vier Verbindungen,

insbesondere jedoch für **K1**, schneller erreicht wurde, als der erste Messwert dies erfassen konnte (Abbildungen 40 und 41). Demnach wurde zur näheren Charakterisierung des Aufnahmeverhaltens eine Langzeitkinetik für die ersten 17 Minuten der Substanzinkubation durchgeführt. Es zeigte sich im kontinuierlichen Verlauf, dass die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** sowie der Ligand **L** in den ersten fünf Minuten der Inkubation sehr schnell durch die J82- und UROtsa-Zellen aufgenommen werden (Abbildungen 45 bis 47). Danach läuft die Aufnahme bei der UROtsa-Zelllinie bereits langsam gegen einen Sättigungswert, wohingegen die J82-Tumorzellen noch immer Porphyrinverbindungen akkumulieren. Dies spiegelt sich auch in der „Aufnahmgeschwindigkeit“ wider. Für **K1**, **K2** und **L** ist die Akkumulation in den J82-Tumorzellen zu jedem Zeitpunkt der Inkubation schneller als in den UROtsa-Zellen. Für die Referenzverbindung Hämatoporphyrin ist die „Aufnahmgeschwindigkeit“ für beide Zelllinien nahezu identisch und deutlich geringer als bei **K1**, **K2** und **L** (Tabelle 9).

Diese Ergebnisse stimmen mit der Aussage aus dem Chemosensitivitätstest mit Kurzzeitinkubation (Abbildungen 33 und 34) überein, denn auch dort wurde festgestellt, dass die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe relativ schnell in die Zellen aufgenommen werden, da sie im Vergleich zur Referenzverbindung Cisplatin schon nach einer 3-stündigen Inkubation die volle antiproliferative Wirkung entfalten. Außerdem lassen sich nun mit Hilfe der quantifizierten Porphyringehalte in den J82- oder UROtsa-Zellen nach **K1**-, **K2**-, **L**- und Hämatoporphyrin-Inkubation die Bestrahlungseffekte aus den Chemosensitivitätstests erklären (Abbildungen 35 bis 39), denn weder der Porphyrinligand **L** (Abbildungen 35A und 37A) noch die Referenzverbindung Hämatoporphyrin (Abbildungen 35B und 37B) zeigten nach Bestrahlung mit inkohärentem Licht der Wellenlänge 600 bis 730 nm und einer Energiedichte von 24 J/cm^2 einen phototoxischen Effekt bei $0,5 \mu\text{M}$ Substanzinkubation. Auch der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2** weist keine lichtinduzierte Toxizität auf (Abbildungen 36B und 38B). Demnach scheint zur Ausbildung der phototoxischen Eigenschaften ein gewisses Minimum an zellassozierter Porphyrinkonzentration

nötig zu sein. Diese wird von **K2**, **L** und Hämatoporphyrin weder in der J82- noch in der UROtsa-Zelllinie erreicht.

Die Konzentration des zellassoziierten Porphyrins nach 0,5 μ M **K1**-Inkubation und 24 Stunden Inkubationszeit reicht somit aus, um eine deutliche photodynamische Wirkung aufzuzeigen (Abbildungen 36A, 38A und 42). Darüber hinaus lässt sich mit Hilfe der unterschiedlichen Aufnahme von **K1** in Harnblasenkarzinom-Zellen und normale urotheliale Zellen die verschieden starke photodynamische Effektivität von **K1** auf die beiden Zelllinien aus dem Chemosensitivitätstest mit Bestrahlung erklären, denn 24 Stunden nach der Bestrahlung reduzierte sich die Zellmasse der J82-Zellen deutlich stärker als die der UROtsa-Zellen. So nahm der T/C_{corr.}-Wert im Falle der J82-Zellen von etwa 73 % auf etwa 1 % ab, wohingegen der phototoxische Effekt von **K1** auf die UROtsa-Zellen lediglich eine Reduzierung des T/C_{corr.}-Werts von etwa 84 % auf etwa 33 % bewirkte. Eine insgesamt deutlich schwächere Schädigung der UROtsa-Zellen, sowohl zytotoxisch als auch lichtinduziert, ermöglicht es diesen auch, wieder schneller anzuwachsen (Abbildungen 36A und 38A).

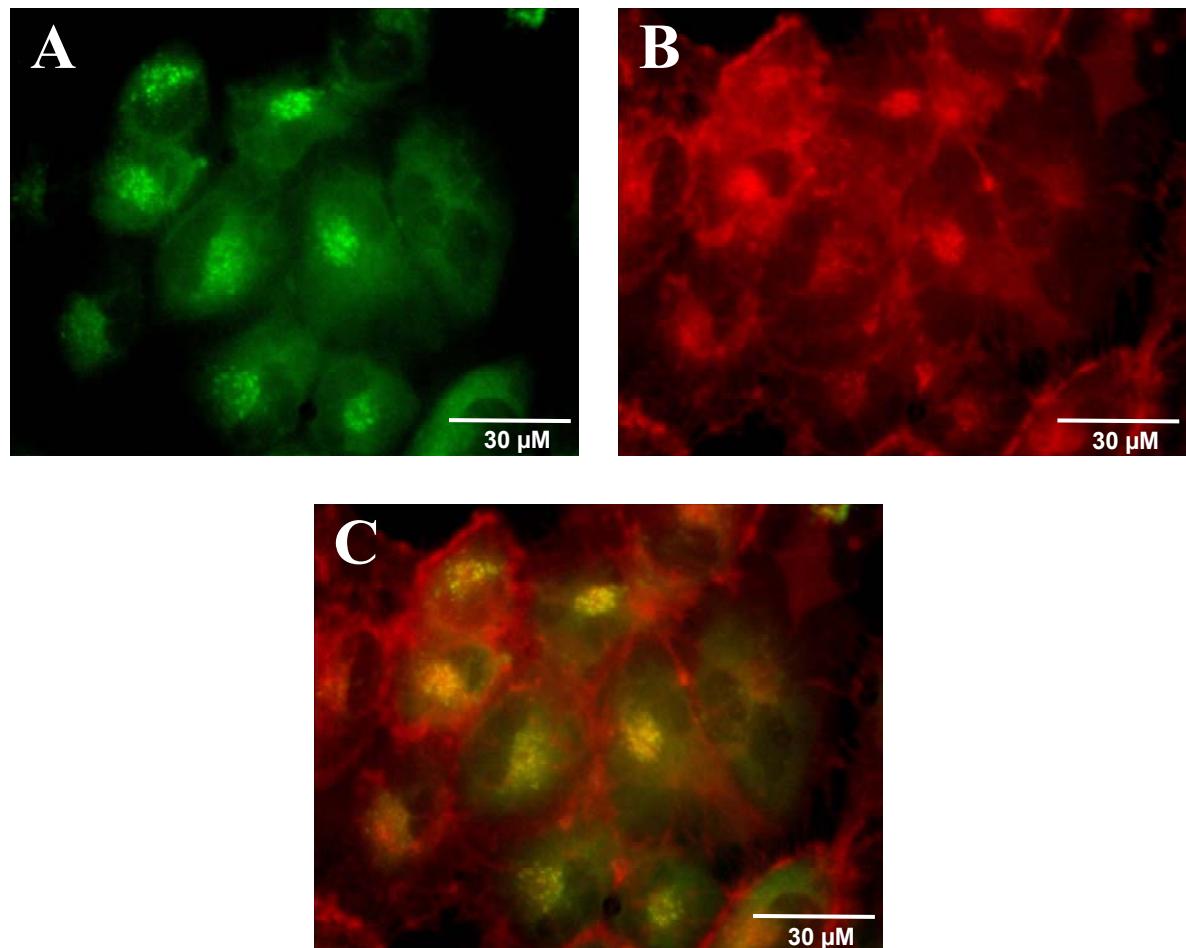
4.3 Intrazelluläre Sensibilisatorlokalisierung

Die intrazelluläre Lokalisierung der rot fluoreszierenden Photosensibilisatoren **L**, **K1**, **K2** und Hämatoporphyrin wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Um eine mögliche Kolokalisation des roten Fluoreszenzverteilungsmusters der Sensibilisatoren in bestimmten Zellorganellen zu untersuchen, wurden Doppelfärbungen mit grün fluoreszierenden, organellspezifischen Farbstoffen (LyoTracker Green DND 26, MitoTracker Green FM und Rhodamin 123) durchgeführt. Nach getrennter Aufnahme der Rot- und Grünfluoreszenz unter Verwendung eines Dualbandfilters konnte die Übereinstimmung der beiden Verteilungsmuster überprüft werden (Abbildungen 49A und B). Anschließend wurden die so generierten Bilder mittels der Software MetaMorph übereinandergelegt (Abbildung 49C). Zur Darstellung des Golgi-Apparats wurde der rot fluoreszierende Farbstoff BODIPY FL C₅-Ceramid verwendet. Somit mussten die Photosensibilisatorfluoreszenz und die BODIPY FL C₅-Ceramid-Fluoreszenz getrennt von einander in zwei Experimenten aufgenommen werden. Eine mögliche Lokalisierung der Photosensibilisatoren im Golgi-Apparat wurde demnach indirekt durch Vergleich der Fluoreszenzmuster erhalten.

4.3.1 Intrazelluläre K1- und K2-Lokalisation

In den Abbildungen 50 und 51 sind exemplarisch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der intrazellulären **K1**-Lokalisation in J82- und UROtsa-Zellen abgebildet. Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der zellulären **K1**-Verteilung ergab im Falle einer 24-stündigen Inkubationszeit für Tumor- und Normalzellen sehr ähnliche Verteilungsmuster. Generell lässt sich festhalten, dass **K1** eine diffuse, schwach zytoplasmatische Fluoreszenzverteilung aufweist. Die Zellkerne blieben von der Fluoreszenz ausgespart. Die Doppelfärbungsversuche zeigten eine Kolokalisation der **K1**-Fluoreszenz mit der LysoTracker-Fluoreszenz und somit eine Lokalisierung von **K1** in den Lysosomen von J82-Zellen (Abbildung 49). Für die UROtsa-

Zellen sind die LysoTracker Green-Fluoreszenz und die **K1**-Fluoreszenz deutlich in voneinander verschiedenen Strukturen lokalisiert (Abbildung 51A).



*Abbildung 49: Getrennte fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Rot- und Grünfluoreszenz bei Inkubation der J82-Zellen mit **K1** (5 µM, Inkubationszeit 24 h) und Kofärbung der Lysosomen. A: Lysosomen (LysoTracker Green DND 26); B: **K1**-Fluoreszenz; C: Software unterstützte Überlagerung der Fluoreszenzen.*

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden ist **K1** in Mitochondrien lokalisiert. Dies ist zutreffend für beide Zelllinien. Bei einer Anfärbung der Mitochondrien mit dem potentialunabhängigen Farbstoff MitoTracker Green FM konnte weder vor noch nach **K1**-Inkubation dessen charakteristische Grünfluoreszenz beobachtet werden (Abbildungen 50A, B und 51B, C). Die Doppelfärbung von **K1** mit dem potential-sensitiven Farbstoff Rhodamin 123 zeigt eine Kolokalisation (Abbildungen 50C und 51D). Schließlich konnte auch mittels indirekter Korrelation eine Kolokalisation von **K1** mit dem Golgi-Apparat nachgewiesen werden (Abbildungen 50D, E und 51E, F).

Auch für den Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2** wurde die intrazelluläre Lokalisati-on fluoreszenzmikroskopisch unter Zuhilfenahme der Gegenfärbung von spezifi-schen Zellorganellen für die J82- und UROtsa-Zelllinie untersucht. Dabei ergaben sich bezüglich der J82-Zelllinie die gleichen Verteilungsmuster wie beim Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1**. Für die UROtsa-Zellen hingegen konnte keine Kolokalisati-on von **K2** mit Lysosomen und auch nicht mit den Mitochondrien festgestellt wer-den (siehe Anhang 7.2).

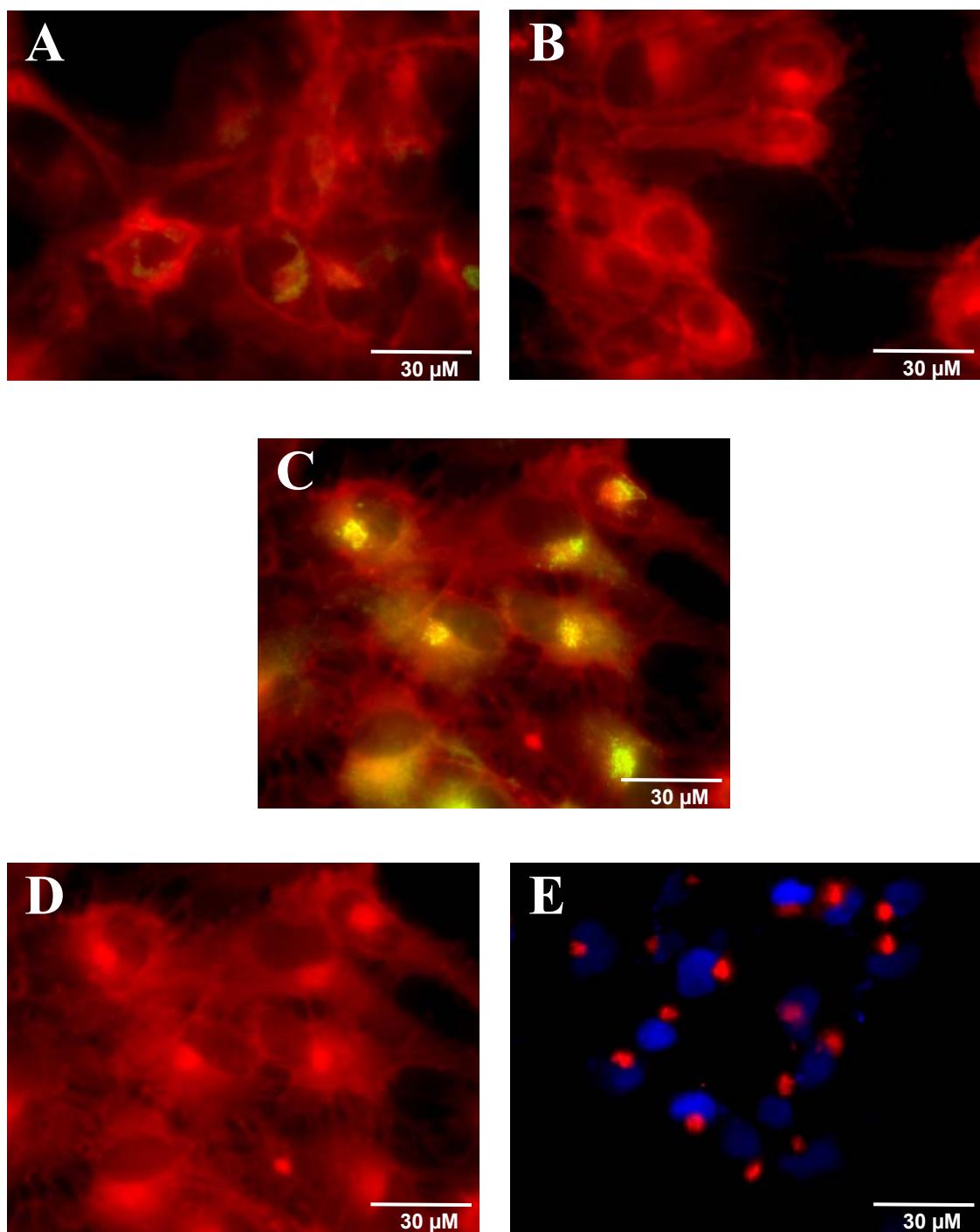


Abbildung 50: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären **K1**-Lokalisation (rot, A-D) für J82-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit $5 \mu\text{M}$ **K1**: A: MitoTracker Green-Färbung (grün) nach **K1**-Inkubation, B: MitoTracker Green-Färbung (grün) vor **K1**-Inkubation, C: Rhodamin 123-Färbung (grün) nach **K1**-Inkubation, D: **K1**-Fluoreszenz, E: BODIPY FL C₅-Ceramid (rot) und DAPI (blau, Zellkern).

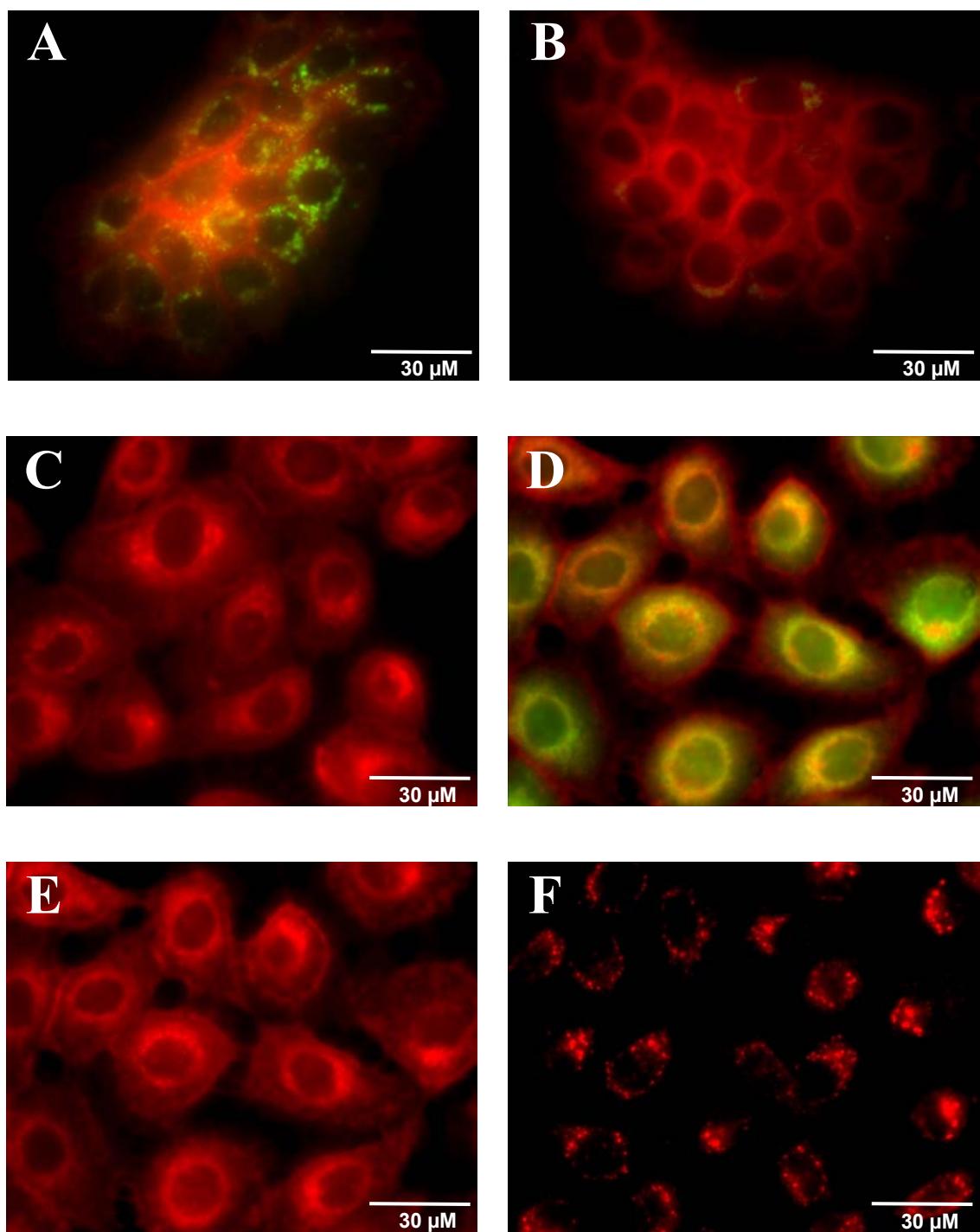


Abbildung 51: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären **K1**-Lokalisation (rot, A-E) für UROtsa-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 5 μ M **K1**: A: LysoTracker Green-Färbung (grün) nach **K1**-Inkubation, B: MitoTracker Green-Färbung (grün) nach **K1**-Inkubation, C: MitoTracker Green-Färbung (grün) vor **K1**-Inkubation, D: Rhodamin 123-Färbung (grün) nach **K1**-Inkubation, E: **K1**-Fluoreszenz, F: BODIPY FL C₅-Ceramid (rot).

4.3.2 Intrazelluläre L- und Hämatoporphyrin-Lokalisation

Für die Referenzverbindung Hämatoporphyrin wurde auch die intrazelluläre Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In den Abbildungen 52 und 53 sind die entsprechenden Aufnahmen für die J82- und UROtsa-Zellen dargestellt. Dabei sind LysoTracker Green- und Hämatoporphyrin-Fluoreszenz deutlich in voneinander verschiedenen Strukturen lokalisiert. Schwache Rotfluoreszenz lässt sich an der Zellmembran und in relativ großen, kernnahen Fluoreszenzspots erkennen. Auch die Doppelfärbungen der Hämatoporphyrin-Fluoreszenz mit der MitoTracker Green- und Rhodamin 123-Fluoreszenz zeigen keine Kolokalisation. Vergleicht man die BODIPY FL C₅-Ceramid-Aufnahme für den Golgi-Apparat (Abbildungen 52E, F und 53E, F) mit den hier gewonnenen Abbildungen, so kann eine Lokalisation von Hämatoporphyrin im Golgi-Apparat eindeutig geschlussfolgert werden.

Für den Porphyrinliganden **L** ergaben sich bezüglich beider Zelllinien die gleichen Verteilungsmuster wie bei der Referenzverbindung Hämatoporphyrin (siehe Anhang 7.2).

4.3.3 Zusammenfassende Diskussion

Die Lebensdauer des reaktiven Singulett-Sauerstoffs (in wässriger Lösung: 3 bis 4 μ s) und damit seine Reichweite (10 bis 20 nm) ist sehr gering.^[159] Folglich treten phototoxische Schäden praktisch am Ort der Generierung von Singulett-Sauerstoff und damit der intrazellulären Lokalisation von **L**, **K1**, **K2** und Hämatoporphyrin auf. Da unterschiedliche Zellkompartimente unterschiedlich sensibel sind, ist die intrazelluläre Verteilung des Photosensibilisators ein wichtiger Faktor, der die Effektivität der photodynamischen Behandlung bestimmt.

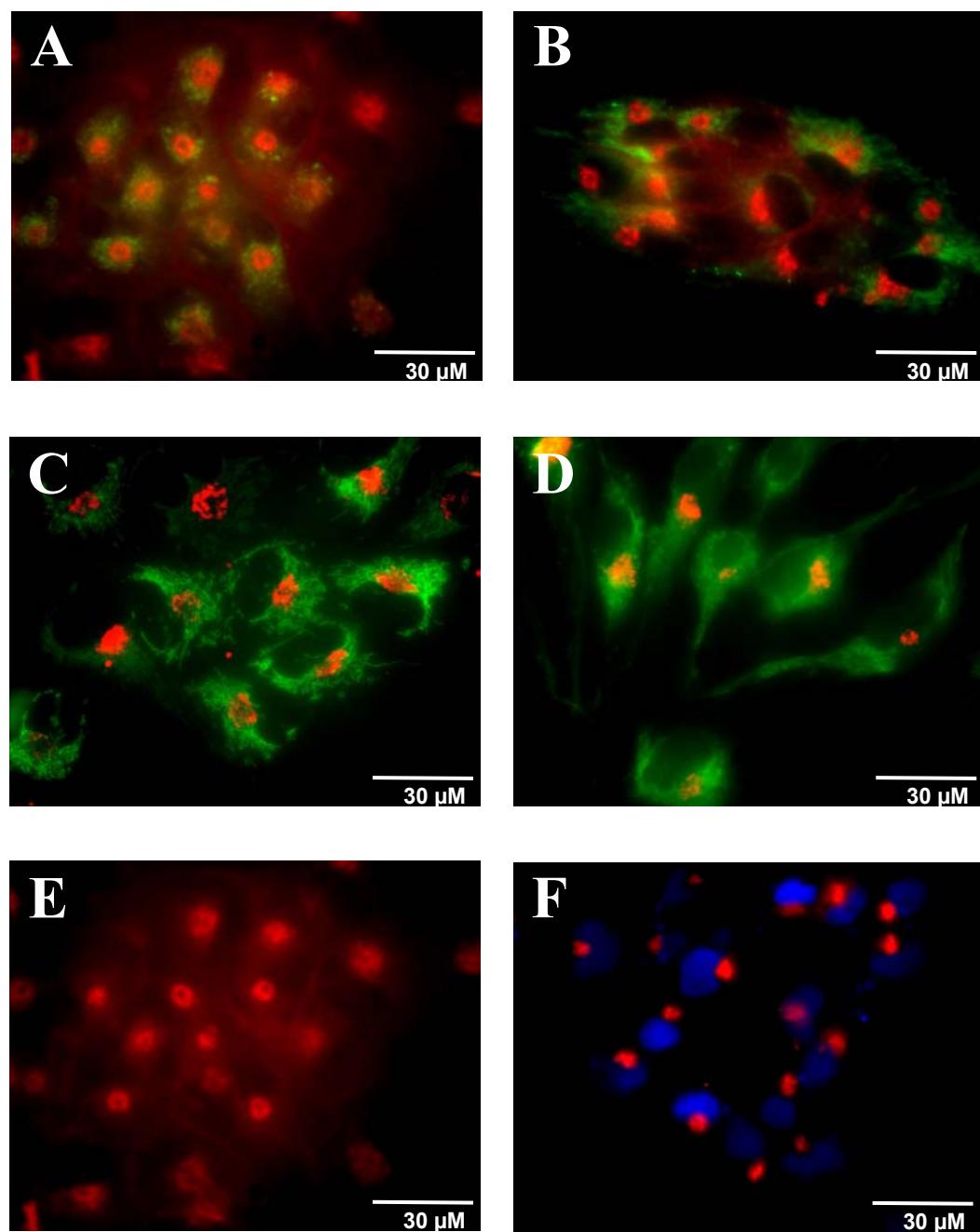


Abbildung 52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären Hämatoporphyrin-Lokalisation (rot, A-E) für J82-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 5 μ M Hämatoporphyrin (**HP**): A: LysoTracker Green-Färbung (grün) nach **HP**-Inkubation, B: MitoTracker Green-Färbung (grün) nach **HP**-Inkubation, C: MitoTracker Green-Färbung (grün) vor **HP**-Inkubation, D: Rhodamin 123-Färbung (grün) nach **HP**-Inkubation, E: **HP**-Fluoreszenz, F: BODIPY FL C₅-Ceramid (rot) und DAPI (blau, Zellkern).

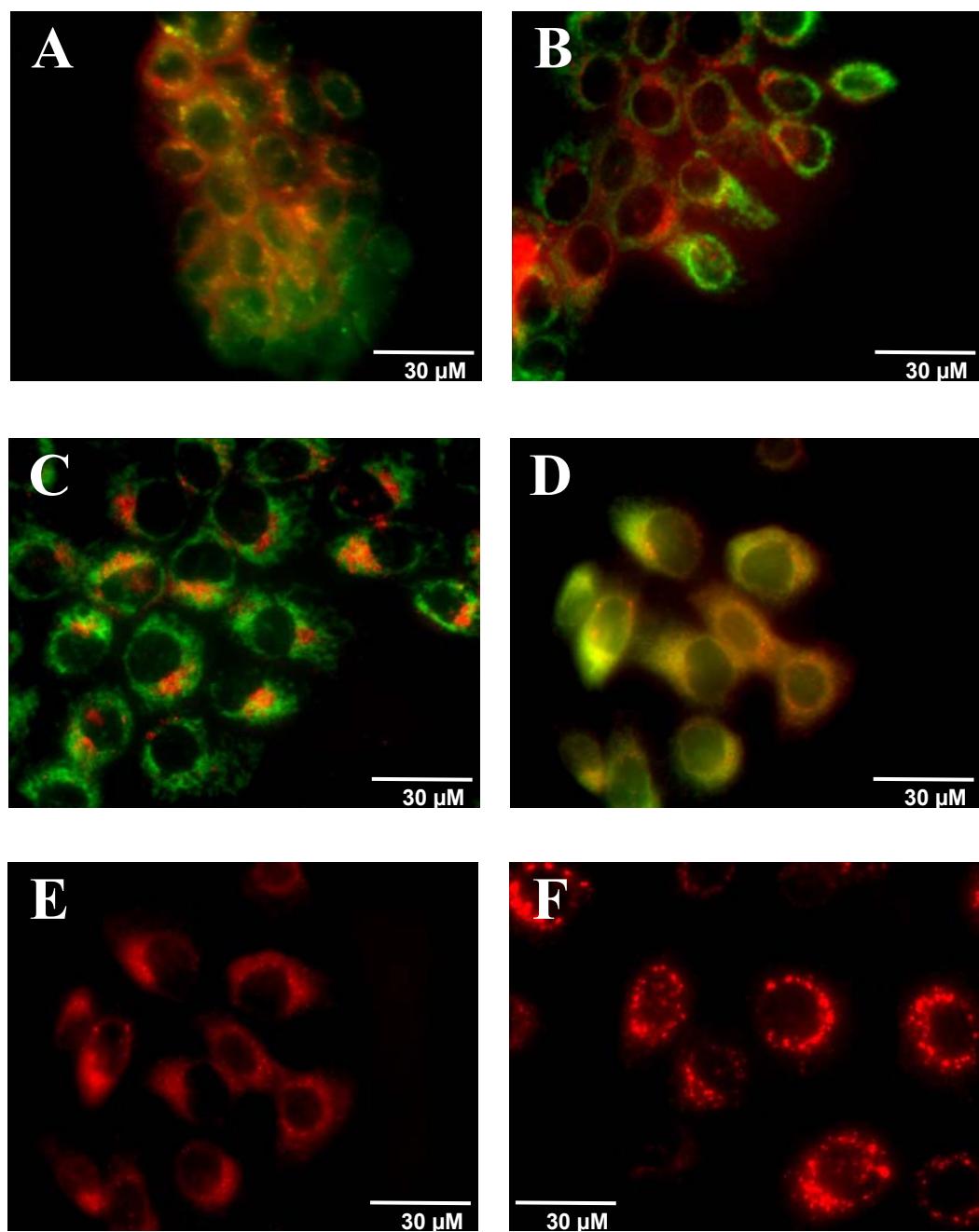


Abbildung 53: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären Hämatoporphyrin-Lokalisation (rot, A-E) für UROtsa-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 5 μ M Hämatoporphyrin (HP): A: LysoTracker Green-Färbung (grün) nach HP-Inkubation, B: MitoTracker Green-Färbung (grün) nach HP-Inkubation, C: MitoTracker Green-Färbung (grün) vor HP-Inkubation, D: Rhodamin 123-Färbung (grün) nach HP-Inkubation, E: HP-Fluoreszenz, F: BODIPY FL C₅-Ceramid (rot).

Alle fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen wurden mit Hilfe der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie, also keiner konfokalen oder pseudo-konfokalen Technik, gemacht. Damit beinhalten sämtliche im Rahmen der vorgelegten Arbeit angefertigten Aufnahmen neben der **K1**-, **K2**-, **L**- oder Hämatoporphyrin-Fluoreszenz (und der Fluoreszenz der Gegenfärbung) der relevanten Ebene auch die gestreuten Anteile aus anderen Ebenen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dieser Art sind somit häufig unscharf und verschleiert. Eine absolut exakte Bestimmung der Lokalisation des Sensibilisators, vor allem auch in kleinen Maßstäben, war daher nicht möglich. Die Bewertung der dokumentierten Beobachtungen muss sich aus diesem Grund auf die bisher beschriebenen Feststellungen beschränken. Genauere Aufnahmen und damit gesicherte Aussagen erhält man unter Verwendung eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops, welches aufgrund des konfokalen Prinzips das Streulicht eliminiert.

Zur Identifizierung der spezifischen Fluoreszenzlokalisierung von **L**, **K1**, **K2** und Hämatoporphyrin wurden Doppelfärbungen mit organellenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Lysosomen wurden mit LysoTracker Green DND 26, Mitochondrien mit MitoTracker Green FM und Rhodamin 123 und der Golgi-Apparat mit BODIPY FL C₅-Ceramid gefärbt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** diffus im Zytosol verteilt und in Zellmembranen, unter anderem bei den Lysosomen, den Mitochondrien und dem Golgi-Apparat, lokalisiert sind (Abbildungen 49 bis 51). Im Falle der normalen urothelialen Zellen scheinen die Porphyrinverbindungen **K1** und **K2** nicht in den Lysosomen und zusätzlich für **K2** nicht in den Mitochondrien lokalisiert zu sein (Abbildung 51A, Kapitel 7.2). Aus der Literatur ist bekannt, dass vor allem die Inkubationszeit einen großen Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung von Photosensibilisatoren hat. So zeigte Seidl,^[160] dass die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der zellulären Protoporphyrin IX-Verteilung bei einer 3-stündigen Inkubationszeit in RT4-Urothelkarzinomzellen und in normalen urothelialen Zellen UROtsa ein sehr ähnli-

ches Muster ergab. So ist der größte Teil des zellulären PPIX in Membranen wie Plasmamembranen und membrannahen Regionen lokalisiert. Nach einer kürzeren Inkubationszeit (1 Stunde) hingegen wurde in den normalen urothelialen Zellen UROtsa eine punktuelle, intrazelluläre Verteilung von PPIX gegenüber einer hauptsächlich membrannahen Lokalisation in den Tumorzellen RT4 beobachtet. Somit kann man vermuten, dass auch bei den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen bei einer Verkürzung der Inkubationszeit ein deutlicher Unterschied zwischen Tumor- und Normalzellen im Sinne einer intrazellulären Verteilung auftritt. Kürzere Inkubationszeiten sind bei Porphyrin-Platin(II)-Komplexen durchaus denkbar, denn der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** zeigt schon nach wenigen Stunden Inkubation die gleiche antiproliferative Wirkung wie bei Dauerinkubation (siehe Kapitel 4.1.4). Außerdem wird der Platinkomplex schnell in die Zellen aufgenommen (siehe Kapitel 4.2.2). Interessanterweise wurde beim Kolokalisationsexperiment von **K1** mit MitoTracker Green FM keine Grünfluoreszenz vom Mitochondrienfarbstoff beobachtet, unabhängig davon, ob die Zellen zuerst mit **K1** oder mit MitoTracker Green FM inkubiert wurden. Die J82- oder UROtsa-Zellen wurden hierbei jeweils 24 Stunden mit einer Konzentration von 5 μ M **K1** inkubiert (Abbildungen 50A, B und 51B, C). Verringerte man die Konzentration auf 1 μ M, so konnte die charakteristische MitoTracker Green-Fluoreszenz mikroskopiert werden. Damit lassen sich photophysikalische Gründe zum Nichterscheinen der Grünfluoreszenz bei einer gleichzeitigen Inkubation mit 5 μ M **K1** ausschließen. Die Spezifität dieses Farbstoffs basiert nicht auf einer Ausnutzung von Membranpotentialen,^[161] sondern auf einer spezifischen Reaktion mit mitochondrialen Lipiden mittels zweier thiolreaktiver Chlormethylgruppen (siehe Abbildung 19).^[162] Insgesamt lässt dies die Vermutung zu, dass der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** die Bindungsstellen des MitoTracker Green FM entweder besetzt oder diesen kompetitiv ersetzt. Für die endgültige Bestimmung einer mitochondrialen Lokalisation von **K1** wurde ein zweiter, dieses Mal potentialsensitiver Mitochondrienfarbstoff, Rhodamin 123, verwendet. Dieser Farbstoff akkumuliert spezifisch in der mitochondrialen Matrix aufgrund des elektrostatischen Transmembranpotentials der Mitochondrien.^[163] Somit

besitzt Rhodamin 123 eine ganz andere Zielstruktur in den Mitochondrien und die Doppelfärbungen zeigten auch eine Kolokalisation der **K1**-Fluoreszenz mit der Grünfluoreszenz von Rhodamin 123 (Abbildungen 50C und 51D). Für den Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2** konnte diese bei der J82-Tumorzelllinie ebenfalls beobachtet werden. Bei der UROtsa-Zelllinie sind die MitoTracker Green-Fluoreszenz, auch die Rhodamin 123-Fluoreszenz und die **K2**-Fluoreszenz deutlich in voneinander verschiedenen Strukturen lokalisiert (siehe Anhang 7.2). Die Referenzverbindung Hämatoporphyrin und der Porphyrinligand **L** sind eher an Zellmembran und Golgi-Apparat gebunden (Abbildungen 52 und 53 und Kapitel 7.2). Generell war die mikroskopische Bestimmung der intrazellulären Hämatoporphyrin-Fluoreszenz mit zum Teil erheblichen Schwierigkeiten verbunden, deren folgenreichste sicherlich die kurze Lebenszeit und relativ schwache Intensität der Hämatoporphyrin-Fluoreszenz war.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die meisten Photosensibilisatoren in zytosolischen Organellen wie Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Lysosomen oder Membranen lokalisiert sind.^[164] So ist Photofrin anfangs zellmembranständig gebunden. Bei Erhöhung der Inkubationszeit konnte eine Lokalisation von Photofrin in den Mitochondrien gefunden werden.^[165] Die Gruppe um Wilson zeigte, dass Photofrin in RIF-Tumorzellen bei 18 Stunden Inkubation in den Mitochondrien lokalisiert ist.^[166] Viele andere Photosensibilisatoren der 2. Generation sind ebenso wie **K1** in den Lysosomen lokalisiert. Dies ist nicht verwunderlich, denn Lysosomen als Sammelbecken für Stoffwechselprodukte bzw. zelluläre Abfallstoffe sowie als intrazelluläre Vesikel mit einem niedrigem pH-Wert (lysosomaler pH: ~ 4,5-6,0; zytoplasmatischer pH: ~ 6,8-7,4) sind unter Berücksichtigung der Anreicherungstheorien von Photosensibilisatoren prädestiniert für die Lokalisation porphyrinartiger Photosensibilisatoren (siehe Kapitel 1.3.3). So wurde unter anderem für ALA-induziertes Protoporphyrin IX,^[167] Zink(II)-Phthalocyanine,^[168] sulfonierte Aluminiumphthalocyanine^[169] oder für *meta*-Tetra-(hydroxyphenyl)chlorin^[170] auch eine Lysosomenlokalisierung jeweils in verschiedenen Tumormodellsystemen gefunden.

Allgemein lässt sich somit festhalten, dass **K1** und **K2** an zelluläre Strukturen gebunden sind, die essentiell für die Effektivität der photodynamischen Therapie sind.

4.4 Penetrationseigenschaften von K1 und K2 in multizellulären Tumorsphäroiden

In multizellulären Tumorsphäroiden treten aufgrund der dreidimensionalen Struktur räumliche Unterschiede unter anderem in der Sauerstoffkonzentration, im jeweiligen Proliferationsgrad der Zellen, in der metabolischen Aktivität der Zellen und auch in der Nährstoffverfügbarkeit auf. Diese Inhomogenitäten, basierend auf der Lokalisation der Zellen im Sphäroid, spiegeln somit die vorhandenen Gradienten in soliden Tumoren wider. Damit gelten Sphäroide als wichtige *in vitro*-Modelle für Tumore *in vivo*.

Mit derartigen dreidimensionalen Kultursystemen besteht nun die Möglichkeit, die Penetrationseigenschaften von Porphyrin-Platin(II)-Komplexen in multizellulären Sphäroiden von J82 und UROtsa zu untersuchen. Dazu wurden Sphäroide aus J82- oder UROtsa-Zellen unter Verwendung der Liquid-Overlay-Technik gezüchtet und ab einer bestimmten Sphäroidgröße unterschiedlich lange mit **L**, **K1**, **K2** und Hämatoporphyrin in einer Konzentration von 5 μ M inkubiert. Die Porphyrinfluoreszenz und damit die Verteilung von **L**, **K1**, **K2** und Hämatoporphyrin in 5 μ m dicken Sphäroidschichten wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen.

In den Abbildungen 54 und 55 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen für die J82- und UROtsa-Sphäroide mit den dazugehörigen HE-Färbungen dargestellt. Die dreidimensionalen Zellaggregate wurden 1, 4 und 24 Stunden mit **K1** in einer Endkonzentration von 5 μ M inkubiert. Dabei weist der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** eine zeitabhängige Penetration in J82-Sphäroide wie auch in UROtsa-Sphäroide auf. Nekrotische Sphäroidabschnitte sind bei beiden Zelllinien ausgespart.

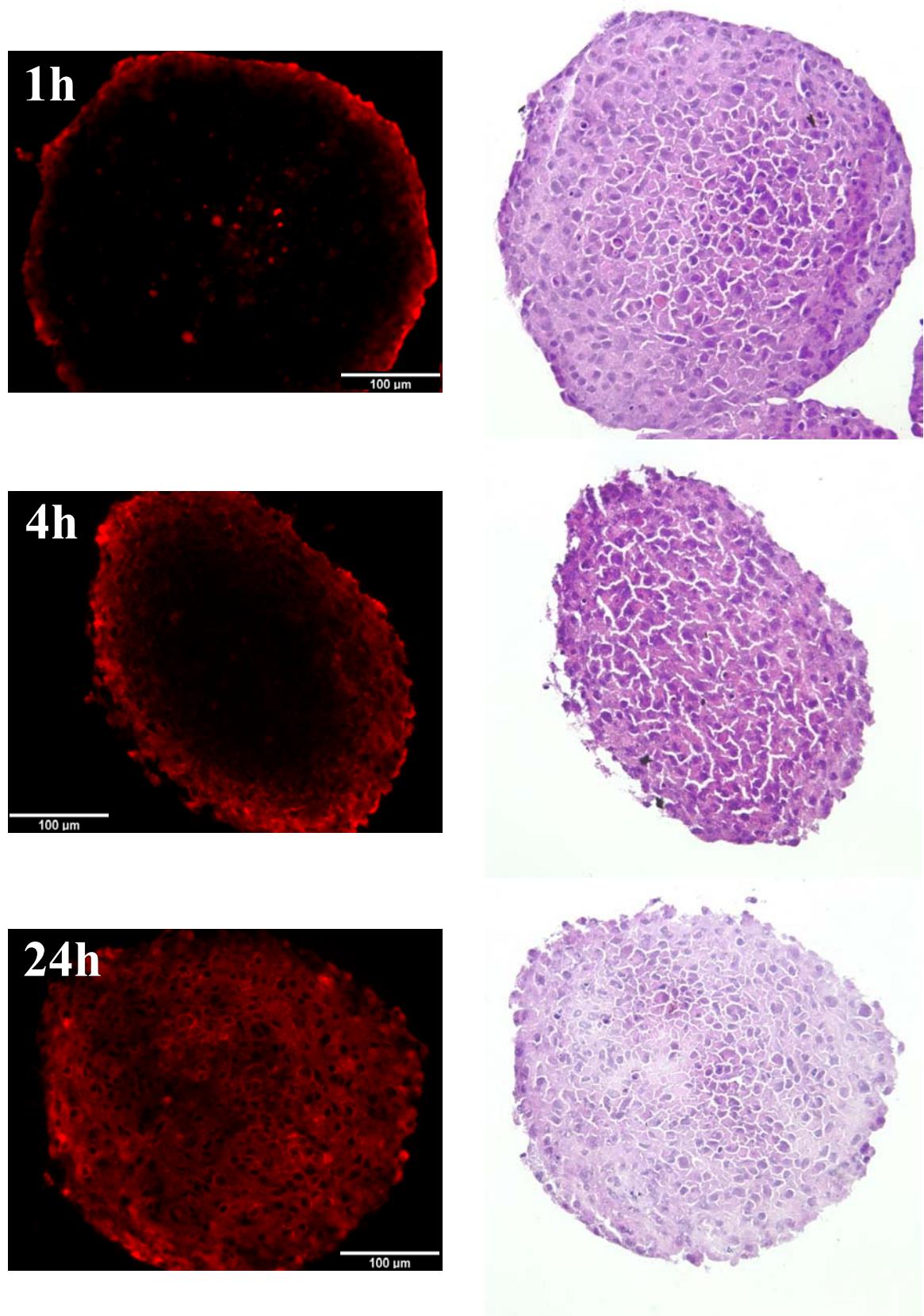


Abbildung 54: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und dazugehörige HE-Färbungen zur Untersuchung der Penetration von **K1** in J82-Sphäroide bei Inkubationszeiten von 1, 4 und 24 Stunden.

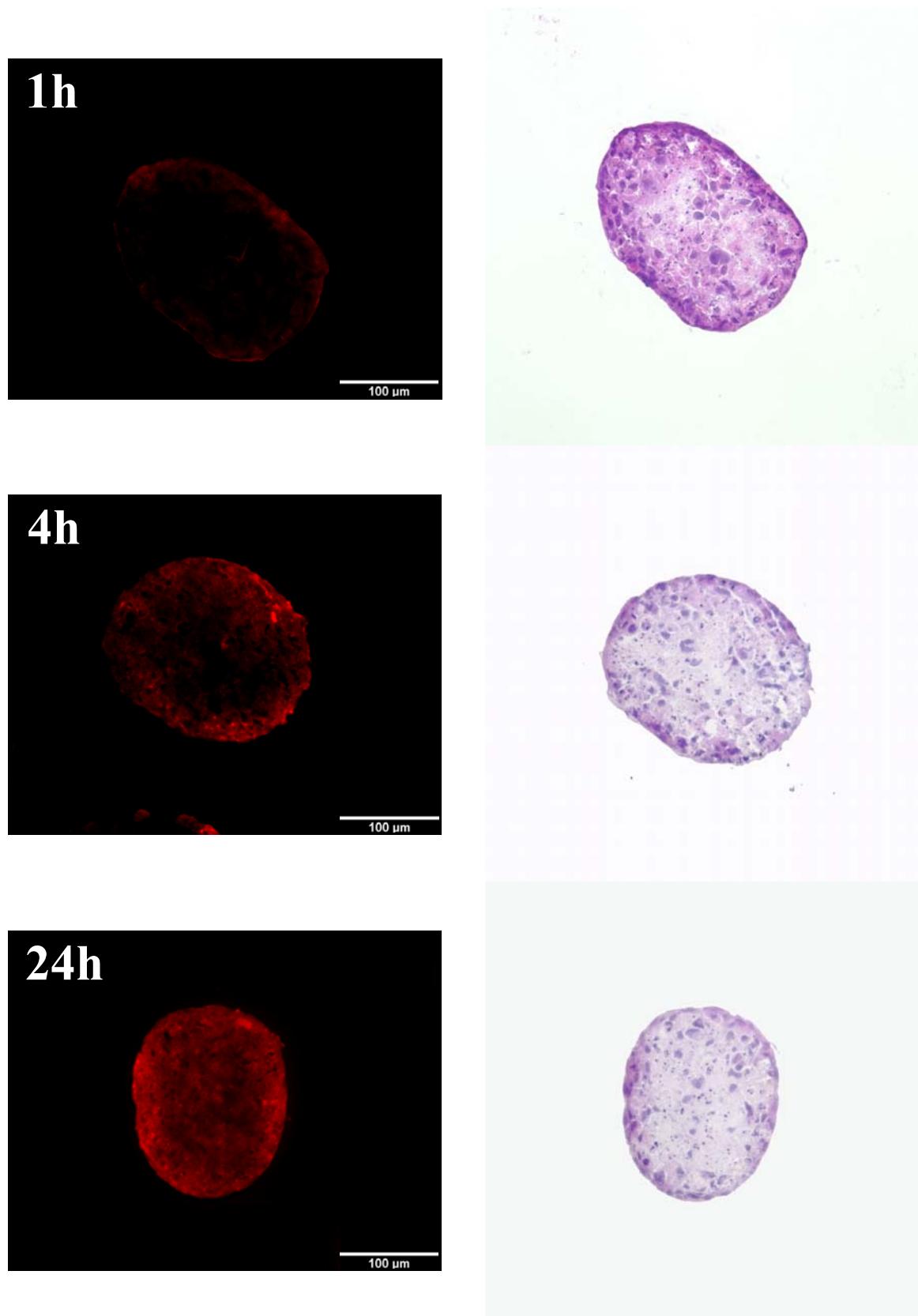


Abbildung 55: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und dazugehörige HE-Färbungen zur Untersuchung der Penetration von **K1** in UROtsa-Sphäroide bei Inkubationszeiten von 1, 4 und 24 Stunden.

Auch für den Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2**, den Porphyrinligand **L** und Hämatoporphyrin wurden die Penetrationseigenschaften in den dreidimensionalen J82- und UROtsa-Zellaggregaten fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei ergaben sich die gleichen Verteilungsmuster wie beim Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1**.

Zusätzlich zur qualitativen Untersuchung der Penetrationseigenschaften der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe wurde mit Hilfe der Software MetaMorph die Porphyrinfluoreszenz für die generierten Sphäroidbilder quantifiziert. Dabei wurden die Sphäroide in drei Bereiche unterteilt und für die Bestimmung der Porphyrinfluoreszenz wurden insgesamt gleich große Sektorenflächen gewählt. Aufgrund der unterschiedlichen Größe der Sphäroide und der damit verbundenen unterschiedlich weiten Penetrationswege für die Verbindungen durfte nur für den äußeren Sektor die Signifikanz berechnet werden. Dabei ergab sich, dass die auf die Autofluoreszenz bezogenen Fluoreszenzintensitäten für die J82-Sphäroide jeweils größer sind als für die Sphäroide aus den normalen urothelialen Zellen.

Die Ergebnisse der Sphäroidexperimente zeigen, dass trotz der relativ hohen Molmasse der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe ($M > 2000$ g/mol) die Penetration der Platinkomplexe nicht auf die äußeren Zelllagen der dreidimensionalen Zellaggregate beschränkt war. Nach 24 Stunden Inkubation der Sphäroide mit **L**, **K1**, **K2** und Hämatoporphyrin in einer Konzentration von $5\text{ }\mu\text{M}$ konnte eine Porphyrinfluoreszenz auch im Zentrum der Sphäroide fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. Zudem bleiben die Fluoreszenzintensitätsunterschiede zwischen den Tumorzellen J82 und den normalen Zellen UROtsa auch in dem dreidimensionalen Kultursystem erhalten, das der *in vivo*-Situation näher kommt als die Monolayer-Kulturen (Abbildung 56).

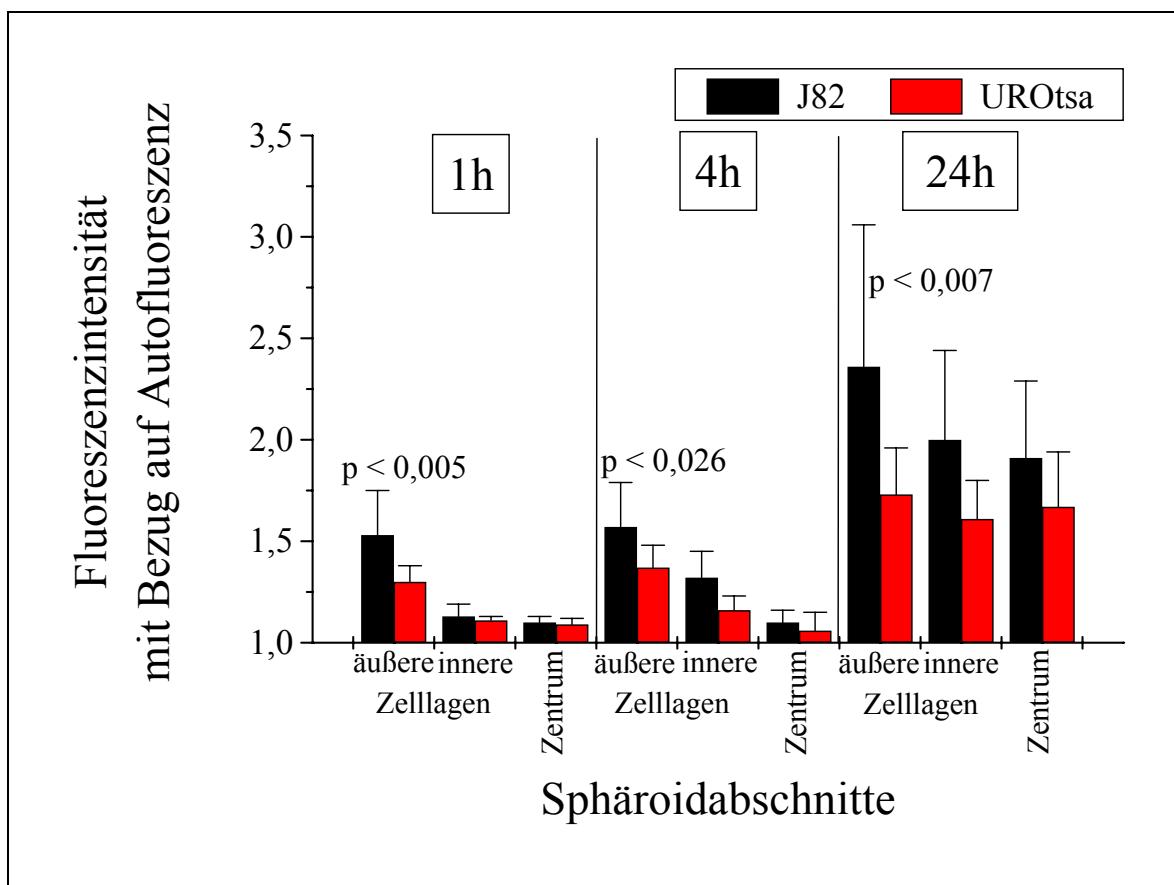


Abbildung 56: Quantitative Analyse der **K1**-Fluoreszenz bei den J82- und UROtsa-Sphäroiden.

Porphyrin-Platin(II)-Komplexe beinhalten zwei Komponenten, die sich für analytische Untersuchungen eignen. Alle bisherigen Experimente wie jene zur Porphyrin-Platin(II)-Komplex-Akkumulation, zur intrazellulären Lokalisation und zu Penetrationseigenschaften der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe bezogen sich auf die fluoreszente Eigenschaft der Porphyrinkomponente. Weiterführende Studien sollen nun die Platineinheit der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe genauer analysieren.

4.5 Quantitative Platinbestimmung mit der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Aus den bisher durchgeführten Untersuchungen ging hervor, dass der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** die vielversprechendsten Eigenschaften im Sinne einer neuen Klasse an Photosensibilisatoren mit intrinsischer Zytotoxizität aufweist. So konnte mittels Fluoreszenzspektroskopie für **K1** eine Selektivität um den Faktor 1,5 zu den Harnblasenkarzinom-Zellen J82 im Vergleich zu normalen urothelialen Zellen festgestellt werden (siehe Kapitel 4.2.1). Außerdem zeigte der Platinkomplex in den Chemosensitivitätstests eine ähnliche antiproliferative Wirkung auf J82-Zellen wie die Referenzverbindung Cisplatin, jedoch unter gleichzeitiger Schonung der UROtsa-Zellen (siehe Kapitel 4.1.1 und 4.1.2). Zudem konnte aufgrund der ausgeprägten phototoxischen Eigenschaften von **K1** eine zusätzliche Wachstumshemmung nach Bestrahlung mit inkohärentem Licht erreicht werden (Kapitel 4.1.5). Folglich wird im Weiteren der vorgelegten Arbeit genauer auf die Untersuchung der Platinkomponente des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes **K1** mit der dazugehörigen Referenzverbindung Cisplatin eingegangen.

4.5.1 Quantifizierung von zellassoziiertem Platin nach Behandlung von J82- und UROtsa-Zellen mit K1 und Cisplatin

4.5.1.1 Strategie

In den folgenden Versuchen sollte festgestellt werden, ob und inwieweit der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** im Vergleich zu Cisplatin in J82-Zellen angereichert wird. Vergleichend dazu wurde auch das Aufnahmeverhalten der Platinverbindungen in die UROtsa-Zellen untersucht. Hiermit sollte geklärt werden, inwieweit die Carrier-Eigenschaft der Porphyrine, die eine Anreicherung der Platinkomponente bewirken sollte, zum Tragen kommt und ob ein unterschiedliches Ausmaß an Anreicherung die Erklärung für die unterschiedliche Wirkung der beiden Zytostatika ist.

Die Tumor- und Normalzellen wurden hierzu mit den Platinverbindungen behandelt, nach verschiedenen Inkubationszeiten geerntet, homogenisiert und atomabsorptionsspektrometrisch vermessen. Die Inkubationszeit der J82- und UROtsa-Zellen mit den Platinkomplexen betrug zwischen 0 und 24 Stunden. Als weiteres Kriterium der Aufnahmekinetik in die J82- und UROtsa-Zellen sollte geprüft werden, ob die akkumulierte Platinmenge mit der Inkubationszeit kontinuierlich zunimmt oder ob etwa schon nach kurzer Zeit ein stationärer Zustand erreicht wird.

Die Konzentrationen der Komplexe im Kulturmedium betrug bei den Versuchsanträgen entweder 3 μM oder 5 μM . Der Auswahl dieser Platinkonzentrationen liegen folgende Überlegungen zu Grunde: Einerseits sollte eine möglichst hohe Platinkonzentration gewählt werden, bei der die Zellen bereits eine eindeutige Wachstumshemmung aufweisen und die aufgenommene Platinmenge durch AAS nachgewiesen werden kann. Andererseits war zu befürchten, dass die Tumor- und Normalzellen durch zu hohe Konzentrationen zu stark geschädigt werden. Nach Begutachtung der Ergebnisse aus den Zellkulturexperimenten schienen die Konzentrationen von 3 μM und 5 μM geeignet zu sein (Kapitel 4.1.1 und 4.1.2).

4.5.1.2 Bestimmung des zellassoziierten Platins

Die Bestimmung von Platin in den Versuchen zur zeitabhängigen Aufnahme von **K1** und Cisplatin erfolgte in Anlehnung an die in der Dissertation von Koch^[129] beschriebene Methode mit Hilfe der AAS.

Für die Bestimmung der Konzentration des zellassoziierten Platins gelten die Zellparameter für die J82- und UROtsa-Zelllinie aus Tabelle 8.

Die zellassoziierte Platinkonzentration $c_{Pt, Z}$ wird über

$$c_{Pt, Z} = \frac{\frac{m_{Pt, Z_{sp., AAS}}}{M_{Pt}}}{\bar{V}_Z \cdot N_{Z, Z_{sp., AAS}}} \cdot 10^{-3} [M]$$

mit

$m_{Pt, Z_{sp., AAS}}$ = die durch AAS in der eingespritzten Zellsuspension ermittelte Menge an Platin in ng

M_{Pt} = molare Masse von Platin in g mol^{-1}

\bar{V}_Z = mittleres Volumen einer J82- oder UROtsa-Zelle in pl

$N_{Z, Z_{sp., AAS}}$ = Zahl der Zellen in der zur AAS verwendeten Zellsuspension berechnet.

Dabei gilt:

$$N_{Z, Z_{sp., AAS}} = \frac{f_{Br.} \cdot w_{Pr., Z} \cdot V_{AAS}}{\bar{m}_{Pr., Z}} \cdot 1000$$

mit:

$f_{Br.}$ = Verdünnungsfaktor bei der Proteingehaltsbestimmung nach Bradford

$w_{Pr., Z}$ = Proteingehalt aus der Proteinbestimmung nach Bradford in $\mu\text{g ml}^{-1}$

V_{AAS} = in das AAS-Gerät eingespritztes Volumen in μl ($10\mu\text{l}$)

$\bar{m}_{Pr., Z}$ = mittlere Proteinmasse in einer J82- oder UROtsa-Zelle in pg.

In den Abbildungen 57 und 58 ist die detektierte Menge an zellassoziiertem Platin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt.

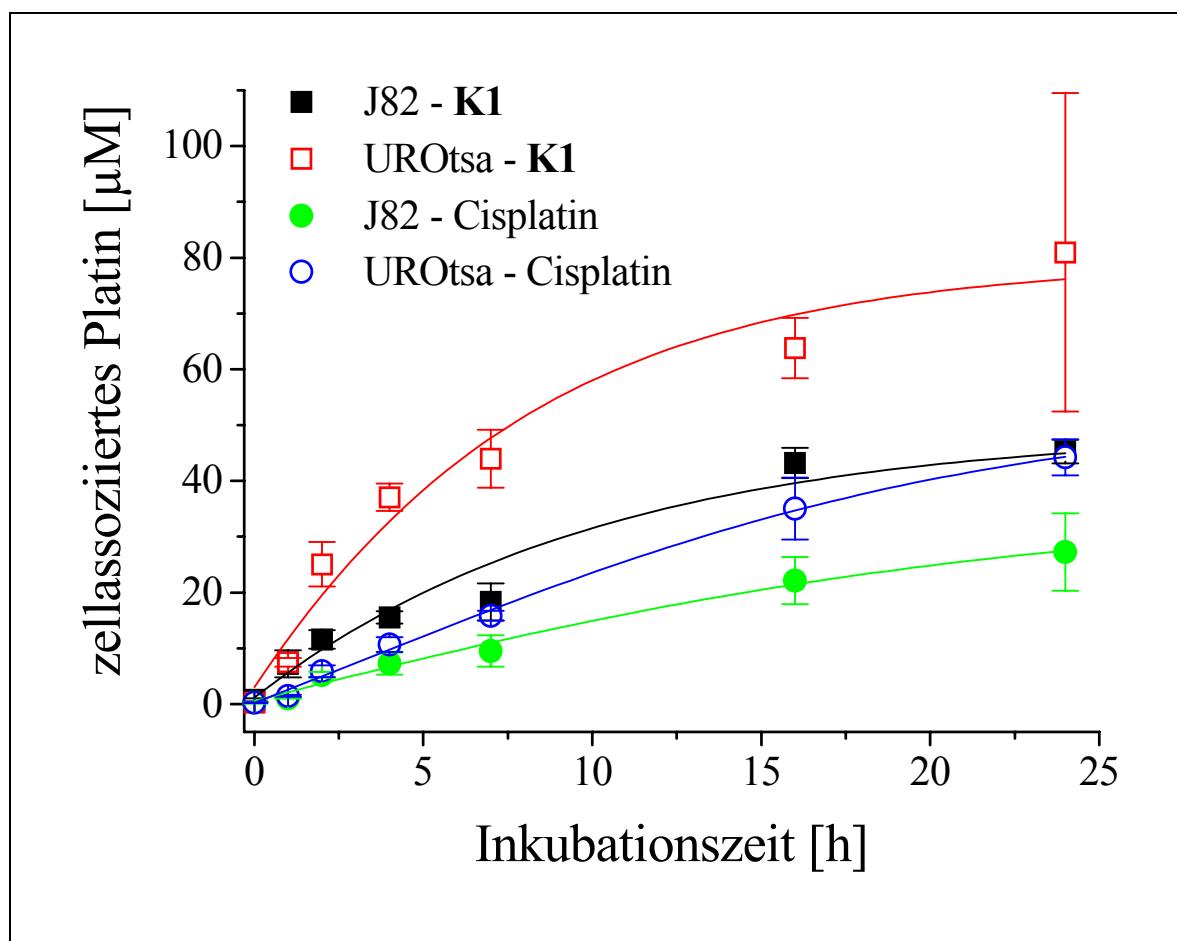


Abbildung 57: Aufnahmekinetik von **K1** bzw. **Cisplatin** in J82- und UROtsa-Zellen bei Inkubation mit $3 \mu\text{M}$ Pt-Komplex.

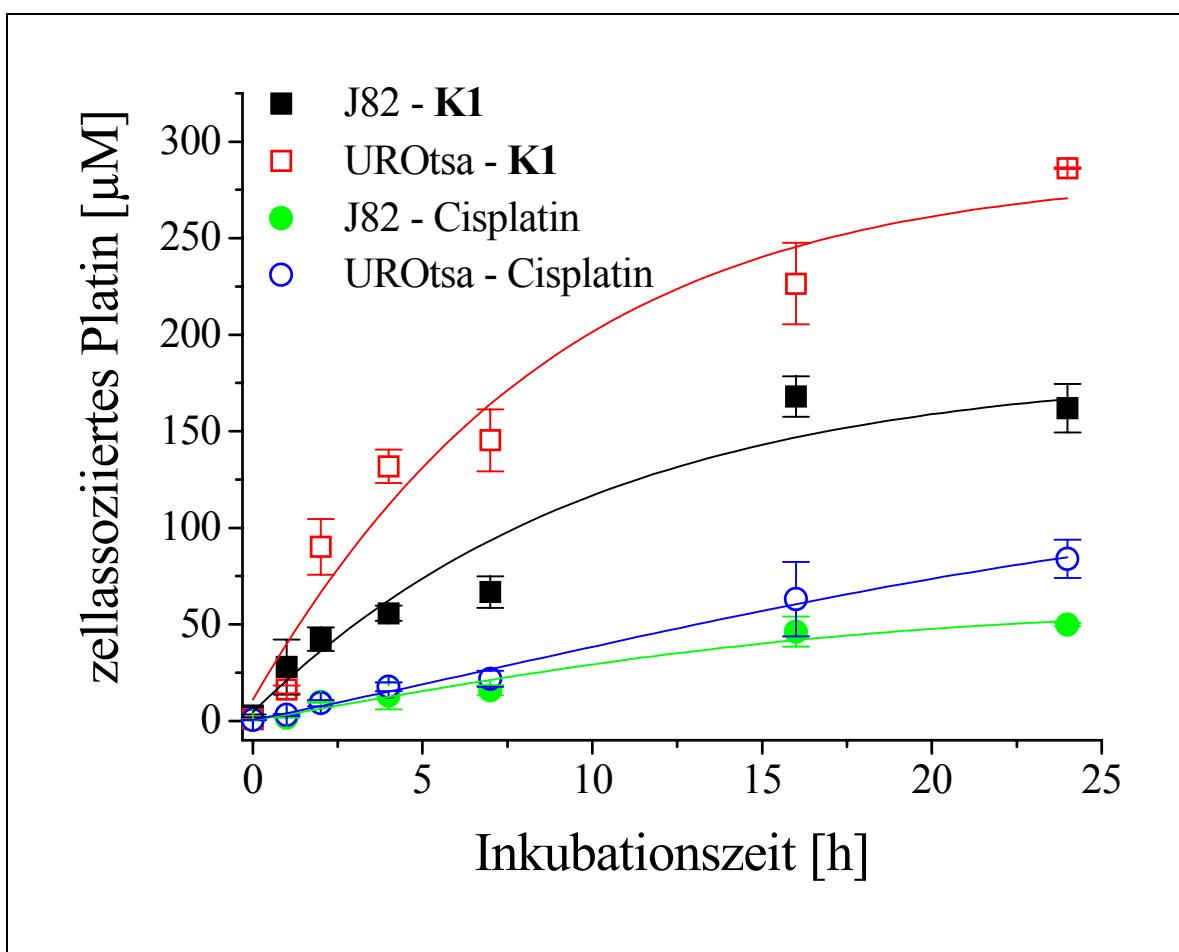


Abbildung 58: Aufnahmekinetik von **K1** bzw. Cisplatin in J82- und UROtsa-Zellen bei Inkubation mit 5 μ M Pt-Komplex.

Auffällig ist zunächst die höhere Konzentration an zellassoziiertem Platin von **K1** gegenüber Cisplatin sowohl in J82-Zellen als auch in UROtsa-Zellen bei 3 μ M und 5 μ M Substanzinkubation. Zusätzlich muss auch auf die ausgeprägte Anreicherung von **K1**, etwas weniger von Cisplatin, in den J82- und UROtsa-Zellen hingewiesen werden. So ist die zellassoziierte Konzentration von **K1** im Falle von 5 μ M Konzentration und J82-Zellen in etwa 32fach höher als die extrazelluläre Platinkonzentration. Die Aufnahmen von **K1** und Cisplatin selbst folgen einer Sättigungskinetik, jedoch wird der Maximalwert langsamer erreicht als die fluoreszenzspektroskopische Quantifizierung des zellassoziierten Porphyrins von **K1** ergab. In sehr guter Über-

einstimmung ist die Konzentration des zellassoziierten Platins von **K1** in J82-Tumorzellen nach 24 Stunden Inkubation bei einer Konzentration von 5 μM mit $161,9 \pm 12,5 \mu\text{M}$ mit dem fluoreszenzspektroskopisch ermittelten Porphyringehalt von **K1** mit $166,4 \pm 6,0 \mu\text{M}$. Hingegen konnte für die normalen urothelialen Zellen kein entsprechender Zusammenhang gefunden werden. Außerdem zeigen die Abbildungen 57 und 58, dass die Konzentration des zellassoziierten Platins sowohl für **K1** als auch für Cisplatin jeweils in den Normalzellen UROtsa größer ist als in den Tumorzellen, was im Widerspruch zum Gehalt des zellassoziierten Porphyrins steht.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe in Bezug auf die beiden Zelllinien unterschiedliche Reaktionswege und Aufnahmemechanismen beschreiten. Zum Beispiel ist eine frühzeitige Spaltung des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes in Porphyrin- und Platineinheit durchaus denkbar. Der Widerspruch, dass der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** die J82-Zellen deutlich stärker schädigt als die normalen urothelialen Zellen UROtsa (siehe Kapitel 4.1.2), jedoch der Gehalt des zellassoziierten Platins von **K1** in UROtsa-Zellen höher ist als in den Tumorzellen, sollte nun mittels DNA-Bindungsstudien geklärt werden. Schließlich ist es die Bindung der Platinkomplexe an das Zielmolekül in der Zelle, die DNA, was die antitumorale Wirkung hervorruft.

4.5.2 Quantifizierung der DNA-Platinierung

Im Zusammenhang mit der Aufklärung des Wirkmechanismus von **K1** wurde das Ausmaß der DNA-Platinierung nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 3 μM und 5 μM **K1** oder Cisplatin bei den J82- und UROtsa-Zellen untersucht. Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen mit den Platinkomplexen wurde die DNA isoliert, mit Ethanol gefällt und anschließend das an die DNA irreversibel gebundene Platin mittels AAS bestimmt. Der Grad der Platinierung wird in Basenpaaren pro Platinatom angegeben. Damit bedeutet ein kleiner Basenpaar/Pt-Atom-Wert eine hohe DNA-Platinierung und umgekehrt.

Die Ergebnisse in den Abbildungen 59 und 60 zeigen, dass die Platinierung der DNA in den UROtsa-Zellen durch den Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** größer ist als in den Tumorzellen.

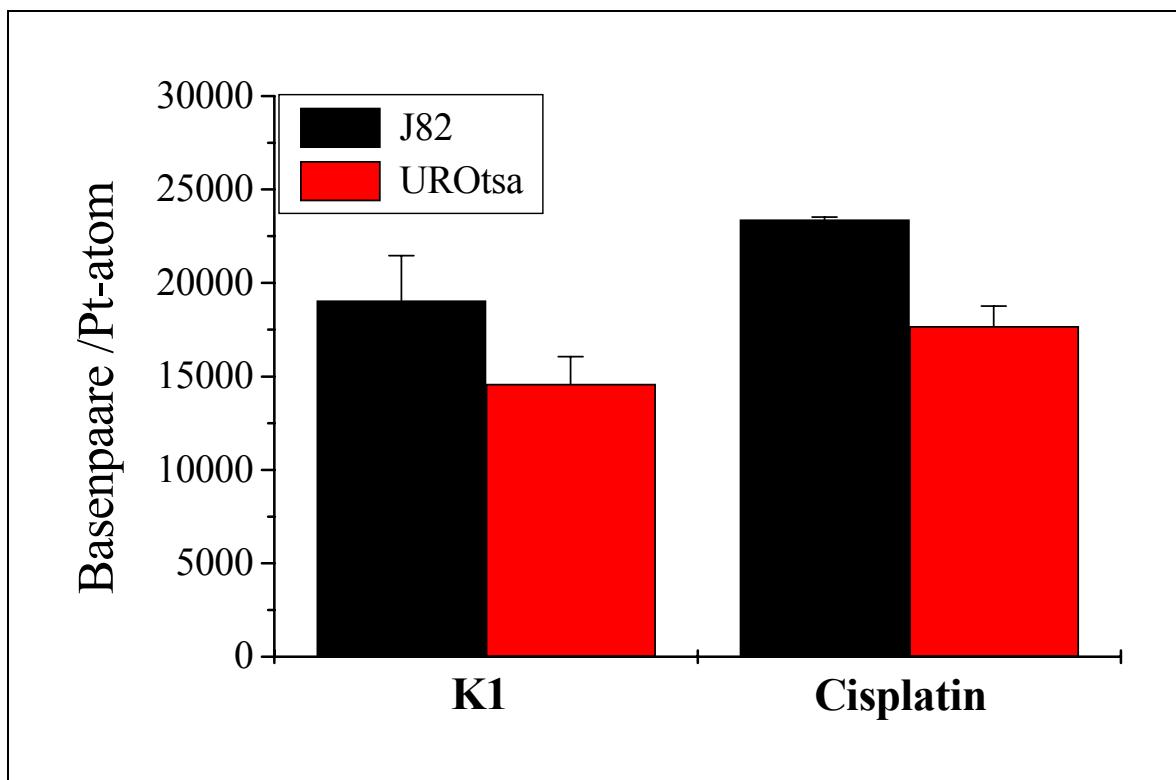


Abbildung 59: DNA-Platinierung nach einer 24-stündigen Inkubation der J82- und UROtsa-Zellen mit 3 μ M **K1** und Cisplatin.

So beträgt für 3 μ M-Inkubation der J82-Zellen mit **K1** der Basenpaar/Pt-Atom-Wert etwa 19000 ± 2400 , wohingegen bei den UROtsa-Zellen der Grad der DNA-Platinierung bei etwa 14500 ± 1450 Basenpaar/Pt-Atom liegt (Abbildung 59). Bei einer Inkubation der Zellen mit einer Wirkstoffkonzentration von 5 μ M sind entsprechend die Basenpaar/Pt-Atom-Werte niedriger: 8350 ± 840 Basenpaar/Pt-Atom für die J82-Zellen und 7250 ± 1100 Basenpaar/Pt-Atom für die normalen urothelialen Zellen (Abbildung 60). Für Cisplatin gilt bei 3 μ M Inkubation gleiches wie für den Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1**. Bei 5 μ M hingegen sind die J82-Tumorzellen stärker platiniert als die UROtsa-Zellen. Jedoch besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien.

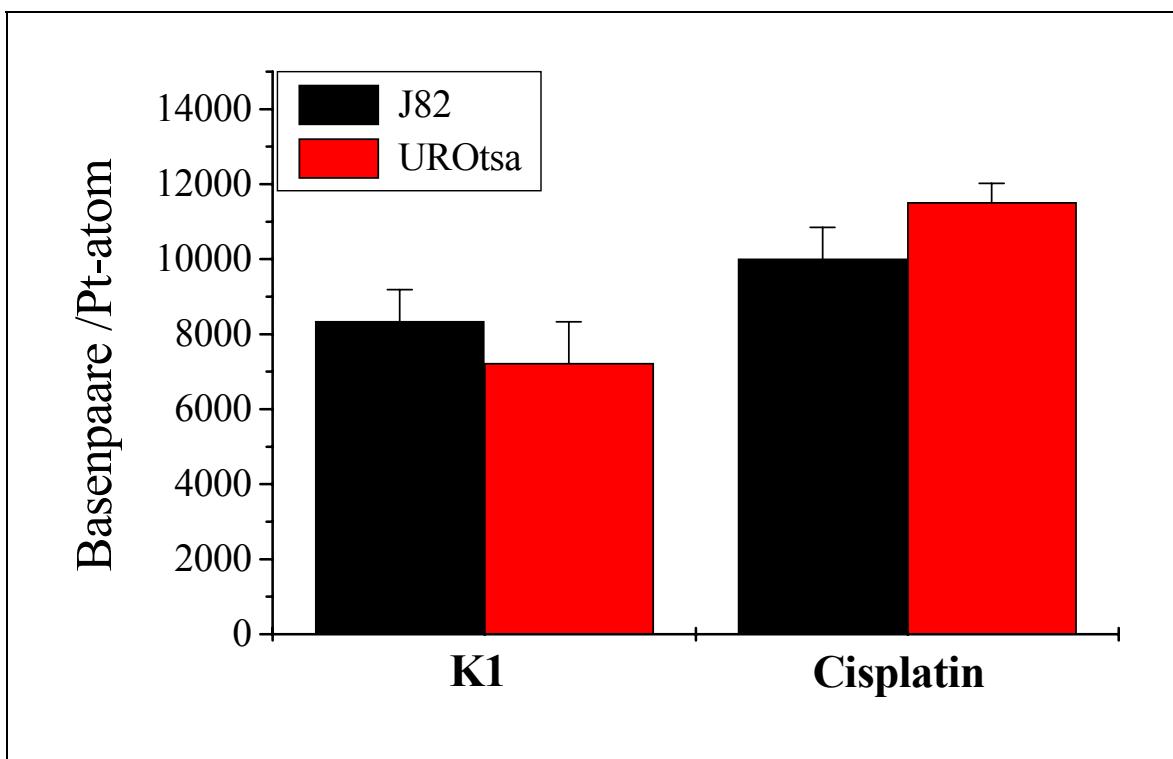


Abbildung 60: DNA-Platinierung nach einer 24-stündigen Inkubation der J82- und UROtsa-Zellen mit $5 \mu\text{M}$ **K1** und Cisplatin.

Diese experimentellen Daten lassen nach wie vor keinen klaren Zusammenhang von Grad der DNA-Platinierung zur antitumoralen Wirkung der Porphyrin-Platin(II)-Platinkomplexe erkennen. Obwohl **K1** gegenüber den Tumorzellen J82 eine deutlich bessere Antitumorwirkung aufweist als gegenüber den normalen urothelialen Zellen UROtsa, ist das Ausmaß der DNA-Platinierung nach 24-stündiger Inkubationszeit etwa 1,1 bis 1,3fach höher zu Gunsten der UROtsa-Zellen. Aus den Chemosensitivitätstests ging hervor, dass Cisplatin sowohl die J82- als auch die UROtsa Zellen in etwa gleichermaßen schädigt. Dies wiederum ist mit dem Grad der DNA-Platinierung vereinbar, denn für Cisplatin wurden für beide Zelllinien nahezu gleiche Basenpaar/Pt-Atom-Werte gefunden. Außerdem lässt sich mit Hilfe der DNA-Bindungsstudien die ähnliche, zum Teil höhere antitumorale Wirkung des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes **K1** im Vergleich zu Cisplatin auf die J82-Zellen erklären, da durch **K1** die DNA stärker platiniert ist als durch Cisplatin.

Die isolierte DNA von Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** und Cisplatin behandelten J82- und UROtsa-Zellen wurde auch fluoreszenzspektrophotometrisch untersucht. Dazu wurde, wie bei der fluoreszenzspektroskopischen Quantifizierung des zell-assoziierten Porphyrins (siehe Kapitel 3.4.3), die Emission bei 604 nm bei einer Anregung von 405 nm bestimmt. Es lässt sich zusammenfassen, dass zwischen den verschiedenen DNA-Proben kein Unterschied festgestellt werden konnte, d. h. es wurde keine für die Porphyrine spezifische Fluoreszenz bei den DNA-Proben detektiert.

Da Platinverbindungen mit Nukleophilen reagieren und dadurch inaktiviert werden können, lag der Gedanke nahe, dass die intrazelluläre Glutathionkonzentration bezüglich den beiden verwendeten Zelllinien unterschiedlich sein könnte. Denn nicht zu vergessen ist, dass die Art der Abgangsgruppe für die Reaktivität von Platinverbindungen ganz entscheidend ist. Cisplatin und die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe

unterscheiden sich deutlich in der Art der Abgangsgruppe und damit in der möglichen Reaktivität mit Nukleophilen. Um dieser Vermutung nachzugehen und eine mögliche Erklärung zu finden für die Diskrepanz zwischen DNA-Platinierungsgrad und antitumoraler Wirkung, wurden die intrazelluläre GSH-Konzentration und der Einfluss von Glutathion (GSH) auf das Wirkverhalten der Platinverbindungen bei der J82- und UROtsa-Zelllinie bestimmt.

4.5.3 Bestimmung der intrazellulären Glutathionkonzentration und des Einflusses von Buthioninsulfoximin (BSO) auf J82- und UROtsa-Zellen

Thiolhaltige Substanzen gelten als Hauptreaktionspartner von Platinkomplexen im biologischen Milieu. Die Reaktion mit Thiolen führt meistens zur Inaktivierung des Platinkomplexes, z. B. durch Bildung von Glutathionkonjugaten. Dabei kommt es zur Freisetzung der Abgangsgruppe, also des Porphyrinliganden bei den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen, und der Chloridliganden bei Cisplatin.^[171] Die gebildeten

Konjugate werden dann durch bestimmte Transporterproteine aus der Zelle entfernt.^[172]

4.5.3.1 Chemosensitivitätstest mit BSO

Da Glutathion Platinkomplexe inaktivieren kann, sollten Substanzen, die zu einer Verringerung der intrazellulären Glutathionkonzentration führen, den antiproliferativen Effekt von Platinverbindungen verstärken. Buthioninsulfoximin (BSO) ist ein Inhibitor der γ -Glutamylcystein-Synthetase, ein Schlüsselenzym bei der Biosynthese von Glutathion. Für Buthioninsulfoximin wurde eine Konzentration von 50 μ M ausgewählt, denn in Vorversuchen wurde hiermit kein toxischer Effekt an J82- und UROtsa-Zellen beobachtet. Für die Platinverbindungen wurden Konzentration von 0,25 μ M und 0,5 μ M verwendet.

Auffallend ist, dass für Cisplatin sowohl bei einer Konzentration von 0,25 μ M wie auch bei 0,5 μ M für beide Zelllinien nahezu keine Wirkverstärkung durch Reduzierung der intrazellulären Glutathionkonzentration mittels Buthioninsulfoximin erreicht werden konnte (Abbildungen 61 und 62). So verringerte sich der $T/C_{corr.}$ -Wert bei der J82-Zelllinie nach 130 Stunden Inkubation mit 0,5 μ M Cisplatin von etwa 73 % auf etwa 54 % mit BSO-Vorinkubation. Für die UROtsa-Zelllinie senkt sich der $T/C_{corr.}$ -Wert ähnlich von etwa 70 % auf 54 % (Abbildung 62). Im Falle des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes **K1** wurde für die UROtsa-Zelllinie keinerlei Wirkveränderung durch Vorinkubation der Zellen mit Buthioninsulfoximin beobachtet. Jedoch erhöht sich bei den J82-Zellen die antiproliferative Wirkung von **K1** nach Reduzierung des intrazellulären Glutathiongehalts deutlich. So nimmt der $T/C_{corr.}$ -Wert bei 0,25 μ M **K1** von etwa 80 % auf etwa 14 % nach 130 Stunden Inkubation und bei 0,5 μ M von etwa 54 % auf etwa 4 % ab (Abbildungen 61 und 62).

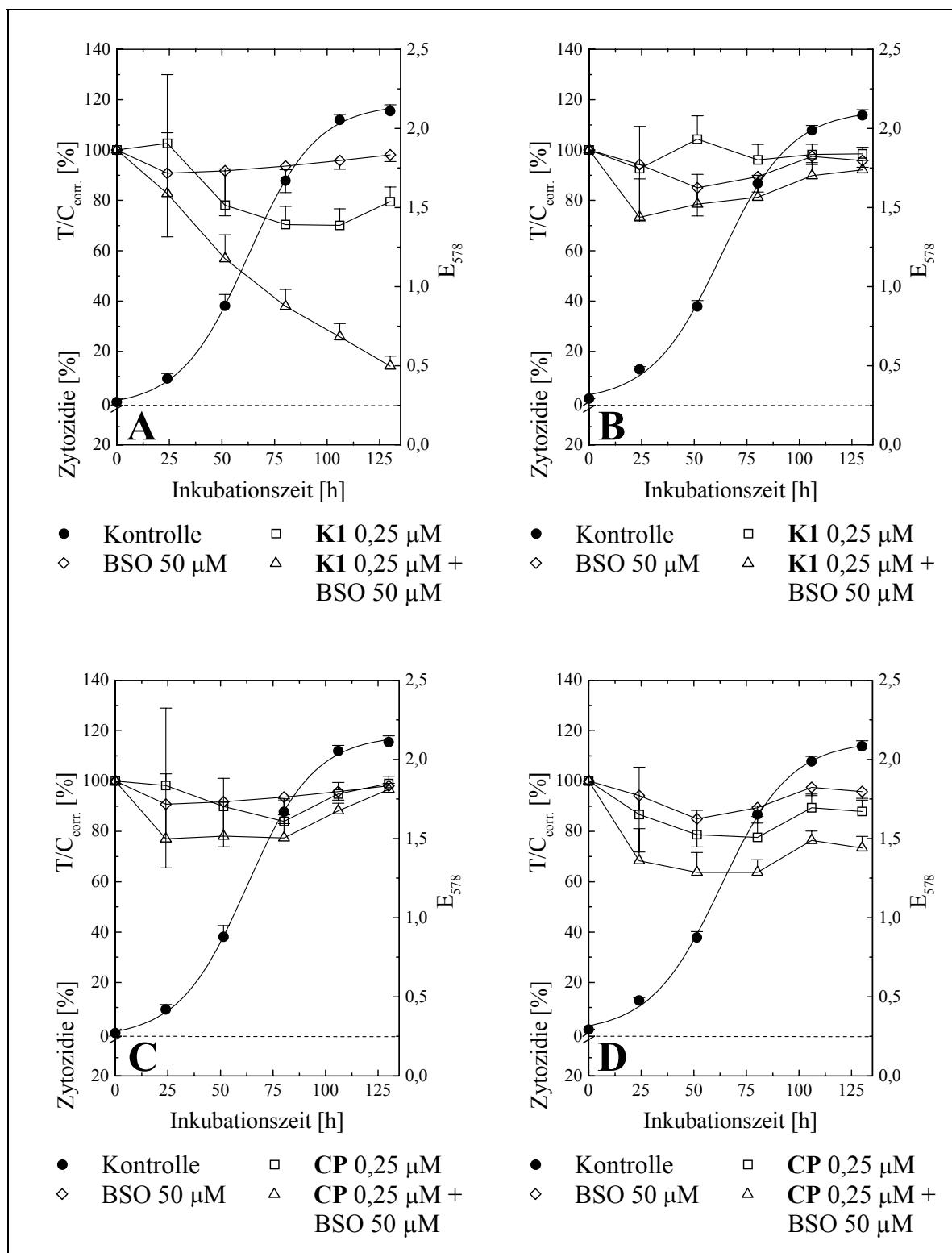


Abbildung 61: Effekt von **K1** (0,25 µM) und **Cisplatin** (**CP**, 0,25 µM) auf die Proliferation von J82- (A und C) und UROtsa-Zellen (B und D) nach Vorinkubation mit BSO (50 µM und 48 h).

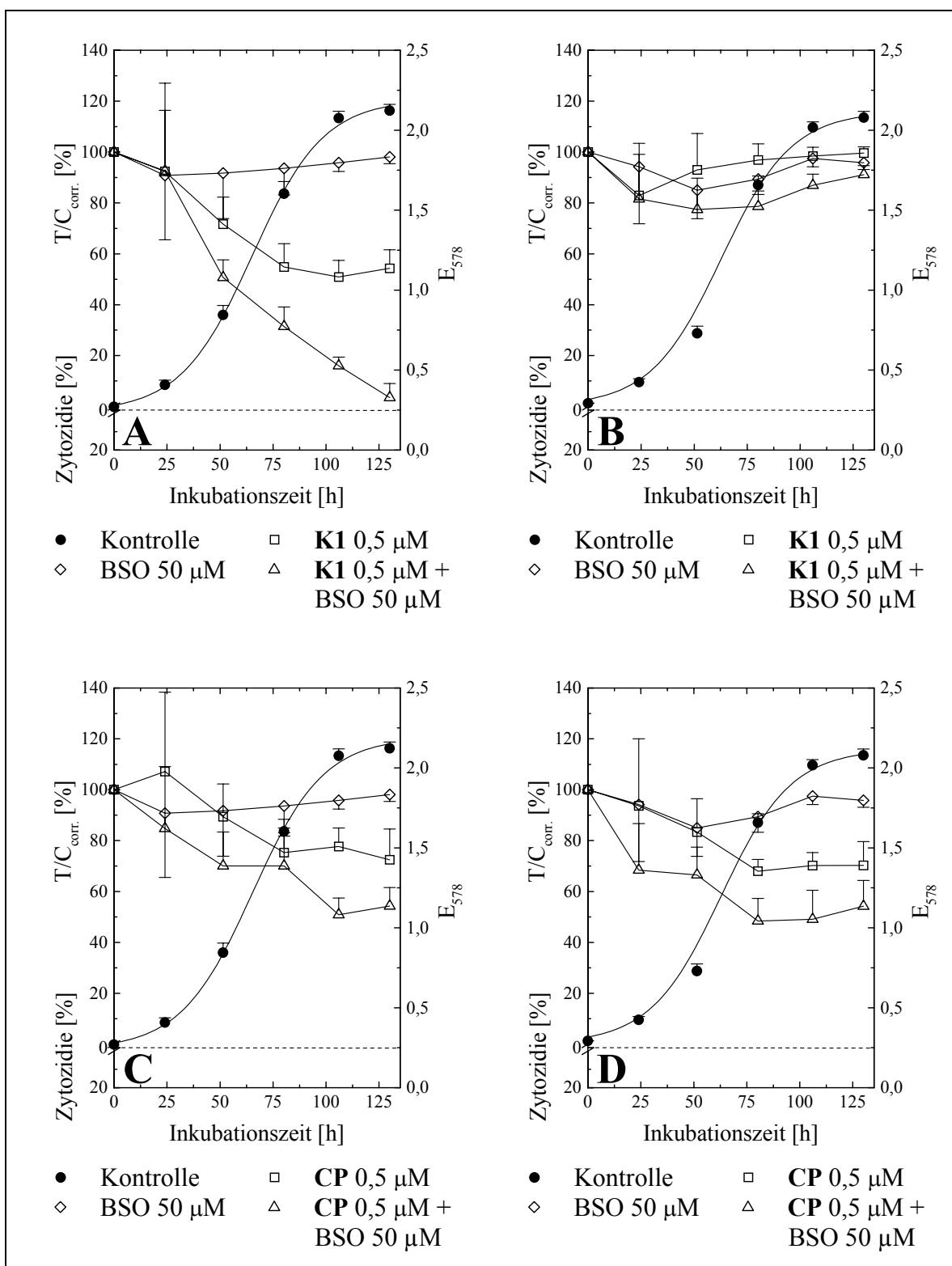


Abbildung 62: Effekt von **K1** (0,5 μ M) und Cisplatin (**CP**, 0,5 μ M) auf die Proliferation von J82- (A und C) und UROtsa-Zellen (B und D) nach Vorinkubation mit BSO (50 μ M und 48 h).

Es lässt sich festhalten, dass der Einfluss von Glutathion auf die Wirkung der Platinkomplexe bei der UROtsa-Zelllinie deutlich geringer ist als bei der J82-Tumorzelllinie. Durch Reduzierung der intrazellulären Glutathionkonzentration mittels Buthioninsulfoximin wurde bei der UROtsa-Zelllinie nahezu keine Erhöhung der antiproliferativen Wirkung der Platinkomplexe aufgrund geringerer Inaktivierung der Platinverbindungen durch die Thiolverbindung beobachtet.

Unklar ist, ob dies auf eine sehr hohe intrazelluläre Glutathionkonzentration bei den UROtsa-Zellen, die durch Inkubation von 50 µM Buthioninsulfoximin nahezu nicht verändert wird, zurückzuführen ist oder auf eine eher sehr geringe, wobei andere Reaktionsmechanismen zum Tragen kommen. Der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** zeigt in Gegenwart von BSO eine deutlich höhere antitumorale Wirkung auf die J82-Zellen. Für die Referenzverbindung Cisplatin ist dies nicht der Fall. Damit scheint für die Inaktivierung des Platinkomplexes **K1** das intrazelluläre Glutathion von größerer Bedeutung zu sein als bei Cisplatin. Dies beruht möglicherweise auf der höheren Reaktivität der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe gegenüber Nukleophilen, was mit den unterschiedlichen Abgangsgruppen in den beiden Platinverbindungen erklärt werden kann. Um die Rolle des intrazellulären Glutathions näher zu untersuchen, wurde zum einen der intrazelluläre Glutathionspiegel in den beiden verwendeten Zelllinien überprüft und zum anderen untersucht, ob BSO tatsächlich die intrazelluläre Glutathionkonzentration in den J82- und UROtsa-Zellen absenkt. Mit Hilfe des Ellman-Assays soll nun die genaue intrazelluläre Glutathionkonzentration in den beiden verwendeten Zelllinien bestimmt werden.

4.5.3.2 Ellman-Assay

Glutathion ist die am häufigsten vorkommende Nichtprotein-Thiolverbindung in Zellen. Für die Bestimmung des Gesamt-SH-Gehalts (d. h. SH-Gruppen in Proteinen und in niedermolekularen Verbindungen) und des SH-Gehalts von niedermolekularen Verbindungen (d. h. L-Cystein und vor allem Glutathion) in den J82- und UROtsa-Zellen wurde der Überstand nach Homogenisierung der Zellen mittels Ultraschall zum einen direkt und zum anderen nach Behandeln mit 10 %iger Trichloressigsäure mit dem Ellman-Reagenz 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoësäure) versetzt. Parallel dazu wurden die J82- und UROtsa-Zellen mit Buthioninsulfoximin 50 μ M 24 Stunden vorinkubiert. Damit sollte sich der Glutathiongehalt in den Zellen reduzieren. Die Proben wurden bei 412 nm am UV/Vis-Spektrophotometer vermessen. Die Ergebnisse werden als μ mol GSH/ 10^6 Zellen dargestellt.

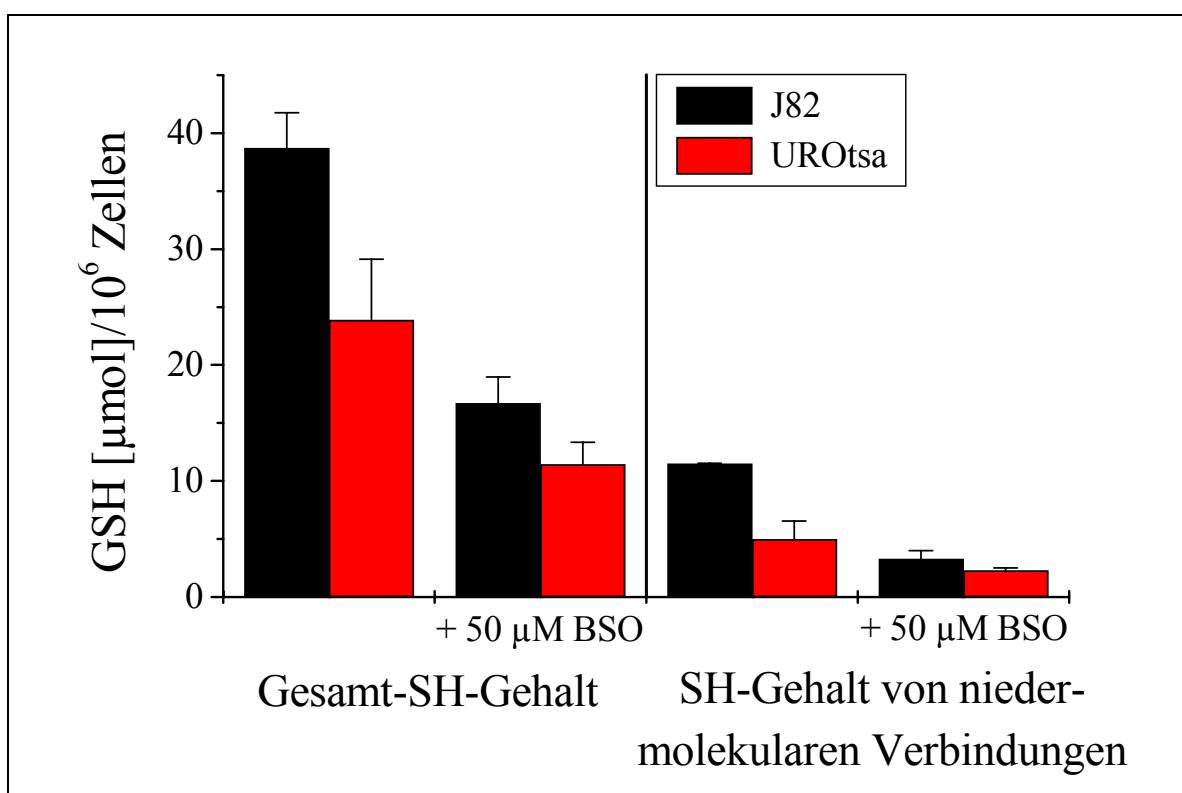


Abbildung 63: Gesamt-SH-Gehalt und SH-Gehalt von niedermolekularen Verbindungen in J82- und UROtsa-Zellen einschließlich Werte bei 50 μ M und 24-stündiger Buthioninsulfoximin-Vorinkubation.

Wie aus Abbildung 63 ersichtlich, nimmt der SH-Gehalt nach Buthioninsulfoximin-Vorinkubation für beide Zelllinien zwar ab, aber für die J82-Harnblasenkarzinom-Zellen wurde sowohl ein höherer Gesamt-SH-Gehalt als auch ein höherer SH-Gehalt von niedermolekularen Verbindungen (d. h. von Glutathion) gefunden.

4.5.4 Zusammenfassende Diskussion

Neben der fluoreszenzspektrometrischen Verfolgung der Aufnahme von Porphyrin-Platin(II)-Komplexen in Zellen kann auch die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) zur Bestimmung der Aufnahmekinetik in J82- und UROtsa-Zellen verwendet werden. Damit lässt sich die Platinkomponente der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe hinsichtlich Aufnahmeverhalten genauer untersuchen. Zudem lässt sich atomabsorptionsspektrometrisch der Grad der Platinierung der DNA bestimmen. Somit sollte sich ein Zusammenhang zwischen der zytotoxischen Wirkung der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe und dem Ausmaß der DNA-Platinierung feststellen lassen, denn schließlich wird die antiproliferative Wirkung von Platinkomplexen durch die Bindung an die DNA hervorgerufen. Als Referenzverbindung wurde Cisplatin verwendet.

Die Aufnahme von Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** und Cisplatin folgen einer Sättigungskinetik, wobei die Konzentration des zellassoziierten Platins von **K1** für 3 µM wie auch für 5 µM Substanzkonzentration und für beide Zelllinien jeweils größer ist als die von Cisplatin. Außerdem wurde in dieser Versuchsreihe festgestellt, dass die Konzentration des zellassoziierten Platins sowohl für **K1** als auch für Cisplatin jeweils in den normalen urothelialen Zellen UROtsa größer ist als in den Harnblasenkarzinom-Zellen J82. Dies steht im deutlichen Widerspruch zur Quantifizierung des zellassoziierten Porphyrins. Die fluoreszenzspektrometrischen Untersuchungen bezüglich der Platinkomponente der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe ergaben eine etwa 1,5fach höhere Konzentration an zellassoziiertem Porphyrin von **K1** in J82-Tumorzellen gegenüber UROtsa-Zellen. Dies deutet auf eine frühzeitige Spaltung der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe in die beiden Komponenten, in die Platin- und Porphyrineinheit, und – damit verbunden – auf unterschiedliche intra-

zelluläre Reaktionswege hin. Unterstützt wird diese Aussage durch die Beobachtung, dass mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie kein Unterschied zwischen der DNA von mit Porphyrin-Platin(II)-Komplex und mit Cisplatin behandelten Zellen gemessen werden konnte, d. h. es wurde keine für Porphyrine spezifische Fluoreszenz in den DNA-Proben detektiert. Somit ist anzunehmen, dass die Platin- und Porphyrineinheit der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe zu diesem Zeitpunkt der Zellinkubation (24 Stunden nach Substanzzugabe) bereits getrennt in den Zellen vorliegen. Zu bedenken bleibt, ob die Empfindlichkeit der Fluoreszenzmessung ausreicht, um eventuell vorhandene Porphyrinfluoreszenz an der DNA nachzuweisen.

Die Konzentration des zellassoziierten Platins spielt für die Beurteilung der antitumorale Wirkung der Platinkomplexe eine geringe Rolle, da die Reaktion der Platin-Einheiten mit der DNA die Zytotoxizität der Verbindungen ausmacht. Im Falle der Bestimmung des zellassoziierten Platins ist keine Unterscheidung des gemessenen Platins hinsichtlich extrazellulär oder intrazellulär gebunden möglich. So resultiert der höhere Gehalt an zellassoziiertem Platin bei den im Vergleich zu den J82-Tumorzellen kleineren UROtsa-Zellen (Tabelle 8) möglicherweise aus deren größerem Oberflächen-Volumen-Verhältnis.

Wie bereits beschrieben, können Platinkomplexe ihre Reaktionsfähigkeit durch Bindung an Aminosäuren und Proteinen in der Zelle, aber auch schon im Kulturmedium verlieren. Die Bestimmung des sogenannten freien Platins für **K1**, **K2** und Cisplatin im Kulturmedium sollte mit Hilfe der Ultrafiltration durchgeführt werden. Hierdurch würde der an Makromoleküle gebundene Anteil an Platin abgetrennt werden. In Vorversuchen wurde jedoch festgestellt, dass die wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexe an den Membranen der Nanosep-Filter (Pall GmbH) verschiedener Porengröße bei Ultrafiltration zum Teil hängen blieben. Damit konnte der freie, ultrafiltrierbare Platingehalt der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe nicht bestimmt werden. Für Cisplatin wurde der gleiche Platinwert von ultrafiltrierter und nicht filtrierter Probe gefunden.

Die Untersuchungen zur DNA-Platinierung zeigten, dass die DNA der UROtsa-Zellen nach 24-stündiger Inkubationszeit mit dem Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** 1,1 bis 1,3fach höher platiniert ist als die DNA der Tumorzellen. Für Cisplatin trifft dies bei einer Konzentration von 3 μ M ebenfalls zu, bei 5 μ M ist das Ausmaß der DNA-Platinierung nahezu identisch für beide Zelllinien. Da Cisplatin die normalen urothelialen Zellen UROtsa in etwa genauso stark schädigt wie die Tumorzellen J82, entspricht somit der in etwa gleiche Grad der DNA-Platinierung der gefundenen antiproliferativen Wirkung von Cisplatin auf die beiden Zelllinien. Für den Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** trifft dies nicht zu. Obwohl **K1** gegenüber den Tumorzellen J82 eine deutlich bessere Antitumorwirkung aufweist als gegen die normalen urothelialen Zellen, ist die DNA bei den UROtsa-Zellen nach 24 Stunden Inkubationszeit höher platiniert als bei den J82-Tumorzellen. Die von den Platinkomplexen ausgehenden unterschiedlichen Effekte auf das Wachstum der Tumor- und Normalzellen können also nicht anhand des Platinierungsgrads der DNA erklärt werden. Dies ist kein Einzelfall. In der Literatur sind eine Reihe von Platinkomplexen wie substituierte Diaqua(1,2-diphenylethylendiamin)platin(II)-sulfate beschrieben, bei denen auch zwischen antitumoraler Wirkung und Grad der DNA-Platinierung eine deutliche Diskrepanz vorliegt.^[173] Auch für Cisplatin sind in der Literatur Beispiele bekannt, wo keine Korrelation zwischen antiproliferativer Wirkung und dem Platinierungsgrad der DNA vorhanden ist. Derartige Beobachtungen wurden bei Ovarial-,^[174] Lungen-,^[175] Kolon-^[176] und Hodenkarzinomzelllinien^[177] gemacht.

Vielmehr müssen hierfür unterschiedliche Reaktionen der einzelnen Substanzen, Porphyrin-Platin(II)-Komplex und Cisplatin, mit den Strängen der DNA verantwortlich gemacht werden. Wie in der Einleitung schon dargestellt, sind die bevorzugten Bindungsstellen der hydrolysierten Platinkomplexe an der DNA die N7-Atome von Guanin und, in geringerem Ausmaß, von Adenin. Durch einen bifunktionalen Angriff der Komplexe an beiden Strängen besteht zum einen die Möglichkeit der Quervernetzung der DNA (interstrand cross-linking). Im Zellkern findet diese Art der Reaktion mit den Nukleobasen jedoch nur zu 1 % statt und wird daher als nicht entscheidend für die zytotoxische Wirkung eines Platinkomplexes gesehen.

Auf der anderen Seite kann der zweite Angriff des Komplexes auch innerhalb eines Stranges (intrastrand cross-linking) stattfinden, wobei die entsprechenden Basen entweder unmittelbar benachbart oder durch eine Base getrennt sind. Diese Art der Verknüpfung, die einen Knick in der DNA bewirkt, wird heute allgemein als Erklärung für eine Hemmung der DNA-Replikation bevorzugt.^[178] Daneben kann es aber auch zu monofunktionellen Bindungen der Komplexe an die DNA und zu DNA-Protein-crosslinks kommen, die therapeutisch jedoch keine Rolle spielen (siehe Kapitel 1.2.4). Demnach ist es denkbar, dass die Platineinheit des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes **K1** in den beiden Zelllinien unterschiedlich gebunden wird. Wie in den Chemosensitivitätstests gesehen, schädigt der Porphyrin-Platin(II)-Komplex die J82-Tumorzellen deutlich stärker als die normalen urothelialen Zellen, jedoch ist die DNA der UROtsa-Zelllinie höher platinierter als die der J82-Zelllinie. Folglich ist vorstellbar, dass der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** an die DNA der UROtsa-Zelllinie eher monofunktionell oder interstrand bindet, wohingegen bei der J82-Zelllinie eher intrastrand crosslinks vorkommen.

Thiolhaltige Verbindungen gelten als Hauptreaktionspartner von Platinkomplexen in Zellen und führen meistens zur Inaktivierung des Platinkomplexes. Das Tripeptid Glutathion ist die am häufigsten vorkommende Nichtprotein-Thiolverbindung in Zellen. Glutathion kann somit als Nukleophil wirken. Bei einem höheren Glutathiongehalt in UROtsa-Zellen als in J82-Zellen hätte man vermuten können, dass es zur stärkeren Ausbildung von DNA-Glutathion-crosslinks in UROtsa-Zellen kommt. Dies hätte die Diskrepanz zwischen DNA-Platinierungsgrad und antitumoraler Wirkung beim Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** erklären können. Jedoch zeigte sich im Ellman-Assay, dass sowohl der Gesamt-SH-Gehalt (d. h. SH-Gruppen in Proteinen und in niedermolekularen Verbindungen) als auch der SH-Gehalt von niedermolekularen Verbindungen (d. h. vor allem Glutathion) in J82-Zellen höher ist als in den UROtsa-Zellen. Verständlich ist aber nun die höhere DNA-Platinierung der UROtsa-Zellen im Vergleich zu den J82-Tumorzellen. Denn die geringere intrazelluläre Glutathionkonzentration bei der UROtsa-Zelllinie hat zur Folge, dass im Zytoplasma weniger nukleophile Reaktionspartner für die Platinverbindungen vor-

handen sind. Damit werden weniger Platinkomplexe im Zytoplasma deaktiviert; so mit können mehr Platineinheiten an die DNA der UROtsa-Zellen gelangen. Diese Ergebnisse weisen auf weitaus kompliziertere Reaktionswege bezüglich der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe hin.

Nicht zu vergessen ist, dass Platinverbindungen auch nach der Bindung an die DNA wieder entfernt werden können. Wahrscheinlich würde chromosomal DNA bei einer höheren Inkubationszeit als 24 Stunden noch weiterhin platinier werden, wenn nicht auch ein gleichzeitiger Ausbau durch Reparatur stattfände. Ein- und Ausbau von Platinkomplexen kann also gleichzeitig stattfinden. Zahlreiche Studien, die sich mit Resistenzerscheinungen beschäftigen, belegen eindeutig, dass diverse Zelllinien die Fähigkeit zur DNA-Reparatur besitzen, und dass die zytostatische oder zytotoxische Wirkung der Komplexe durch das Ausmaß der Reparatur entscheidend beeinflusst wird.^[179] Es ist z. B. bekannt, dass die Heilungschancen bei Hodenkarzinomen durch eine Cisplatin-Chemotherapie außerordentlich gut sind. In *in vitro*-Versuchen konnte festgestellt werden, dass Hodentumor-Zelllinien deutlich sensitiver auf viele Chemotherapeutika reagieren als z. B. Harnblasenkarzinom-Zelllinien.^[180] So konnte die Gruppe von Masters in *in vitro*-Experimenten zeigen, dass Hodenkarzinom-Zellen im Vergleich zu Harnblasenkarzinom-Zellen nur reduziert fähig sind, Cisplatin-geschädigte DNA zu reparieren. Dies könnte die Hypersensitivität der Hodenkarzinom-Zellen gegenüber DNA-schädigenden Substanzen erklären, denn auch die DNA der Hodenkarzinom-Zellen war weniger stark platinier als die der Harnblasenkarzinom-Zellen.^[181]

Damit ist anzunehmen, dass bei den normalen urothelialen Zellen UROtsa der Reparaturmechanismus deutlich effizienter funktioniert als bei den J82-Harnblasentumor-Zellen. Die Frage ist, warum unterschiedliche Spiegel von DNA-gebundenem Platin für die verschiedenen Platinkomplexe gefunden wurden. Ursache hierfür könnten unter anderem die unterschiedlichen Abgangsgruppen sein.

Alle Bestimmungen wurden auch für den Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2** durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Beobachtungen gemacht wie bei **K1**.

5 Kapitel

Ergebnisse

In vitro-Untersuchungen der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe K1a und K2a

5.1 Chemosensitivitätstest

Der wasserlösliche Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** zeigte in den bisher durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen vielversprechende Eigenschaften im Hinblick auf eine neue Klasse an Photosensibilisatoren mit intrinsischer Zytotoxizität. So schädigt **K1** die J82-Harnblasenkarzinom-Zellen stärker als die normalen urothelialen Zellen UROtsa, was für die Referenzverbindung Cisplatin nicht zutrifft. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die deutliche lichtinduzierte Toxizität von **K1** durch die in etwa 5fach höhere Anreicherung in J82-Zellen im Vergleich zur Referenzverbindung Hämatoporphyrin bedingt ist. Weitere Eigenschaften der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** wie Aufnahmekinetiken, intrazelluläre Lokalisation, Penetrationseigenschaften in 3-D Zellaggregaten oder Grad der DNA-Platinierung sind aus Kapitel 4 zu entnehmen. Jedoch sind die wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** mit den Polyethylenglykol-750-Seitenketten schwieriger zu

synthetisieren und zu reinigen als die entsprechenden Platinverbindungen **K1a** und **K2a**. Von daher empfiehlt es sich, diese Platinverbindungen nun genauer *in vitro* zu untersuchen.

Wie bei den wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexen wurden auch bei den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen **K1a** und **K2a** Chemosensitivitätstests mit Dauerinkubation, mit Vorinkubation, mit Kurzzeitinkubation und mit oder ohne Bestrahlung durchgeführt (siehe Kapitel 3). Im Anhang sind die entsprechenden Wachstumskurven dargestellt (siehe Kapitel 7.3).

An der J82- und UROtsa-Zelllinie wurde die Wirkung der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a**, dazu von Porphyrinligand **La**, alle gelöst in DMF, für die Konzentrationen 0,5 µM, 1 µM und 5 µM untersucht.

Beide Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** wirken proliferationshemmend bzw. zytozid auf die J82- wie auch auf die UROtsa-Zellen unter Dauerinkubation im Dunkeln. Die J82-Zelllinie ist im Vergleich zur UROtsa-Zelllinie gegenüber dem Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1a** bei allen drei eingesetzten Konzentrationen etwas sensitiver. **K2a** hingegen schädigt die J82-Zellen nur in den Konzentrationen 0,5 µM und 1 µM mehr als die normalen urothelialen Zellen UROtsa (Abbildungen 71 und 72). Zu bedenken ist aber, dass lediglich **K2a** eine optimale Wirkungsabfolge von 0,5 µM über 1 µM zu 5 µM hin aufweist. So nimmt der T/C_{corr.}-Wert bei **K2a** und J82-Zellen bei 5 µM auf etwa 7 %, bei 1 µM auf etwa 21 % und bei 0,5 µM auf etwa 46 % nach 120 Stunden Dauerinkubation ab (Abbildung 71C). Für die UROtsa-Zelllinie sind die korrespondierenden T/C_{corr.}-Werte bei 5 µM etwa 4 %, bei 1 µM etwa 41 % und bei 0,5 µM etwa 75 % (Abbildung 72C). Der wasserlösliche Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** zeigt bezüglich der UROtsa-Zelllinie die gleiche antitumorale Wirkung, wohingegen **K1** auf die J82-Zellen etwas stärker antiproliferativ wirkt als **K2a** (siehe Abbildungen 29B und 30B). Wie der Porphyrinligand **L**, so ist auch **La** bei 5 µM Inkubation auf die J82-Zellen geringfügig zytotoxisch. Der entsprechende T/C_{corr.}-Wert beträgt nach 120 Stunden Dauerinkubation 69 %

(Abbildung 71A). Bei den niedrigeren Konzentrationen 0,5 μ M und 1 μ M ist **La** wirkungslos. An der UROtsa-Zelllinie zeigt **La** auch in der höchsten Konzentration von 5 μ M keine wachstumshemmende Wirkung (Abbildung 72A).

Wie bei den wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexen **K1** und **K2** wurde auch bei den Platinkomplexen **K1a** und **K2a** die Inaktivierung im Kulturmedium untersucht. Dazu wurden entsprechend Kapitel 4.1.3 die Substanzen in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-2}$ M 1:1000 mit Kulturmedium verdünnt und unterschiedlich lange bei 37 °C, 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Nach entsprechender Vorinkubationszeit wurden mit diesen Medien ein Chemosensitivitätstest an J82- und UROtsa-Zellen durchgeführt.

In Anlehnung an die wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** ist auch für die Platinkomplexe **K1a** und **K2a** ein geringer Wirkverlust in Abhängigkeit von der Dauer der Vorinkubation bei beiden Zelllinien zu verzeichnen (Abbildungen 73 und 74). Jedoch ist ihr Aktivitätsverlust im Vergleich zur Referenzverbindung Cisplatin deutlich geringer. In T/C_{corr}-Werten ausgedrückt bedeutet dies für **K2a** bei der J82-Zelllinie eine Erhöhung von ca. 7 % bei 0 h Vorinkubation auf etwa 12 % bei 24 h Vorinkubation (Abbildung 73C) und bei der UROtsa-Zelllinie von ca. 4 % auf 12 % (Abbildung 74C). Die Dauer der Vorinkubation hat auf den Porphyrinliganden **La** im Bereich der Fehler keinen Einfluss. Jedoch zeigt sich auch hier die zytotoxische Eigenschaft des Porphyrinliganden auf die J82-Zellen bei einer Substanzkonzentration von 5 μ M (Abbildung 73A).

Für die Chemosensitivitätstests mit Vorinkubation lässt sich festhalten, dass die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** durch Reaktionen mit Nukleophilen im Kulturmedium langsamer inaktiviert werden als die Referenzverbindung Cisplatin.

Die Chemosensitivitätstests mit Kurzeitinkubation zeigen, dass bei den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen **K1a** und **K2a** die wachstumshemmende Wirkung nach Reduzieren der Inkubationszeit von Dauerinkubation über 24 Stunden Kurzzeitinkubation

bis 3 Stunden Inkubation deutlich abnimmt. Bei **K2a** ist die Abnahme der antitumoralen Wirkung geringer als bei **K1a** (Abbildung 75). So beträgt bei **K1a** und J82-Zellen bei Dauerinkubation nach 140 Stunden Inkubation die Zytozidie etwa 6 %, wohingegen bei 6 Stunden Kurzzeitinkubation der T/C_{corr.}-Wert 27 % und bei 3 Stunden 54 % ist (Abbildung 75A). Für **K2a** ist die entsprechende Abstufung von 3 % Zytozidie über 10 % T/C_{corr.}-Wert zu 17 % korrigierten T/C-Wert (Abbildung 75B). Für die UROtsa-Zelllinie sind die Effekte ähnlich. Damit verhalten sich die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** im Chemosensitivitätstests mit Kurzzeitinkubation ähnlich wie die Referenzverbindung Cisplatin (siehe Abbildung 33C). Wie bei Cisplatin müssen die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** mindestens 24 bzw. 12 Stunden auf die Zellen einwirken, um eine ähnliche wachstumshemmende Wirkung zu erreichen als bei Dauerinkubation. Bei den wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexen **K1** und **K2** wirkten schon die nach 3 Stunden Substanzinkubation verursachten Schäden an J82- und UROtsa-Zellen den vollen wachstumshemmenden Effekt wie bei Dauerinkubation (siehe Abbildungen 33 und 34). Somit wirken die wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** an beiden Zelllinien schneller als die Platinkomplexe **K1a** und **K2a** und die Referenzverbindung Cisplatin.

Für die Untersuchung der lichtinduzierten Toxizität neben der Dunkeltoxizität der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** wurden die J82- und auch die UROtsa-Zellen 24 Stunden nach Substanzinkubation mit inkohärentem Licht der Wellenlänge 600 bis 730 nm und einer Energiedosis von 24 J/cm² bestrahlt. Als Wirkstoffkonzentrationen wurden 0,5 µM und 1 µM verwendet.

Bei den Platinkomplexen **K1a** und **K2a** veränderte sich die Proliferation der J82- und UROtsa-Zellen sowohl bei 0,5 µM als auch bei 1 µM Substanzkonzentration nicht aufgrund der Bestrahlung (Abbildungen 76 bis 79). Somit zeigen die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** bei dieser Bestrahlungsdosis keinen phototoxischen Effekt. In Bezug auf die photodynamische Effektivität sind die Platinkomplexe **K1a** und **K2a** mit dem wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2**

vergleichbar (siehe Abbildungen 36B und 38B). Beim Porphyrinligand **La** trat lediglich bei 1 μ M und bei den J82-Zellen ein photodynamischer Effekt auf. Dabei reduzierte sich die Zellmasse durch 10-minütiges Bestrahlen von einem T/C_{corr.}-Wert von etwa 109 % auf etwa 66 % (Abbildung 78A). Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** in diesem Chemosensitivitätstest keine phototoxischen Effekte zeigten. Damit liegt anders als beim wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** keine synergistischer Wirkeffekt vor.

5.2 Analytische Untersuchungen von **K1a** und **K2a**

Die letzte Stufe zur Synthese der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** beinhaltet die Komplexierung des Liganden **La** mit der entsprechenden Platineinheit. Dazu wird der Ligand **La** in Ethanol aufgenommen und mit einer äquimolaren Menge an Diammin(diaqua)platin(II)-dihydroxid für **K1a** oder (\pm)-*trans*-1,2-Diaminocyclohexan(diaqua)platin(II)-dihydroxid für **K2a** in 50 %iger ethanolischer Lösung versetzt. Die sich bildenden Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** fallen aus der Reaktionslösung aus und können über ein Membranfilter abgesaugt werden. Durch Nachwaschen mit Wasser entfernt man überschüssigen Diammin- oder Diaminplatin(II)-Komplex, während durch Waschen mit Ethanol nicht umgesetzter Porphyrinligand **La** abgetrennt werden kann.^[98] Diese Synthesedurchführung zeigt, dass die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** nur eine geringe Wasserlöslichkeit haben. Da alle *in vitro*-Untersuchungen in wässrigen Systemen stattfinden, wurde nun analytisch überprüft, ob die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** in den verwendeten Testkonzentrationen von 0,5 μ M, 1 μ M und 5 μ M überhaupt im Kulturmedien vollständig gelöst sind, denn bei der Substanzzugabe zu den J82- oder UROtsa-Zellen werden die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a**, in DMF gelöst, 1:1000 mit Kulturmedium zu den entsprechenden Wirkstoffkonzentrationen verdünnt.

Die Bestimmung der Löslichkeit der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** erfolgte mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie. Dazu wurde eine $5 \cdot 10^{-3}$ M

Stammlösung der Platinkomplexe 1:1000 mit PBS-Lösung verdünnt. Diese Proben wurden zum einen direkt in das AAS-Gerät eingespritzt und zum anderen wurden sie nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10000 g im Atomabsorptionsspektrometer vermessen. Analog wurde auch mit den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen **K1** und **K2** und Cisplatin verfahren. Der Quotient aus den gemessenen nicht zentrifugierten und zentrifugierten Platinwerten ergibt die Wiederfindungsrate (Abbildung 64). Aus der Platinbestimmung der zentrifugierten Probe kann in erster Näherung die Löslichkeit der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe angegeben werden.

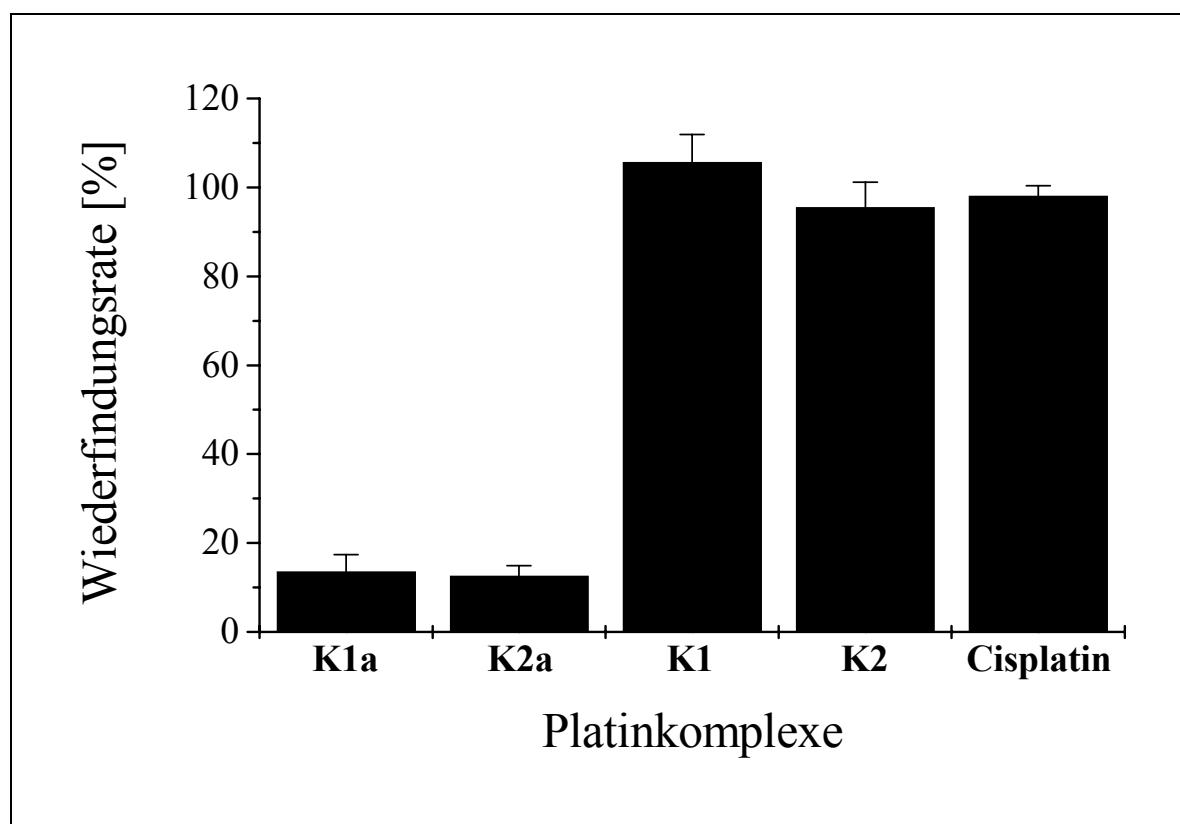


Abbildung 64: Wiederfindungsrate der Platinkomplexe bestimmt mittels Atomabsorptionsspektroskopie.

Aus Abbildung 64 ist ersichtlich, dass die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** und Cisplatin im wässrigem Milieu bei 5 μ M Substanzkonzentration vollständig gelöst sind, was einer Wiederfindungsrate von 100 % entspricht. Für die Porphyrin-

Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** hingegen konnte nur eine Wiederfindungsrate von 13,6 % und 12,6 % gefunden werden, was für **K1a** eine Löslichkeit von etwa $0,45 \pm 0,12 \mu\text{M}$ und für **K2a** etwa $0,43 \pm 0,11 \mu\text{M}$ ergibt. Somit bilden die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** bei den eingesetzten Substanzkonzentrationen von 0,5 μM , 1 μM und 5 μM Mikrosuspensionen im wässrigem Milieu und müssen daher von weiteren Anwendungen und Untersuchungen ausgeschlossen werden.

6 Kapitel

Zusammenfassung

Die Therapiemaßnahmen des Harnblasenkarzinoms orientieren sich in erster Linie am Tumorstadium. Trotz intensiver Bemühungen ist nach wie vor M-VEC die Kombination, die bei Patienten mit metastasiertem Urothelkarzinom weltweit eingesetzt wird. Die Belastung der zumeist nicht mehr jungen Patienten ist sehr hoch, da häufig Nebenwirkungen (Übelkeit, Erbrechen, Alopezie) auftreten. Daher ist die Entwicklung weiterer Behandlungsmethoden von Interesse. Die photodynamische Tumortherapie (PDT) nach intravenöser oder intravesikaler Verabreichung eines Photosensibilisators mit anschließender *in situ*-intravesikaler Aktivierung durch Licht geeigneter Wellenlänge ist ein alternativer Therapieansatz bei der Behandlung von vornehmlich multifokalen, rezidivierenden oberflächlichen Harnblasenkarzinomen. Die PDT basiert auf dem Zusammenwirken der drei Faktoren Photosensibilisator, Sauerstoff und sichtbares Licht. Ein Vorteil der PDT ist, dass die verwendeten Substanzen, seien es Porphyrinoide oder der endogene Photosensibilisator 5-Aminolävulinsäure, eine gewisse Tumorselektivität aufweisen. Durch eine geeignete Bestrahlungsmodalität kann die Schädigung von gesundem Gewebe verringert werden. Bis jetzt finden Hämatoporphyrin-Derivate (z. B. Photofrin) klinische Anwendung. Trotz guter Erfolge mit Hämatoporphyrin-Derivaten traten bei diesen Photosensibilisatoren der ersten Generation verschiedene Nachteile auf, wie i) relative lange Lichtempfindlichkeit der behandelten Patienten, ii) geringe Eindringtiefe des ver-

wendeten Lichts (630 nm) in das Gewebe von maximal 2-3 mm, iii) geringer molarer Absorptionskoeffizient, was den Einsatz höherer Photosensibilisatorkonzentrationen und Lichtleistungen notwendig machte.

Mit Porphyrin-Platin(II)-Komplexen sollen die zwei Therapieansätze bei der Behandlung von Harnblasenkarzinomen, die zytostatische Therapie und die photodynamische Therapie, in einer Substanz miteinander verbunden werden. Dabei erhofft man sich, dass der normalerweise unselektiv wirkende Arzneistoff Cisplatin, welcher Bestandteil der M-VAC-Polychemotherapy bei Harnblasenkarzinomen ist, durch die Carrier-Eigenschaft der Porphyrine selektiv im Tumorgewebe angereichert wird und dort seine volle Wirkung entfalten kann. Darüber hinaus wünscht man sich, dass im Rahmen der photodynamischen Behandlung durch Hinzunahme der Wirkung der Platinkomponente auch tiefer liegendes Tumorgewebe, das durch therapeutisches Licht (Wellenlängenbereich etwa 600 bis 850 nm) aufgrund der limitierten Eindringtiefe in biologisches Gewebe nicht erreicht wird, geschädigt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Porphyrin-Platin(II)-Komplexe an einem Modell eines gering differenzierten invasiven Harnblasentumors *in vitro* auf ihre Effektivität hin untersucht. Der gering differenzierte invasive Tumor wurde durch die Zelllinie J82 simuliert, während UROtsa stellvertretend für das umgebende gesunde Urothel verwendet wurde. Den Mittelpunkt der Analysen stellte die *in vitro*-Untersuchung von vier Porphyrin-Platin(II)-Komplexen mittels Chemosensitivitätstests nach Kristallviolett-Färbung dar. Dabei wurde die Wirkung der Platinkomplexe in Dauerinkubation im Dunkeln, deren Phototoxizität nach Bestrahlung mit inkohärentem Licht der Wellenlänge 600 nm bis 730 nm, deren Inaktivierung im Kulturmedium und deren antiproliferative Wirkung nach wechselnden Einwirkzeiten untersucht. Dazu wurden für die Bewertung der Effektivität der photodynamischen Therapie und zytostatischen Therapie entscheidende Parameter wie intrazelluläre Konzentration und intrazelluläre Lokalisation für zwei Porphyrin-Platin(II)-Komplexe bestimmt. Außerdem wurden die Penetrationseigenschaften der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe an multizellulären Sphäroiden von der J82- und UROtsa-

Zelllinie analysiert. Als analytische Verfahren wurden für die Porphyrineinheit der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe fluoreszenzgestützte Analysemethoden und für die Platineinheit die Atomabsorptionsspektroskopie verwendet.

Untersucht wurden zwei wasserlösliche Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** mit Polyethylenglykolmonomethylether-Seitenketten an der Porphyrineinheit und, entsprechend dazu, zwei Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** mit Diethylenglykolmonomethylether-Seitenketten. Zusätzlich analysiert wurden jeweils die dazugehörigen Porphyrinliganden **L** und **La** und die Referenzverbindungen Hämatoporphyrin und Cisplatin.

Die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a**, gelöst in DMF, wirkten wachstumshemmend bzw. zytozid auf die J82- wie auch auf die UROtsa-Zellen unter Dauerinkubation im Dunkeln. Jedoch wurden die J82-Tumorzellen vom Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1a** in allen drei eingesetzten Konzentrationen 0,5 µM, 1 µM und 5 µM und von **K2a** in den beiden niedrigeren Konzentrationen etwas stärker geschädigt als die normalen urothelialen Zellen UROtsa. Nach Bestrahlung der J82- und UROtsa-Zellen mit inkohärentem Licht der Wellenlänge 600 bis 730 nm und einer Energiedosis von 24 J/cm² zeigten beide Porphyrin-Platin(II)-Komplexe keinen phototoxischen Effekt bei Substanzkonzentrationen von 0,5 µM und 1 µM. Demnach hat sich das Ziel, den zytostatischen Effekt einer Platineinheit und die photodynamische Aktivität einer Porphyrineinheit in einer Substanz zu kombinieren, nicht erfüllt. Zusätzlich wurde mittels Atomabsorptionsspektroskopie festgestellt, dass die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** und **K2a** in den eingesetzten Konzentrationen von 0,5 µM, 1 µM und 5 µM Mikrosuspensionen im wässrigen Milieu bilden. Daher müssen beide Verbindungen als mögliche neue, selektive Photosensibilisatoren mit intrinsischer Zytotoxizität für Harnblasenkarzinome ausgeschlossen werden. In diesem AAS-Experiment wurde die Wasserlöslichkeit der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1** und **K2** bestätigt.

Der wasserlösliche Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K2** wies im Chemosensitivitätsassay mit Bestrahlung auch nur eine sehr geringe photodynamische Aktivität auf, womit sich auch hier die Zielsetzung, zwei Therapieansätze zur Behandlung von Harnblasenkarzinomen, die zytostatische Therapie und die photodynamische Therapie, in einer Substanz miteinander zu verbinden, nicht erfüllte.

Im Falle des wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexes **K1** ergab sich folgendes Bild. Im Chemosensitivitätstest mit Dauerinkubation im Dunkeln zeigte sich, dass die J82-Tumorzellen deutlich sensibler auf **K1** reagieren als die normalen urothelialen Zellen. So werden in etwa ein Drittel bis zur Hälfte mehr Tumorzellen geschädigt als normale Zellen. Die Referenzverbindung Cisplatin schädigt jedoch J82- wie auch UROtsa-Zellen im gleichen Maße, unabhängig von der eingesetzten Konzentration. Auch andere Zytostatika, die in der Klinik zur Behandlung von Harnblasenkarzinomen bereits verwendet oder experimentell untersucht werden, zeigten in Bezug auf beide Zelllinien ähnliche Wirkungsspektren.

Zusätzlich konnte beim Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** neben der wachstums-hemmenden Wirkung der Platin-Komponente eine deutliche Hemmung des Zellwachstums aufgrund der Bestrahlung bei einer Substanzkonzentration von $0,5 \mu\text{M}$ festgestellt werden. Dabei handelt es sich um einen synergistischen Wirkeffekt im Vergleich zu den Referenzverbindungen Cisplatin, Hämatoporphyrin und einer Mischung aus beiden Verbindungen. Ein Vergleich der Wirkspektren von **K1** auf J82- und UROtsa-Zellen zeigt, dass auch mit Hinzunahme der Phototoxizität des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes die normalen urothelialen Zellen deutlich weniger stark geschädigt wurden als die Tumorzellen. Die insgesamt wesentlich schwächere Schädigung der normalen urothelialen Zellen UROtsa, sowohl zytotoxisch als auch lichtinduziert, ermöglichte es diesen, sich auch wieder schneller von der Behandlung zu erholen. Dabei ist festzuhalten, dass sich das Zusammenspiel aus verwendeter Wirkstoffkonzentration von $0,5 \mu\text{M}$ für **K1** und Bestrahlungsdauer, d. h. der Energie-dichte, mit dem Ziel einer maximalen wachstumshemmenden Wirkung für die J82-Tumorzellen unter gleichzeitiger maximaler Schonung der normalen urothelial-

len Zellen UROtsa, noch optimieren lässt. Es sei bemerkt, dass in der Literatur Bestrahlungsversuche im Rahmen von Zellkulturexperimenten mit Energiedichten von bis zu 48 J/cm^2 beschrieben sind.^[182]

Weitere Eigenschaften des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes **K1** wurden im Chemosensitivitätstest mit Vor- und Kurzzeitinkubation untersucht. Generell lässt sich festhalten, dass der Aktivitätsverlust des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes **K1** durch mögliche Inaktivierung im Kulturmedium geringer ist als der von Cisplatin. Außerdem zeigte sich für **K1**, dass eine 3-stündige Substanzinkubation gefolgt von einem Mediumwechsel zu zytostatikafreien Bedingungen ausreicht, um die gleiche antiproliferative Wirkung zu erreichen wie bei Dauerinkubation. Um bei Cisplatin eine ähnliche Wirkung wie bei Dauerinkubation zu erhalten, muss die Platinverbindung mindestens 12 Stunden auf die Zellen einwirken.

Insgesamt betrachtet weist der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** bessere Wirkungseigenschaften als die Referenzverbindungen Cisplatin und Hämatoporphyrin auf.

Diese Beobachtungen waren Ausgangspunkt für weitere *in vitro*-Untersuchungen zu den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen. So wurden für die Effektivität der zytostatischen Therapie und der photodynamischen Therapie entscheidende Schlüsselaspekte wie die Konzentration an zellassoziiertem Porphyrin, intrazelluläre Lokalisation oder Grad der DNA-Platinierung näher untersucht.

Die Bestimmung des zellassoziierten Porphyrins nach Inkubation mit Porphyrin-Platin(II)-Komplex, Porphyrinverbindung oder Hämatoporphyrin erfolgte nach Extraktion mit Perchlorsäure/Methanol fluoreszenzspektrometrisch. Dabei konnte für den Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** ein 1,5fach höherer Wert an zellassoziiertem Porphyrin bei den J82-Tumorzellen als bei den normalen urothelialen Zellen UROtsa bei einer Inkubationskonzentration von $0,5 \mu\text{M}$ festgestellt werden. Zudem reicherte sich **K1** im Vergleich zum Außenmedium in den J82-, aber auch in den UROtsa-Zellen an. Keine Selektivität wies der Porphyrinligand **L** bei dieser Wirkstoffkonzentration auf. Bei einer Erhöhung der Konzentration auf $5 \mu\text{M}$ blieb die

Selektivität von **K1** in etwa gleich. Außerdem konnte mittels einer Langzeitkinetik-Messung am Durchflusszytometer gezeigt werden, dass der Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** und der Ligand **L** in den ersten fünf Minuten der Inkubation relativ schnell durch die J82- und UROtsa-Zellen aufgenommen werden. Jedoch läuft danach die Aufnahme bei der UROtsa-Zelllinie schon langsam gegen einen Sättigungswert, wohingegen die J82-Tumorzellen noch immer Porphyrinverbindungen akkumulieren. Für die Referenzverbindung Hämatoporphyrin ist die „Aufnahmgeschwindigkeit“ für beide Zelllinien nahezu identisch und auch deutlich geringer als bei **K1** und **L**.

Für die phototoxische Wirkung von Photosensibilisatoren ist deren intrazelluläre Lokalisation von entscheidender Bedeutung, denn aufgrund der kurzen Lebensdauer des generierten Singulett-Sauerstoffs ist die intrazelluläre Lokalisation des Photosensibilisators mit dem Angriffspunkt der phototoxischen Schäden identisch. Es lässt sich feststellen, dass der wasserlösliche Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** diffus im Zytosol verteilt und an Zellmembran wie auch an Plasmamembranen, unter anderem an Lysosomen, Mitochondrien und Golgi-Apparat, gebunden ist. Im Falle der normalen urothelialen Zellen scheint die Porphyrinverbindung **K1** nicht in den Lysosomen lokalisiert zu sein. Die Referenzverbindung Hämatoporphyrin und der Porphyrinligand **L** sind eher an Zellmembran und Golgi-Apparat gebunden. Allgemein lässt sich somit festhalten, dass **K1** an zelluläre Strukturen gebunden ist, die essentiell für die Effektivität der photodynamischen Therapie sind.

Mit den multizellulären Sphäroiden von J82 und UROtsa wurden die Penetrations-eigenschaften des Porphyrin-Platin(II)-Komplexes **K1** untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Penetration trotz der relativ hohen Molmasse nicht auf die äußeren Zelllagen der dreidimensionalen Zellaggregate beschränkt ist. Für den Porphyrinligand **L** und Hämatoporphyrin wurde das gleiche beobachtet.

Neben der Porphyrineinheit der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe eignet sich auch die Platineinheit für analytische Untersuchungen. Vom Platinfragment geht die zytostatische Wirkung der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe im Dunkeln aus. Da die Reakti-

on der Platineinheit mit der DNA die Zytotoxizität der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe ausmacht, wurde neben der Quantifizierung des zellassoziierten Platins auch der Grad der DNA-Platinierung an J82- und UROtsa-Zellen bestimmt. Es zeigte sich, dass die Konzentration des zellassoziierten Platins sowohl für **K1** als auch für Cisplatin jeweils in den normalen urothelialen Zellen UROtsa größer ist als in den Harnblasenkarzinom-Zellen J82. Dies steht im Widerspruch zur Quantifizierung des zellassoziierten Porphyrins. Jedoch ist zu bedenken, dass im Falle der Bestimmung an zellassoziiertem Platin keine Unterscheidung des gemessenen Platins hinsichtlich extrazellulär oder intrazellulär gebunden möglich ist. Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit durchgeführten Messungen zur Bestimmung des Platinierungsgrads der DNA ergaben, dass die DNA der UROtsa-Zellen nach 24-stündiger Inkubationszeit mit dem Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** 1,1 bis 1,3fach höher platiniert ist als die DNA der Tumorzellen. Für Cisplatin trifft dies bei einer Konzentration von 3 μ M ebenfalls zu, bei 5 μ M ist das Ausmaß der DNA-Platinierung nahezu identisch für beide Zelllinien. Damit ergibt sich für den Porphyrin-Platin(II)-Komplex **K1** eine Diskrepanz zwischen DNA-Platinierungsgrad und antitumoraler Wirkung. Derartige Beobachtungen sind in der Literatur des öfteren auch für andere Platinkomplexe beschrieben. Um den eben dargestellten Widerspruch zu klären, wurde in einem ersten Schritt der Sulfhydrylgehalt der J82- und UROtsa-Zellen bestimmt, denn thiolhaltige Verbindungen, insbesondere Glutathion, gelten als Hauptreaktionspartner von Platinkomplexen und können diese inaktivieren. Jedoch zeigte sich, dass sich auch damit die Diskrepanz bei den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen nicht erklären lässt. Demnach kann zum einen vermutet werden, dass die Art der Bindung der Platineinheit der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe an die DNA der J82- oder UROtsa-Zellen unterschiedlich ist und vielmehr zum anderen, dass bei den normalen urothelialen Zellen UROtsa der Reparaturmechanismus deutlich effizienter funktioniert als bei den J82-Harnblasentumor-Zellen.

Es bleibt abschließend festzuhalten, dass sich für Cisplatin im Hinblick auf antiproliferative Wirkung, Konzentration an zellassoziiertem Platin und DNA-Platinierung an der J82- und UROtsa-Zelllinie ein konsistentes Bild ergibt. Bei den Porphyrin-

Platin(II)-Komplexe **K1** und auch **K2** ist bezüglich der Diskrepanz zwischen der antitumoralen Wirkung, der fluoreszenzspektrophotometrisch gemessenen Porphyrinaufnahme und dem Grad der DNA-Platinierung zu berücksichtigen, dass die Freisetzung der Nichtabgangsgruppe bei den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen unterschiedlich schnell in den verschiedenen Zelllinien abhängig vom jeweiligen intrazellulären Milieu erfolgen kann. Damit tragen die Platin- und Porphyrineinheit der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe zur Gesamtwirkung in den beiden Zelllinien in unterschiedlichem Ausmaß bei.

Obwohl die Platinierung der DNA als Hauptwirkmechanismus für Platinkomplexe angesehen wird, werden in der Literatur alternative Wirkmechanismen wie z. B. i) Veränderungen an zytoplasmatischen Membransystemen durch Platinadduktbildungen, ii) Inhibierung der Membrantransportsysteme für Nährstoffaufnahme durch Metallkomplexe, iii) Aktivierung oder Inhibierung von membrangebundenen Proteinen, die Einfluss auf bestimmte Signaltransduktionen nehmen, diskutiert, sodass bei komplexen Platinverbindungen wie z. B. den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen solche alternativen Wirkmechanismen eine zusätzliche Rolle spielen könnten.^[183]

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es sich bei den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen, insbesondere bei **K1**, um eine neue Klasse von selektiven Photosensibilisatoren mit intrinsischer Zytotoxizität handelt.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse dienen als Grundlage weiterer Optimierungs- und Versuchsansätze. Weiterführende Synthesen sollten das Ziel verfolgen, die photophysikalischen Eigenschaften der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe zu verbessern, indem das Porphyrinsystem durch Chlorine, Phthalocyanine oder Naphthalocyanine ersetzt wird. Mit Hilfe molekularbiologischer Arbeitstechniken sollten sich entscheidende Hinweise auf die unterschiedlichen DNA-Reparaturfähigkeiten der beiden Zelllinien J82 und UROtsa ergeben. Des Weiteren sollte das Zusammenspiel aus Dunkel- und lichtinduzierter Toxizität bei den Porphyrin-Platin(II)-Komplexen im Sinne einer maximalen Schädigung der Tumorzellen unter gleichzeitiger maximaler Schonung der normalen urothelialen Zellen

optimiert werden. Zusätzliche PDT-Studien sollten an multizellulären Tumorsphäroiden wie auch an dreidimensionalen Kokulturen aus Fibroblastenaggregaten oder Normalzellen und Tumorzellen durchgeführt werden, um ein möglichst breites Wissensspektrum über die Porphyrin-Platin(II)-Komplexe *in vitro* zu erhalten. Schließlich müssen *in vivo*-Versuche zeigen, wie sich Porphyrin-Platin(II)-Komplexe *in vivo* verhalten und wirken und in welcher Form bzw. in welchen Anteilen sie sich auf verschiedene Gewebe verteilen. Interessant scheint in diesem Zusammenhang auch zu sein, die Rolle und den Einfluss der Polyethylenglykolmonomethylether-Seitenketten bei den wasserlöslichen Porphyrin-Platin(II)-Komplexen *in vivo* zu beobachten, denn aus *in vivo*-Untersuchungen ist bekannt, dass mit Methoxypolyethylenglykol gekoppelte Photosensibilisatoren im Vergleich zu niedermolekularen Photosensibilisatoren eine erhöhte Tumorakkumulation aufweisen.^[85, 157, 184] Außerdem sollten im Rahmen der *in vivo*-Studien unterschiedliche Transportsysteme und spezielle Lösungsmittel für Porphyrin-Platin(II)-Komplexe wie Liposomen oder Polyethylenglykol-Wasser-Mischungen untersucht werden.

7 Kapitel

Anhang

7.1 Quantifizierung des zellassoziierten Porphyrins mittels Fluoreszenzspektroskopie bei einer Substanzinkubation von 5 μM

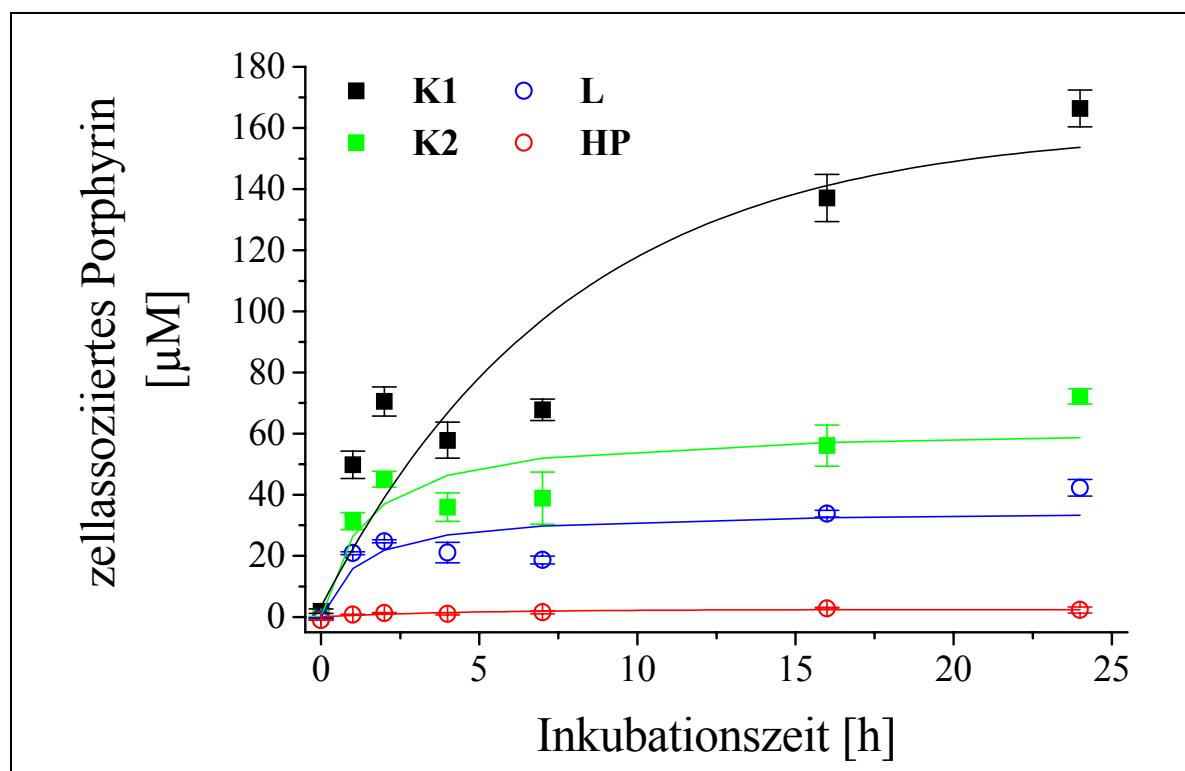


Abbildung 65: Aufnahmekinetik von 5 μM L, K1, K2 und Hämatoporphyrin (HP) in J82-Zellen.

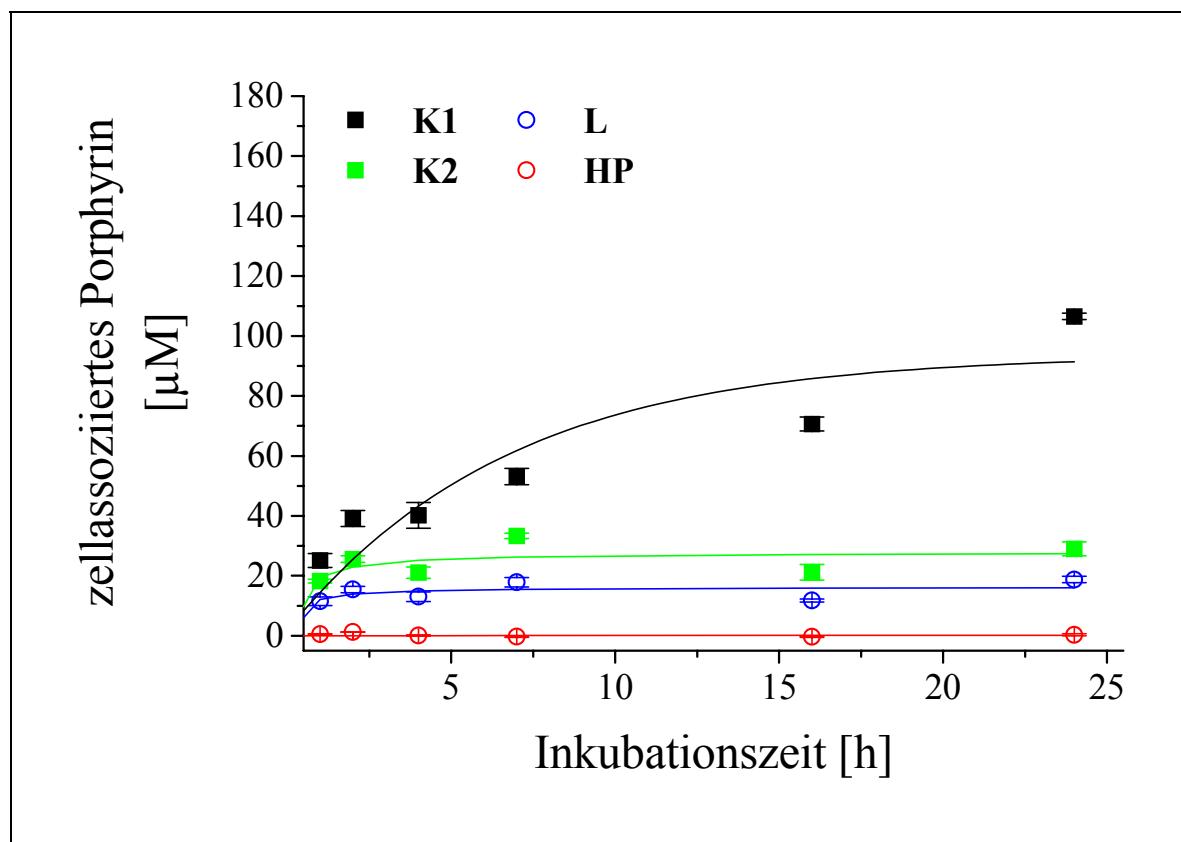


Abbildung 66: Aufnahmekinetik von $5 \mu\text{M}$ L, K1, K2 und Hämato porphyrin (HP) in UROtsa-Zellen.

7.2 Abbildungen zur intrazellulären Lokalisation von L und K2

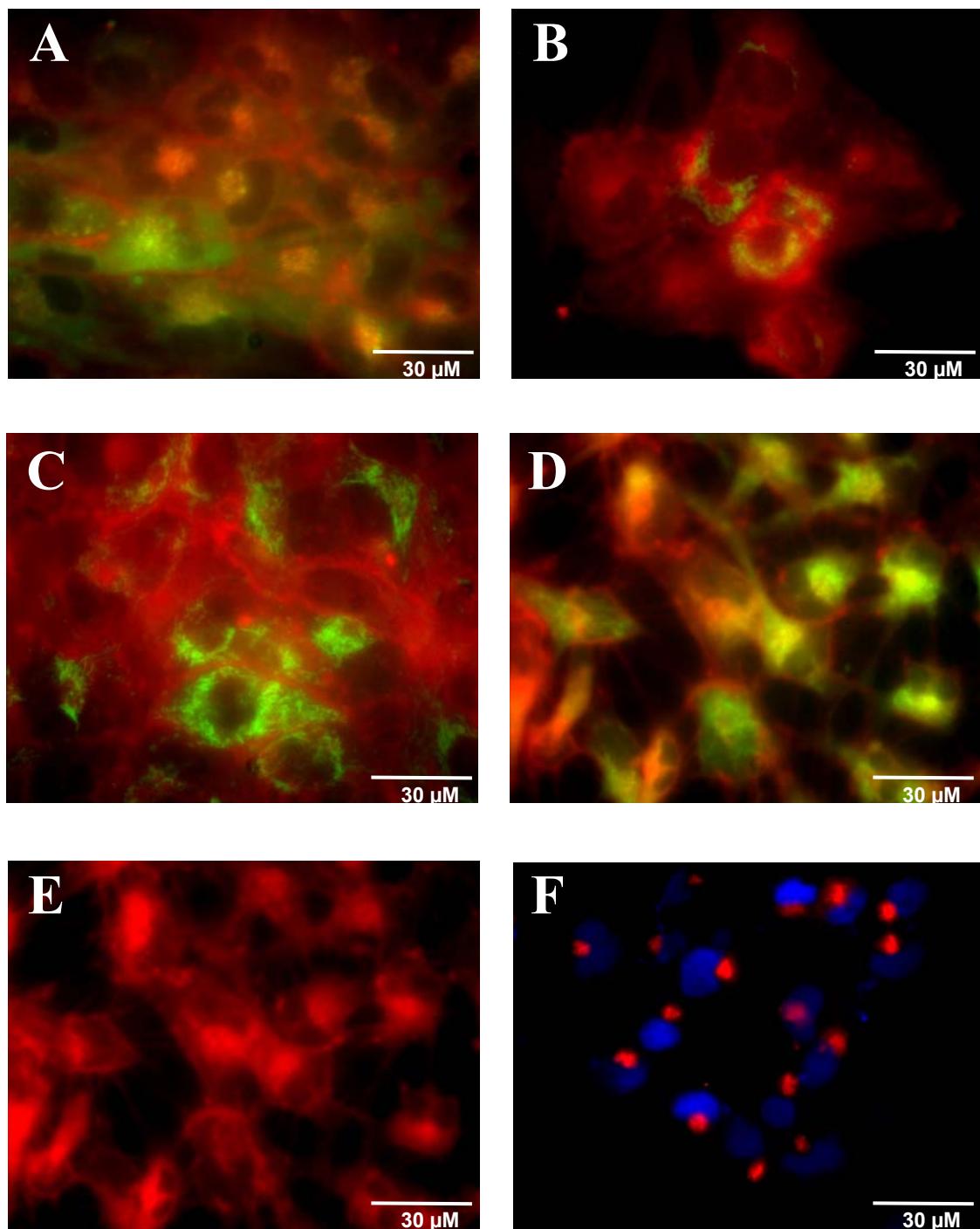


Abbildung 67: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären **L**-Lokalisation (rot, A-E) für J82-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit $5 \mu\text{M}$ **L**: A: Lysotracker Green-Färbung (grün) nach **L**-Inkubation, B: MitoTracker Green-Färbung (grün) nach **L**-Inkubation, C: MitoTracker Green-Färbung (grün) vor **L**-Inkubation, D: Rhodamin 123-Färbung (grün) nach **L**-Inkubation, E: **L**-Fluoreszenz, F: BODIPY FL C₅-Ceramid (rot) und DAPI (blau, Zellkern).

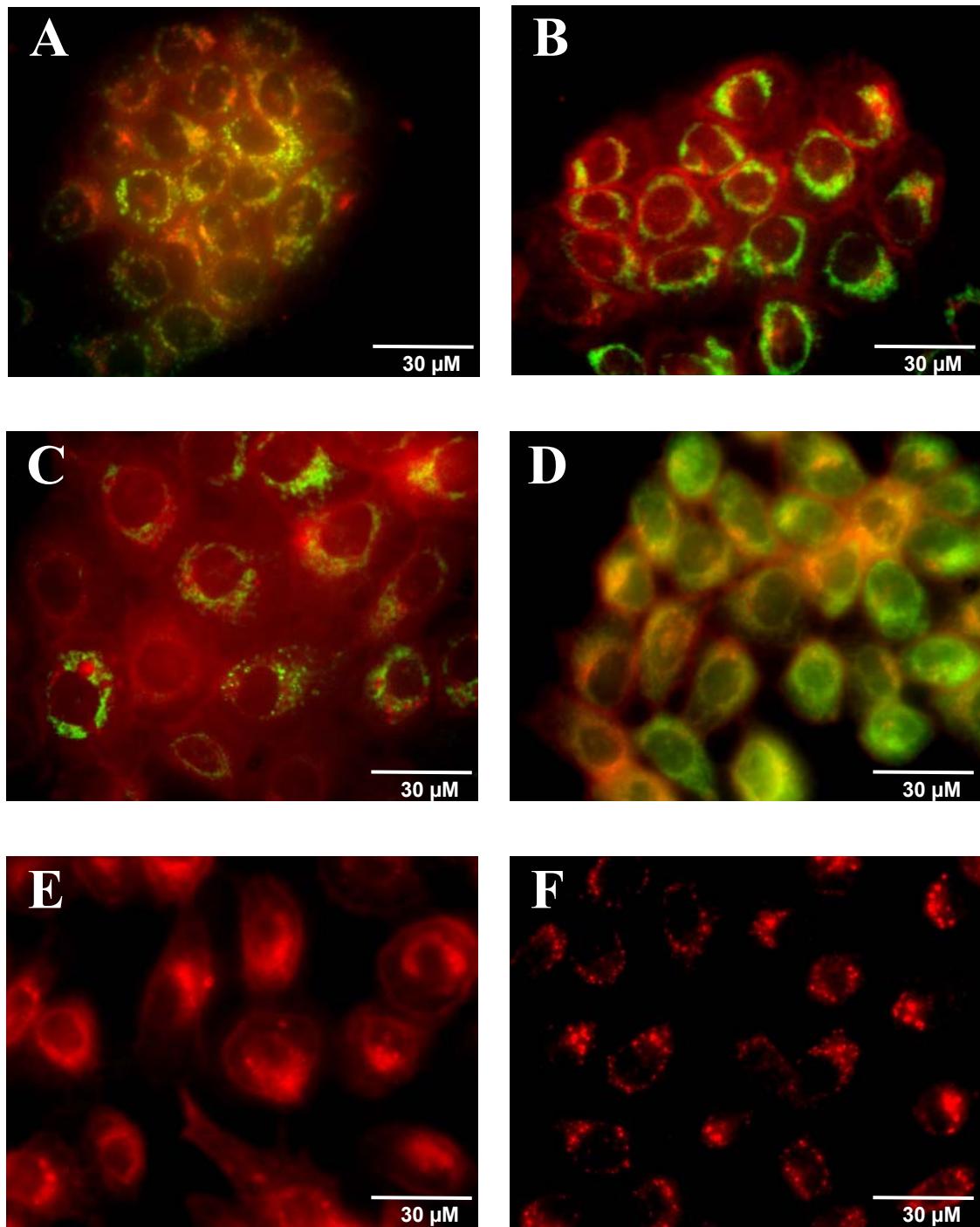


Abbildung 68: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären **L**-Lokalisation (rot, A-E) für UROtsa-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 5 μ M **L**: A: Lyso-Tracker Green-Färbung (grün) nach **L**-Inkubation, B: MitoTracker Green-Färbung (grün) nach **L**-Inkubation, C: MitoTracker Green-Färbung (grün) vor **L**-Inkubation, D: Rhodamin 123-Färbung (grün) nach **L**-Inkubation, E: **L**-Fluoreszenz, F: BODIPY FL C₅-Ceramid (rot).

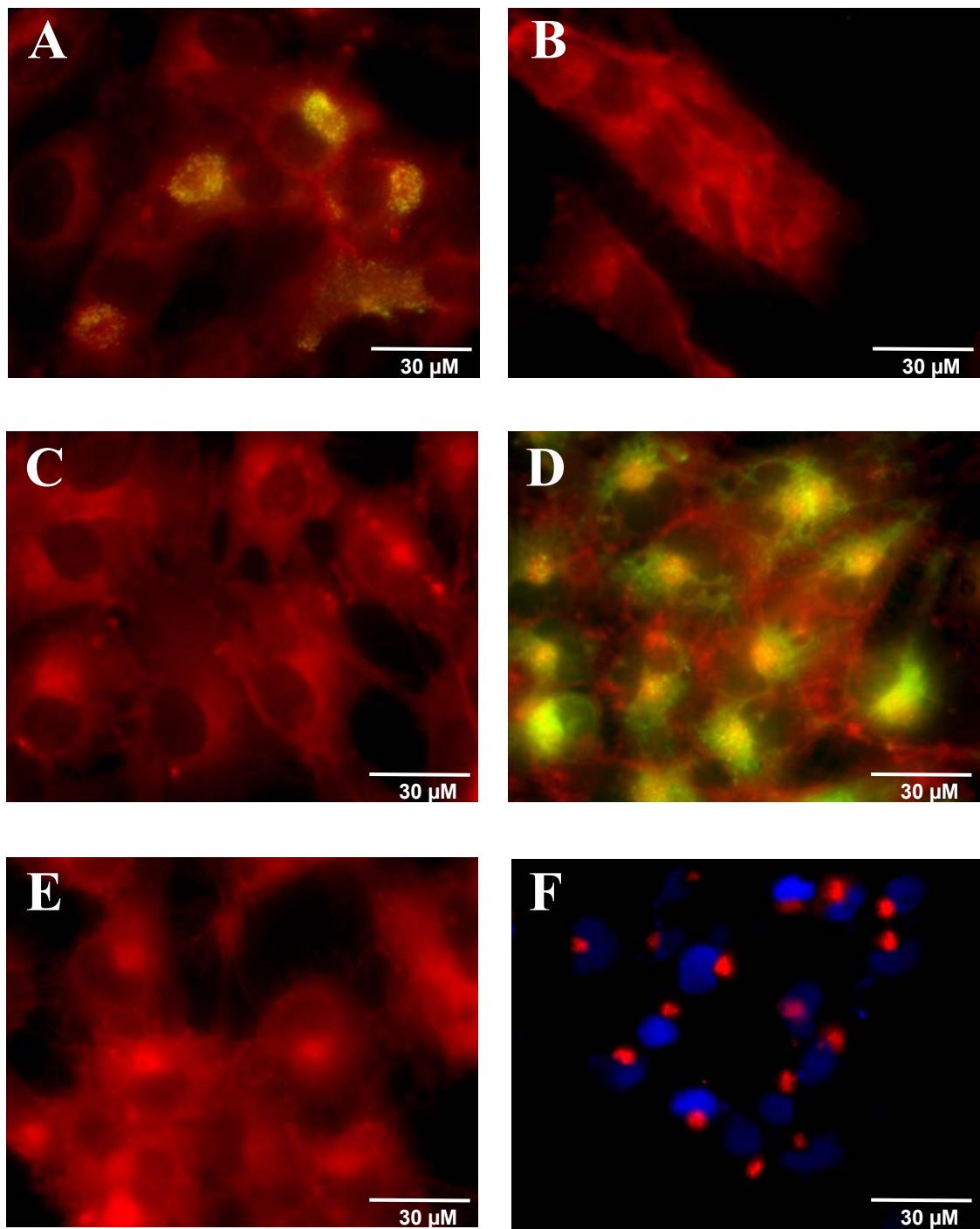


Abbildung 69: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären K2-Lokalisation (rot, A-E) für J82-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit $5 \mu\text{M}$ K2: A: LysoTracker Green-Färbung (grün) nach K2-Inkubation, B: MitoTracker Green-Färbung (grün) nach K2-Inkubation, C: MitoTracker Green-Färbung (grün) vor K2-Inkubation, D: Rhodamin 123-Färbung (grün) nach K2-Inkubation, E: K2-Fluoreszenz, F: BODIPY FL C₅-Ceramid (rot) und DAPI (blau, Zellkern).

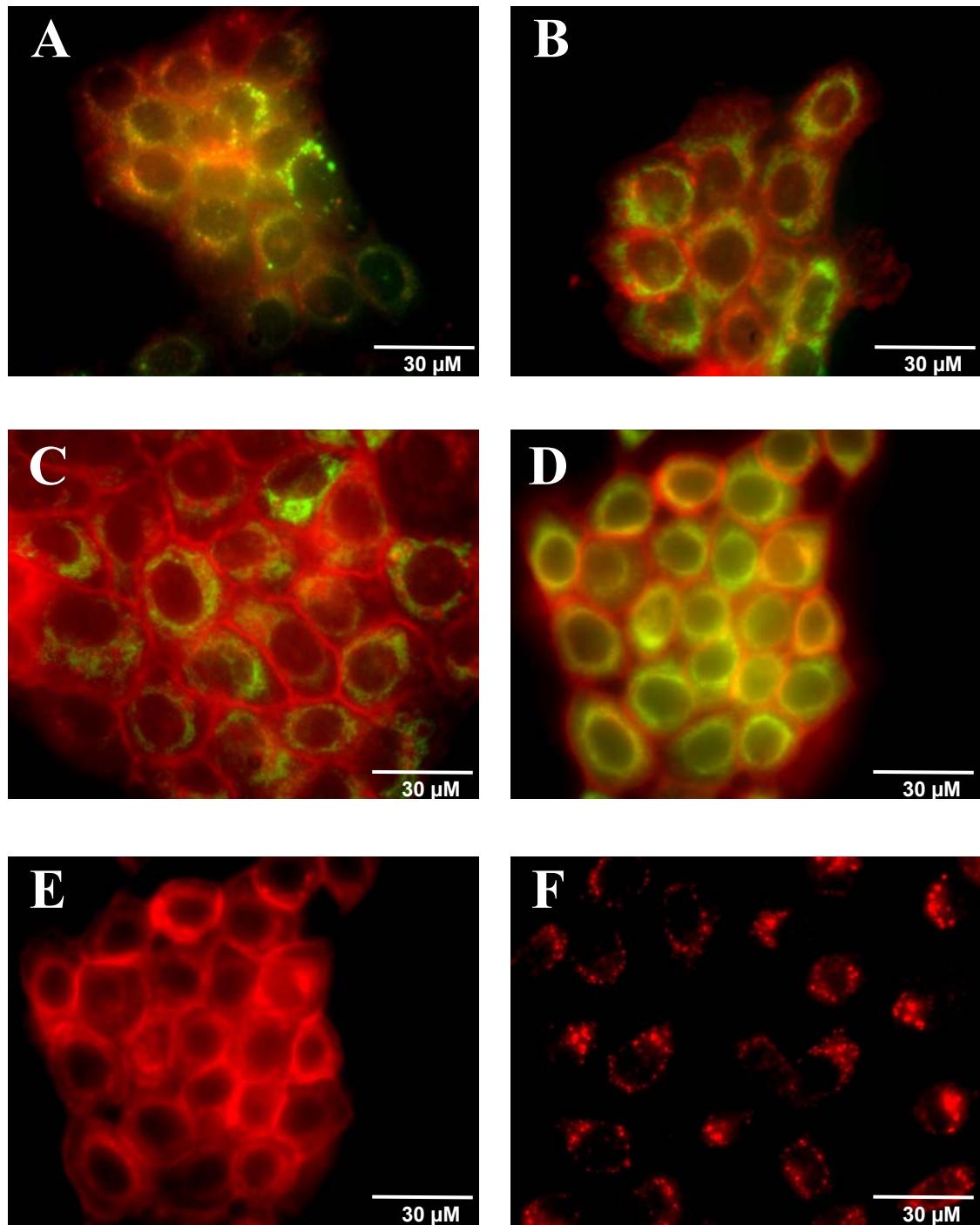


Abbildung 70: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären K2-Lokalisation (rot, A-E) für UROtsa-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 5 μ M K2: A: Lysotracker Green-Färbung (grün) nach K2-Inkubation, B: MitoTracker Green-Färbung (grün) nach K2-Inkubation, C: MitoTracker Green-Färbung (grün) vor K2-Inkubation, D: Rhodamin 123-Färbung (grün) nach K2-Inkubation, E: K2-Fluoreszenz, F: BODIPY FL C₅-Ceramid (rot).

7.3 Chemosensitivitätstests zu La, K1a und K2a

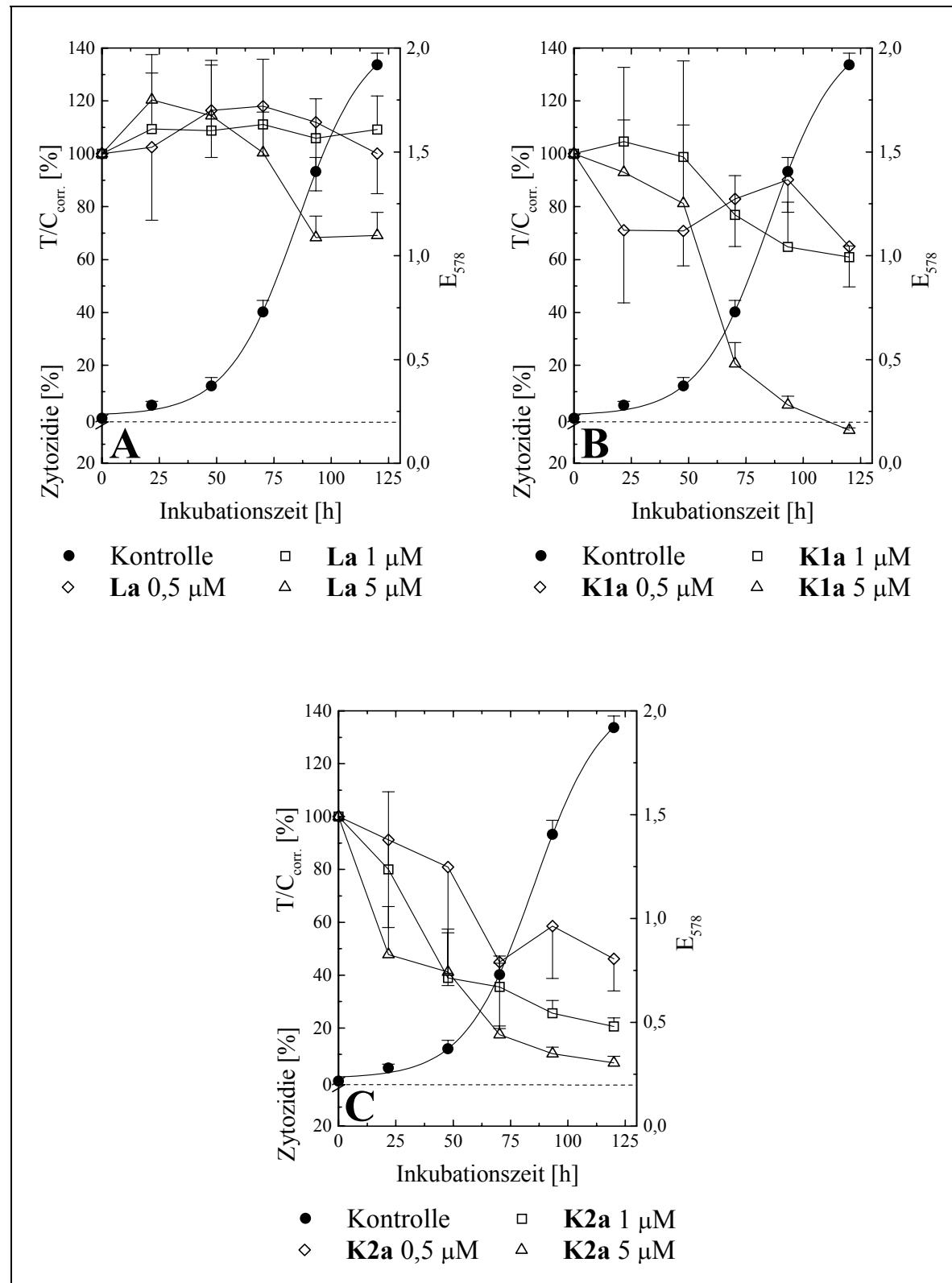


Abbildung 71: Einfluss von **La** (A), **K1a** (B) und **K2a** (C) auf das Wachstum der J82-Harnblasenkarzinom-Zelllinie (22. Passage) in Dauerinkubation.

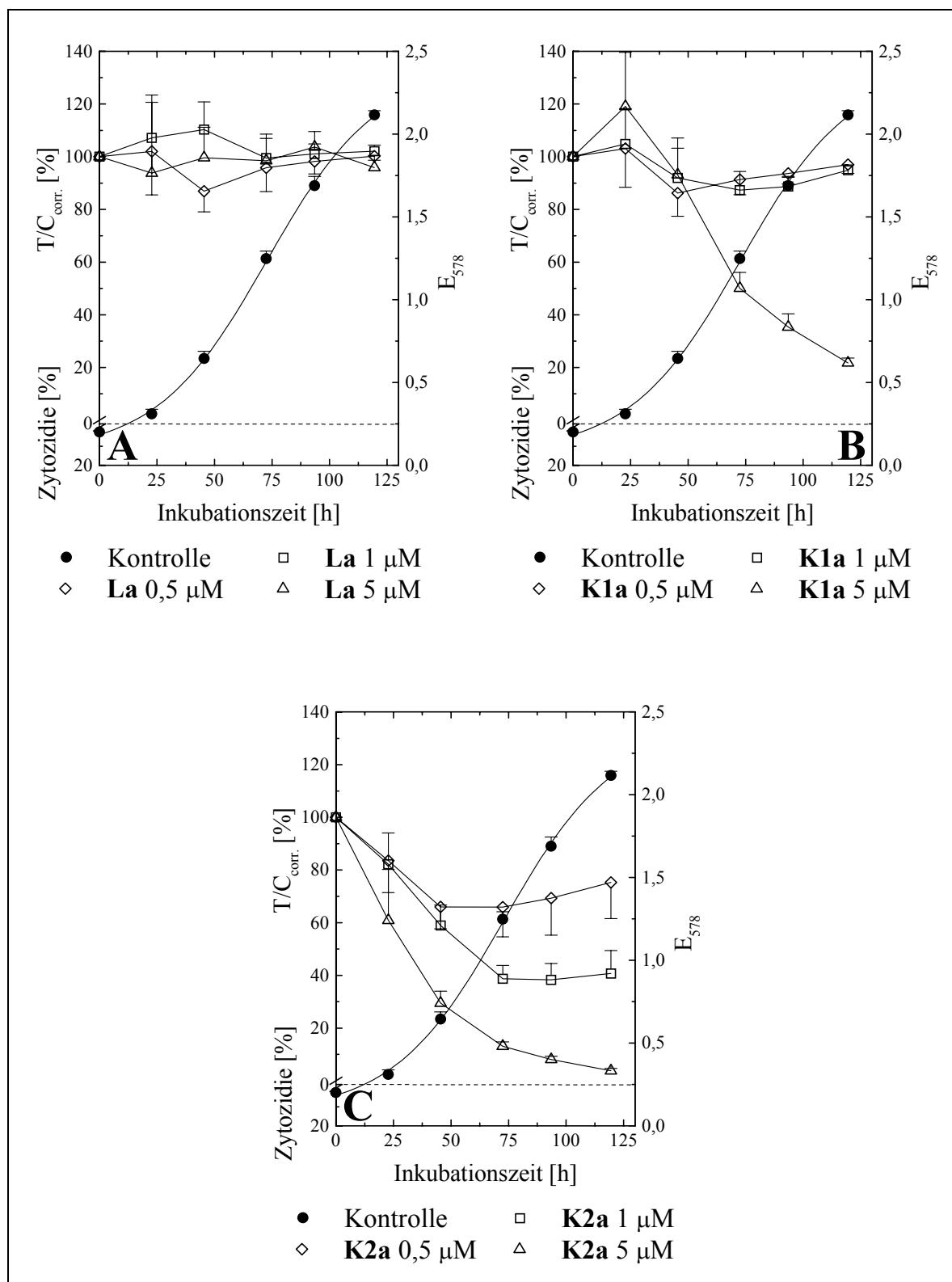


Abbildung 72: Einfluss von **La** (A), **K1a** (B) und **K2a** (C) auf das Wachstum der UROtsa-Zelllinie (42. Passage) in Dauerinkubation.

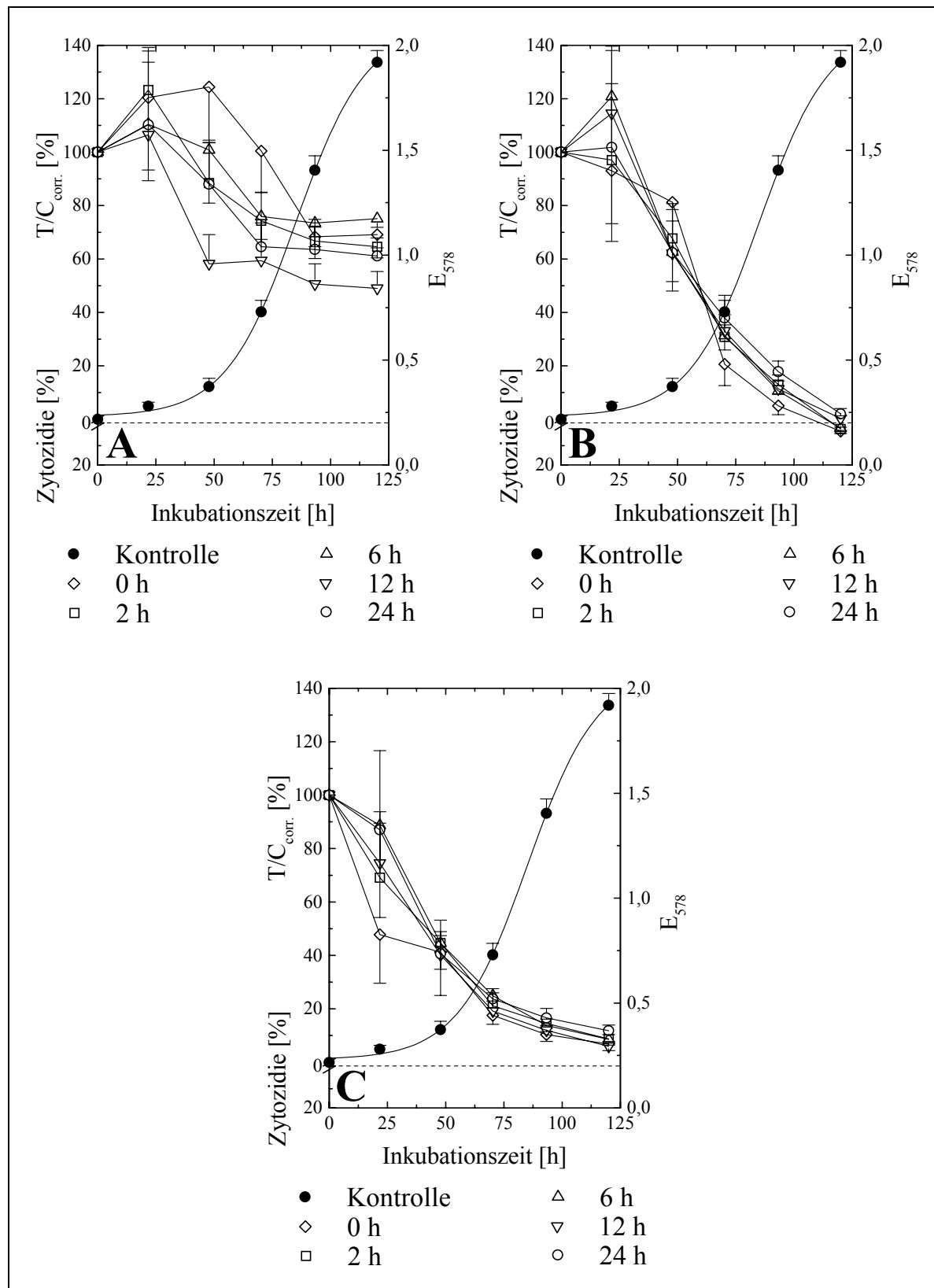


Abbildung 73: Einfluss der Vorinkubation von **La** (A), **K1a** (B) und **K2a** (C) im Kulturmedium auf deren proliferationshemmende Wirkung an J82-Zellen (23. Passage).

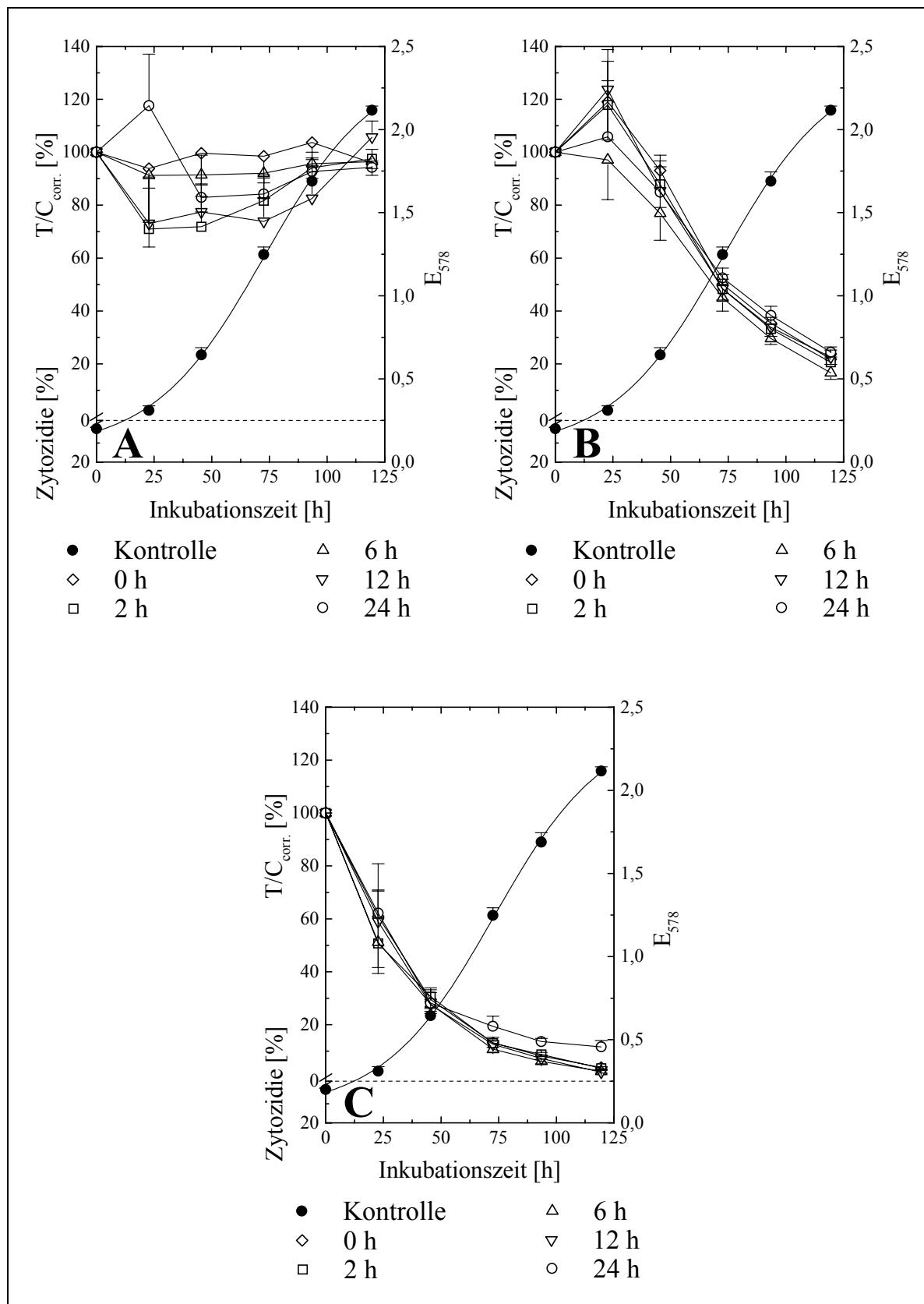


Abbildung 74: Einfluss der Vorinkubation von **La** (A), **K1a** (B) und **K2a** (C) im Kulturmedium auf deren proliferationshemmende Wirkung an UROtsa-Zellen (43. Passage).

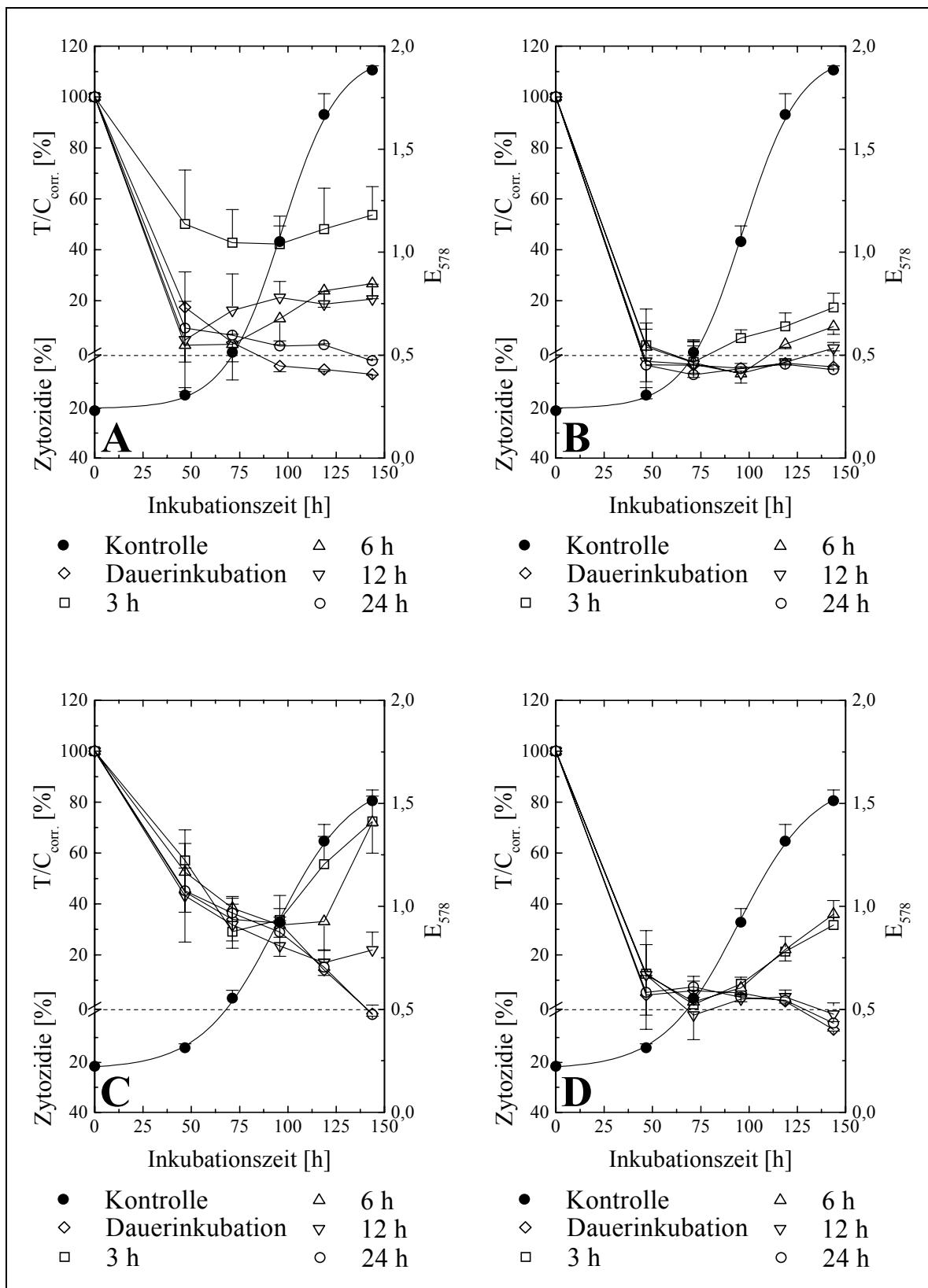


Abbildung 75: Wirkung verschiedener Kurzzeitinkubationen und der Dauerinkubation auf J82-Zellen (24. Passage) mit $5 \mu\text{M}$ **K1a** (A) und **K2a** (B) und auf UROtsa-Zellen (47. Passage) mit $5 \mu\text{M}$ **K1a** (C) und **K2a** (D).

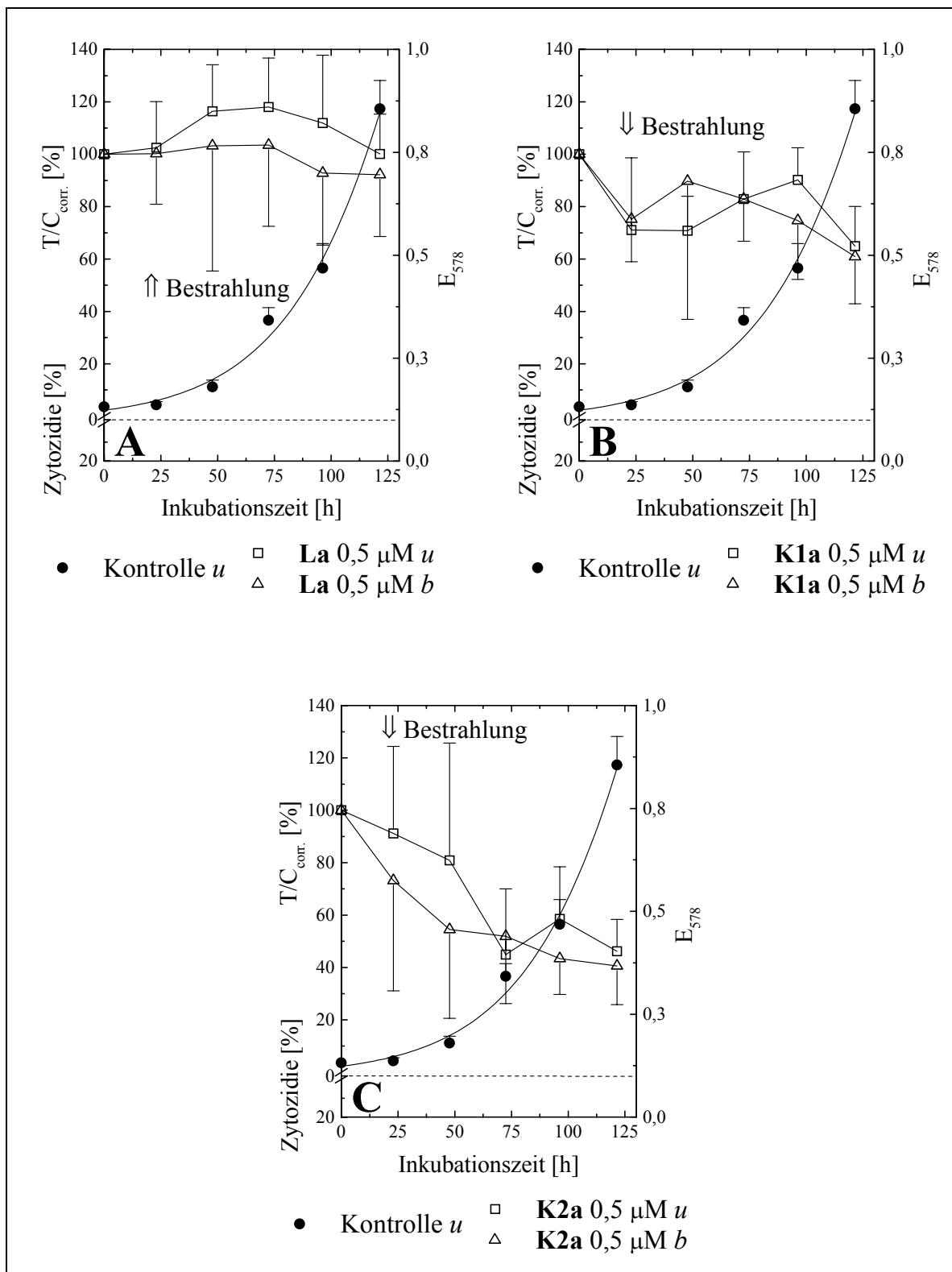


Abbildung 76: Dauerinkubationstest mit Bestrahlung: Einfluss des Porphyrinliganden **La** (A) und der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** (B) und **K2a** (C) auf das Wachstum der J82-Harnblasenkarzinom-Zelllinie (23. Passage) bei einer Substanzinkubation von 0,5 μ M. u: unbestrahlt; b: bestrahlt.

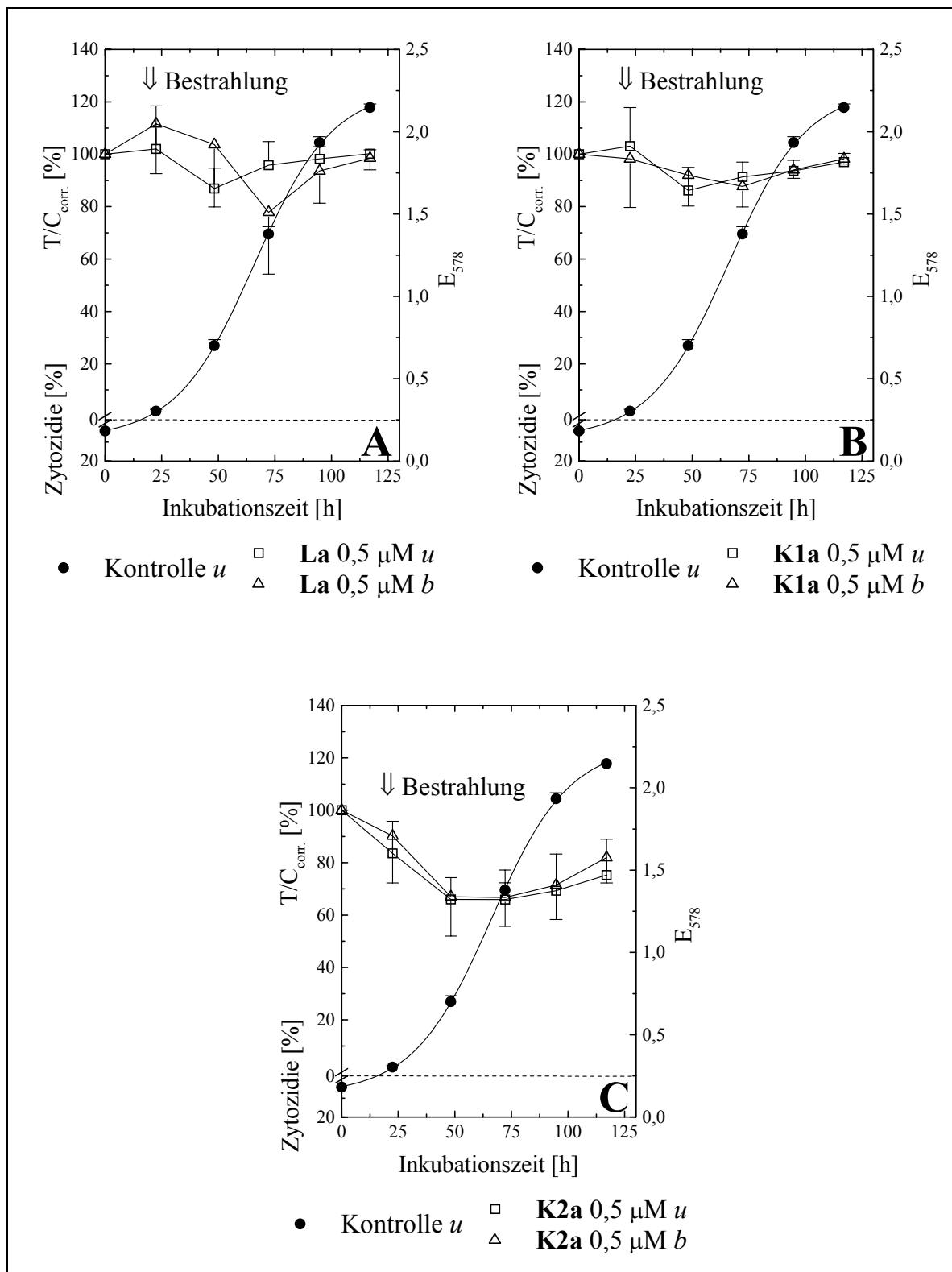


Abbildung 77: Dauerinkubationstest mit Bestrahlung: Einfluss des Porphyrinliganden **La** (A) und der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** (B) und **K2a** (C) auf das Wachstum der UROtsa-Zellen (44. Passage) bei einer Substanzinkubation von 0,5 μ M. u: unbestrahlt; b: bestrahlt.

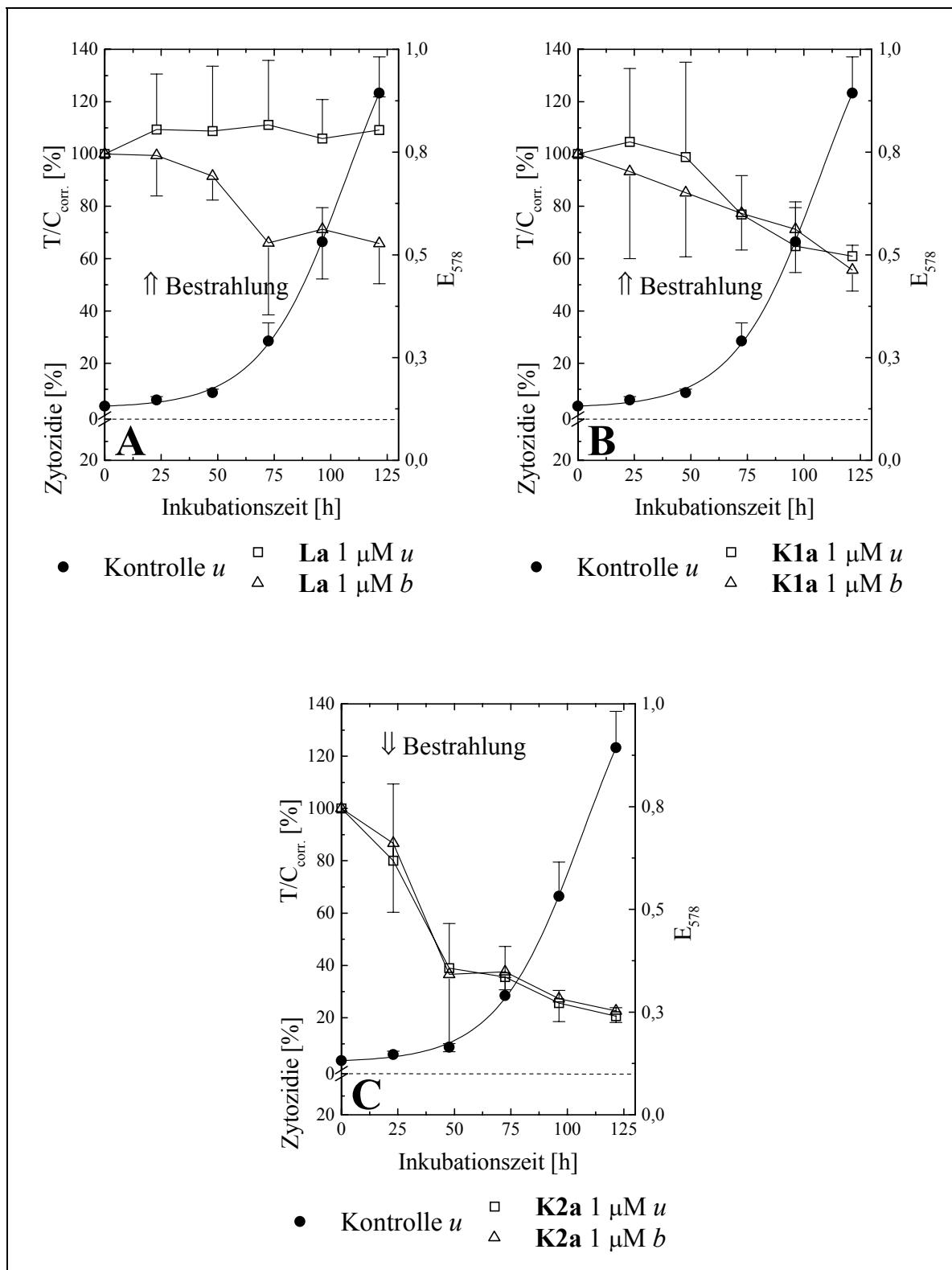


Abbildung 78: Dauerinkubationstest mit Bestrahlung: Einfluss des Porphyrinliganden **La** (A) und der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** (B) und **K2a** (C) auf das Wachstum der J82-Harnblasenkarzinom-Zelllinie (23. Passage) bei einer Substanzinkubation von 1 μ M. u: unbestrahlt; b: bestrahlt.

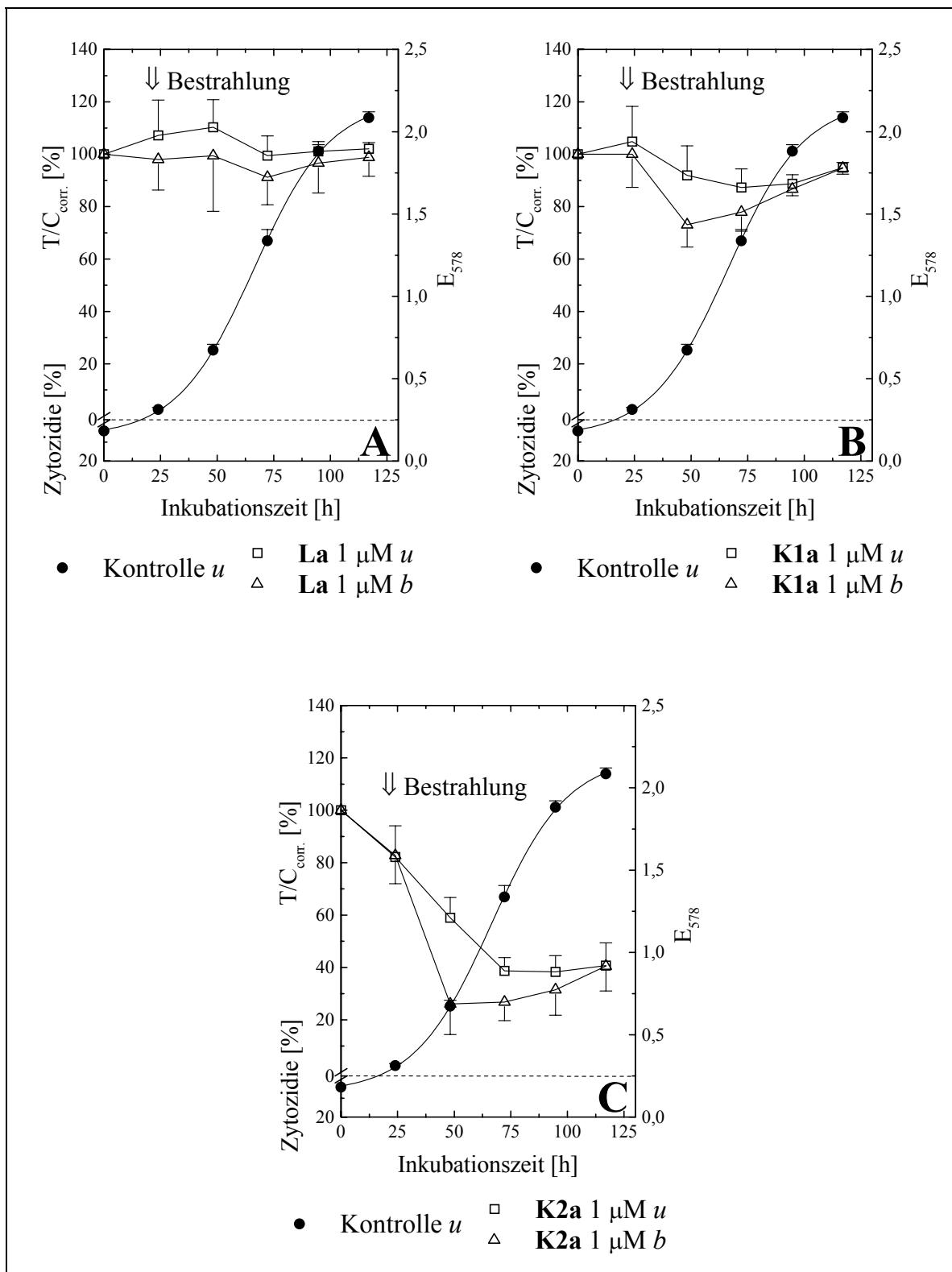


Abbildung 79: Dauerinkubationstest mit Bestrahlung: Einfluss des Porphyrinliganden **La** (A) und der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe **K1a** (B) und **K2a** (C) auf das Wachstum der UROtsa-Zellen (44. Passage) bei einer Substanzinkubation von 1 μ M. u: unbestrahl; b: bestrahl.

7.4 Verwendete Abkürzungen

A	Adenin
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ALA	5-Aminolävulinsäure (5- a minolevulinic acid)
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (b <i>ic</i> inchoninic acid)
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	Rinderserumalbumin (b <i>ovine</i> serum a lbumin)
BSO	Buthioninsulfoximin
C	Cytosin
CCD	charge c oupled d evice
CLSM	confocal l aser s canning m icroscope
d	Desoxy-
3-D	dreidimensional
DAPI	4',6- D iamidin-2-phenylindoldihydrochlorid
DMF	<i>N,N</i> - D imethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (d esoxyribonucleic acid)
DTNB	5,5'- D ithio-bis(2- n itrobenzoësäure)
ECM	Extrazellularmatrix (extra cellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
EMEM	Eagle's minimim essential medium
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FL	Fluoreszenz(-kanal)
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter light)
G	Guanin
GF AAS	graphite furnace AAS
GSH	Glutathion
h	Stunde

HE	Hämatoxylin/Eosin
H_2O dest.	destilliertes Wasser
HMG-Protein	High Mobility Group Protein
HpD	Hämatoporphyrin-Derivat
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HSA	Humanserumalbumin
ISC	intersystem crossing
LDL	Low Density Lipoprotein
LP	Langpassfilter
M	mol/l
min	Minute
mRNA	messenger RNA
M-VAC	Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin
Nc	Naphthalocyanin
NMR	Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
p	Phosphat-
PBS	isotonische, gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
Pc	Phthalocyanin
PDD	photodynamische Diagnostik
PDT	photodynamische Therapie
PMT	Photomultiplier (photo multiplier tube)
PPIX	Protoporphyrin IX
PS	Photosensibilisator
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
s	Sekunde
SH	Sulfhydryl-
SP	Kurzpassfilter

SSC	Seitwärtsstreulicht (sideward scatter light)
SSRP	strukturspezifisches Erkennungsprotein (structure specific recognition protein)
T	Thymin
t_0	Zeitpunkt der Substanzzugabe
T75	75 cm ² -Gewebekulturflasche
TCC	Urothelkarzinom (transitional cell carcinoma)
T/C _{corr}	korrigierter T/C-Wert (corrected T/C value)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v	Volumen
V	Volt

7.5 Bezugsquellennachweis

7.5.1 Geräte und Materialien

7.5.1.1 Zellkultur

Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus Sepatech, Osterode
Inkubator Forma Scientific Model 3121	Forma Scientific, Inc., Ohio, USA
Kulturflaschen 75 cm ² , 175 cm ²	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Lichtmikroskop, Diavert	Leitz, Oberkochen
Mikrotiterplatten, 96 Loch	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PetriPERM Petrischalen	In Vitro Systems & Service GmbH, Göttingen
Polystyrolröhrchen 15 ml, 50 ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Sterile Werkbank BSB 4A	Gelaire Flow Laboratories, Opera, Italien
Sterilbank LaminAir HSB 2472S	Heraeus Sepatech, Osterode
Sterilisationsautoklav 2540 MK	Tuttnauer Europe b.v., Breda, Niederlande

7.5.1.2 Zytologische Färbung

DePex	Serva, Heidelberg
Quadriperm-Objektträgerkammern	Heraeus Sepatech, Osterode
Olympus BH-2-Mikroskop	Olympus Optical GmbH, Hamburg
Panasonic F10 CCD-Videokamera	Panasonic Deutschland GmbH, Hamburg
Sony PVM-1371 QM-Videomonitor	Sony Deutschland GmbH, Köln

7.5.1.3 Analytik

AAS-System

GTA 96 Graphite Tube Atomizer

SpectrAA 30

DS 15 Data-Station

Varian, Darmstadt

Graphitrohre

Varian, Darmstadt

Bildverarbeitungskomplettsystem

Visitron Systems, Puchheim

Biotek EL 309 Autoreader

Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA

CCD-Kamera

Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA

Durchflusszytometer FACSCalibur

Becton Dickinson, Heidelberg

E_{max} precision microplate reader

MWG-Biotech, Ebersberg

Fluoreszenzspektrophotometer

Hitachi F-2000

Colora Messtechnik, Lorch

HBO 50 W AC

Osram, München

Inverses Durchlichtmikroskop

E. Leitz, Wetzlar

MetaMorph

Universal Imaging Corporation, Downington, PA, USA

Mikroskop Axiovert S 100

Zeiss, Oberkochen

PC Olivetti M24

Olivetti, Mailand, Italien

Pulsflächenanalysegerät CASY 1

Schärfe System, Reutlingen

Uvikon 930 UV-Spektrophotometer

Kontron AG, Eching

WinMDI 2.8

J. Trotter, <http://facs.scripps.edu/>

7.5.1.4 Sonstige Arbeitsmaterialien

Analysenwaagen: Sartorius 2004 MP und CC20

AH-W Vertrieb & Service Wägetechnik, Deggendorf

Eppendorf-Pipetten

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Osterode
Biofuge Pico	Heraeus Sepatech, Osterode
Köttermann 4010-Schüttler	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Leistungsdichtetedektor	GFO – Gerhard Franck Optronik GmbH, Hamburg
Minifuge RT	Heraeus Sepatech, Osterode
Minifuge T	Heraeus Sepatech, Osterode
Milli Q Water System	Millipore S. A., Molsheim, Frankreich
Nanosep 10K, 30K (Centrifugal Concentrators for 50-500 µl)	Pall GmbH, Dreieich
Polystyrolküvetten für Fluoreszenz- untersuchungen	Sarstedt, Nürmbrecht
Quarzküvetten	Hellma Optik GmbH, Jena
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Ham- burg
ThermoMixer	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Ham- burg
Transferpette-12	Brand GmbH, Wertheim
Ultraschallbad Bransonic 220	Laboratoriumsausrüstung Gerhard Hei- nemann, Schwäbisch Gmünd
Ultraschallstab, Bransonic-Sonifier B-15	Laboratoriumsausrüstung Gerhard Hei- nemann, Schwäbisch Gmünd
Vortex	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Waldmann PDT 700-Lampe	Waldmann, Villingen-Schwenningen
Wasserbad	Julabo, Labortechnik GmbH, Seelbach
Zählkammer Neubauer „Improved“	Brand GmbH, Wertheim

7.5.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Grundchemikalien waren von p. A.-Qualität und stammten von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen oder Merck, Darmstadt.

7.5.2.1 Zellkultur

EMEM	PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco, Eggenstein
Trypsin mit EDTA	PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach
Glutardialdehyd, 25 %ige Lösung	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Serva, Heidelberg
Cisplatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Hämatoporphyrin	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

7.5.2.2 Zytologische Färbung

Colcimid	Serva, Heidelberg
Giemsa-Stammlösung	Merck, Darmstadt

7.5.2.3 Analytik

Agarose	Appligene, Oncor, USA
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
BCA-Proteinbestimmungskit	Pierce, Niederlande
Bio-Rad Protein Assay-Farbstoff-konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BODIPY FL C ₅ -Ceramid	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Deckgläschen	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Edermünde

DTNB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Glutathion (reduziert)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Humanserumalbumin (HSA)	Aventis Behring GmbH, Marburg
LysoTracker Green DND 26	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Methanol, HPLC-grade	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
MitoTracker Green FM	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Rhodamin 123	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Roti-Phenol/Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
SDS	Merck, Darmstadt
Triethanolaminhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
Titrisol-Platinstandard	
$[\text{H}_2\text{PtCl}_6] \cdot \text{H}_2\text{O}$ in H_2O	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Serva, Heidelberg

7.5.3 Lösungen

- Lysepuffer zur DNA-Isolierung:

100 mM NaCl
10 mM Tris
25 mM EDTA
pH auf 8,0 mit 3 M HCl einstellen

- PBS (phosphate buffered saline):

8,0 g/l NaCl
1,0 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,2 g/l KCl
0,2 g/l KH_2PO_4
0,15 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Auffüllen mit Millipore-Wasser

- Protein-Lysepuffer:

1 % SDS
25 mM Tris
pH auf 8,0 einstellen

- TE-Puffer:

1,21 g/l Tris
0,38 g/l EDTA
pH auf 7,5 bis 8,0 mit 3 M HCl einstellen

- Tris/HCl-Puffer pH 8,2:

24,22 g/l Tris
8,32 g/l EDTA
pH auf 8,2 mit 3 M HCl einstellen

- Tris/HCl-Puffer pH 8,9:

48,44 g/l Tris
8,32 g/l EDTA
pH auf 8,9 mit 3 M HCl einstellen

8 Kapitel

Literaturverzeichnis

- [1] A. Benninghoff, *Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen* (Hrsg.: D. Drenckhahn, W. Zenker), 15. neu bearb. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, **1993**.
- [2] G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, 5. neu bearb. und erw. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1999**.
- [3] S. Halachmi, J. F. Linn, G. E. Amiel, B. Moskovitz, O. Nativ, *Br. J. Urol.* **1998**, 82, 647.
- [4] Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (Hrsg.), *Krebs in Deutschland*, 2. aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, **1999**.
- [5] G. E. Schubert in *Pathologie* (Hrsg.: W. Remmele), Band 5, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1997**.
- [6] N. Becker, J. Wahrendorf, *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland*, 3. neubearb. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1998**.
- [7] B. J. Roth, *Semin. Oncol.* **1996**, 5, 633.

- [8] H. Scher, R. Bahnson, S. Cohen, M. Eisenberger, H. Herr, J. Kozlowski, P. Lange, J. Montie, A. Pollack, D. Raghavan, J. Richie, W. Shipley, *Oncology* **1998**, 12, 225.
- [9] a) P. M. Dodd, J. A. McCaffrey, H. Herr, M. Mazumdar, J. Bacik, G. Higgins, M. G. Boyle, H. J. Scher, D. F. Bajorin, *J. Clin. Oncol.* **1989**, 17, 2546; b) I. Tannock, M. Gospodaowicz, J. Connolly, M. Jewett, *J. Urol.* **1989**, 142, 289; c) M. Igawa, T. Ohkuchi, T. Ueki, M. Ueda, K. Okada, T. Usui, *J. Urol.* **1990**, 144, 662; d) J. P. Connor, C. A. Olsson, M. C. Benson, F. Rapoport, I. S. Sawczuk, *Urology* **1989**, 34, 353; d) A. Boutan-Laroze, M. Mahjoubi, J. P. Droz, P. Charrot, P. Fargeot, P. Kerbrat, A. Caty, P. M. Voisin, *Eur. J. Cancer* **1991**, 27, 1690.
- [10] a) P. Loehrer, L. H. Einhorn, P. J. Elson, E. D. Crawford, P. Kuebler, I. Tannock, D. Raghavan, R. Stuart-Harris, M. F. Sarosdy, B. A. Lowe, *J. Clin. Oncol.* **1992**, 10, 1066; b) C. J. Logothetis, F. H. Dexeu, L. Finn, A. Sella, R. J. Amato, A. G. Ayala, R. G. Kilbourn, *J. Clin. Oncol.* **1990**, 8, 1050.
- [11] J. A. Witjes, M. Wullink, P. de Mulder, *Eur. Urol.* **1997**, 31, 414.
- [12] a) A. M. Kamat, D. L. Lamm, *Urology* **2000**, 55, 161; b) C. R. W. Lockyer, D. A. Gillatt, *J. R. Soc. Med.* **2001**, 94, 119.
- [13] M. Peyrone, *Liebigs Ann. Chem.* **1844**, 51, 1.
- [14] B. Rosenberg, L. van Camp, T. Krigas, *Nature* **1965**, 205, 698.
- [15] a) B. Rosenberg, E. Renshaw, L. van Camp, J. Hartwick, J. Drobník, *J. Bacteriol.* **1967**, 93, 716; b) B. Rosenberg, L. van Camp, E. B. Grimley, A. Y. Thomson, *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 1347.
- [16] B. Rosenberg, L. van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* **1969**, 222, 385.

- [17] a) E. Oberdisse, E. Hackenthal, K. Kuschinsky (Hrsg.), *Pharmakologie und Toxikologie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1999**; b) H. Auterhoff, J. Knabe, H.-D. Höltje, *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1999**.
- [18] R. B. Weiss, M. C. Christian, *Drugs* **1993**, 46, 360.
- [19] M. C. Heim in *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy* (Hrsg.: B. K. Keppler), VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, **1993**.
- [20] a) P. J. Loehrer, L. H. Einhorn, *Ann. Intern. Med.* **1984**, 100, 704; b) M. Morris, P. J. Eifel, J. Lu, P. W. Grigsby, C. Levenback, R. E. Stevens, M. Rotman, D. M. Gershenson, D. G. N. Mutch, *Engl. J. Med.* **1999**, 340, 1137; c) P. C. Rose, B. N. Bundy, E. B. Watkins, J. T. Thigpen, G. Deppe, M. A. Maiman, D. L. Clarke-Pearson, S. N. Insalaco, *Engl. J. Med.* **1999**, 340, 1144; d) H. M. Keys, B. N. Bundy, F. B. Stehman, L. I. Muderspach, W. E. Chafe, C. L. Suggs, J. L. Walker, D. N. Gersell, *Engl. J. Med.* **1999**, 340, 1154.
- [21] a) N. Becker in *Krebsforschung heute* (Berichte aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum) (Hrsg.: Deutsches Krebsforschungszentrum), Steinkopff, Darmstadt, **1995**; b) T. Beardsley, I. Hoefer, *Spektrum der Wissenschaft* **1994**, März, 46.
- [22] G. J. Bosl, R. J. N. Motzer, *Engl. J. Med.* **1997**, 337, 242.
- [23] K. Wang, J. Lu, R. Li, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, 151, 53.
- [24] P. Pil, S. J. Lippard, *Encyclopedia of Cancer, Vol. 1* (Hrsg.: J. R. Bertino), Academic Press, San Diego, **1997**.
- [25] A. Eastman, *Cancer Cells* **1990**, 2, 275.

- [26] P. A. Andrews, K. D. Albright in *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy* (Hrsg.: S. B. Howell), Plenum Press, New York, **1991**.
- [27] a) E. Segal, J. B. Le Pecq, *Cancer Res.* **1985**, 45, 492; b) S. E. Miller, A. D. House, *Inorg. Chim. Acta* **1989**, 166, 189; c) P. Umapathy, *Coord. Chem. Rev.* **1989**, 95, 129; d) B. Lippert, W. Beck, *Chemie in unserer Zeit* **1983**, 17, 190.
- [28] W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, 2. überarb. Aufl., Teubner Verlag, Stuttgart, **1995**.
- [29] a) B. Rosenberg, *Cancer* **1985**, 55, 2303; b) J. Reedijk, *Pure Appl. Chem.* **1987**, 59, 181; c) S. E. Sherman, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 1153; d) S. J. Brown, C. S. Chow, S. J. Lippard in *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Vol. 6 (Hrsg.: R. B. King), John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, **1994**; e) D. B. Zamble, S. J. Lippard, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, 20, 435.
- [30] a) W. P. Johnson, A. M. Mazard, J. Escalie, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 6376; b) S. L. Bruhn, J. H. Toney, S. J. Lippard in *Progress in Inorganic Chemistry: Bioinorganic Chemistry*, Vol. 38 (Hrsg.: S. J. Lippard), John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, **1990**; c) K. Sugasawa, J. M. Y. Ng, C. Masutani, S. Iwai, P. J. van der Spek, A. P. M. Eker, F. Hanaoka, D. Bootsma, J. H. J. Hoeijmakers, *Molecular Cell* **1998**, 2, 223; d) M. Wakasugi, A. Sancer, *J. Biol. Chem.* **1999**, 247, 18759.
- [31] Z. Guo, P. J. Sadler, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1619.
- [32] R. B. Silverman, *Medizinische Chemie*, VCH, Weinheim, New York, Chichester, Cambridge, Tokyo, **1994**.

- [33] a) G. Schröder, J. Kozelka, M. Sabat, M.-H. Fouchet, R. Beyerle-Pfnür, B. Lippert, *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 1647; b) G. Schröder, M. Sabat, I. Baxter, J. Kozelka, B. Lippert, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 490.
- [34] D. Yang, S. S. G. E. van Boom, J. Reedijk, J. H. van Boom, A. H.-J. Wang, *Biochemistry* **1995**, 34, 12912.
- [35] a) S. Borman, *Chem. Eng. News* **1995**, Oktober, 6; b) A. Grohmann, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1996**, 44, 130.
- [36] a) S. J. Martin, D. R. Green, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1995**, 18, 137; b) V. M. Gonzalez, M. A. Fuertes, C. Alonso, J. M. Perez, *Mol. Pharmacol.* **2001**, 59, 657; c) R. N. Rose, *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, 2, 103.
- [37] a) P. M. Pil, S. J. Lippard, *Science* **1992**, 256, 234; b) C. S. Chow, J. P. Whitehead, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1994**, 33, 15124; c) S. J. Lippard, J. M. Berg, *Bioanorganische Chemie*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1995**; d) C. S. Chow, C. M. Barnes, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1995**, 34, 2956; e) U.-M. Ohndorf, J. P. Whitehead, N. L. Raju, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1997**, 36, 14807; f) E. R. Jamieson, M. P. Jacobson, C. M. Barnes, C. S. Chow, S. J. Lippard, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 12346; g) A. Vaiman, S. E. Lim, S. M. Patrick, W. C. Copeland, D. C. Hinkle, J. J. Turchi, S. G. Chaney, *Biochemistry* **1999**, 38, 11026; h) Q. He, U. M. Ohndorf, S. J. Lippard, *Biochemistry* **2000**, 39, 14426; i) M. Stros, *Biochemistry* **2001**, 40, 4769; j) D. B. Zamble, Y. Mikata, C. H. Eng, K. E. Sandman, S. J. Lippard, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 91, 451; k) E. A. Pasheva, I. Ugrinova, N. C. Spassovska, I. G. Pashev, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2002**, 34, 87.
- [38] a) M. Holtze, G. Lurz, J. Schröder, *Gene* **1995**, 161, 295; b) Y. Y. Xiang, D. Y. Wang, M. Tanaka, H. Igarashi, Y. Naito, Y. Ohthawara, Q. Shen, H. Sugimura, *Cancer Lett.* **1996**, 106, 271; c) U. M. Ohndorf, M. A. Rould, Q. He,

- C. O. Pabo, S. J. Lippard, *Nature* **1999**, 399, 708; d) A. T. Yarnell, S. Oh, D. Reinberg, S. J. Lippard, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 25736.
- [39] J. Reedijk, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 1499.
- [40] a) D. B. Zamble, S. J. Lippard in *Cisplatin – Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug* (Hrsg.: B. Lippert), Wiley-VCH, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, **1999**; b) A. Eastman in *Cisplatin – Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug* (Hrsg.: B. Lippert), Wiley-VCH, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, **1999**.
- [41] a) E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2467; b) P. Jordan, M. Carmo-Fonseca, *Cell Mol. Life Sci.* **2000**, 57, 1229.
- [42] J. Reedijk, *Chem. Commun.* **1996**, 7, 801.
- [43] a) D. D. von Hoff, R. Schilsky, C. M. Reichert, R. L. Reddick, M. Rosenzweig, R. C. Young, F. M. Miggia, *Cancer Treat. Rep.* **1979**, 63, 1527; b) R. Safirstein, J. Winston, M. Goldstein, D. Moel, S. Dikman, J. Guttenplan, *Am. J. Kidney Dis.* **1986**, 8, 356; c) A. Löser, J. Hoß, *Krebsbehandlung mit Strahlen- und Chemotherapie*, TRIAS-Thieme Hippocrates Enke, Stuttgart, **1990**.
- [44] a) D. B. Smith, E. S. Mewlands, G. J. S. Rustin, R. H. J. Begent, N. Howells, B. McQuade, K. D. Bagshawe, *Lancet* **1991**, 338, 487; b) A. L. Jones, A. S. Hill, M. Soukop, A. W. Hutcheon, J. Cassidy, S. B. Daye, K. Sikora, D. N. Carney, D. Cunningham, *Lancet* **1991**, 338, 483; c) E. A. Perez, *J. Clin. Oncol.* **1995**, 13, 1036; d) D. Warr, *Support Care Cancer* **1997**, 5, 12; e) E. A. Perez, *Cancer J. Sci. Am.* **1998**, 4, 72; f) F. Roila, D. Donati, S. Tamberi, G. Margutti, *Support Care Cancer* **2002**, 10, 88; g) G. R. Morrow, J. A. Roscoe, J. T. Hickok, P. R. Andrews, S. Matteson, *Support Care Cancer* **2002**, 10, 96.

- [45] a) W. Dempke, W. Voigt, A. Grothey, B. T. Hill, H. J. Schmoll, *Anticancer Drugs* **2000**, 11, 225; b) M. Kartalou, J. M. Essigmann, *Mutat. Res.* **2001**, 478, 23; c) V. Brabec, J. Kasparkova, *Drug Resist. Updat.* **2002**, 5, 147.
- [46] a) M. Harries, S. B. Kaye, *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2001**, 10, 1715; b) C. Cianti, *Clin. Ter.* **2002**, 153, 135.
- [47] a) M. J. Edelmann, S. L. Khanwani, *Curr. Treat. Options Oncol.* **2001**, 2, 51; b) H. B. Niell, *Curr. Treat. Options Oncol.* **2001**, 2, 71; c) J. H. Schiller, *Oncology* **2002**, 63, 105.
- [48] W. Termrungruanlert, A. P. Kudelka, S. Piamsomboon, C. L. Edwards, C. F. Verschraegen, E. Loyer, J. J. Kavanagh, *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **1996**, 17, 493.
- [49] R. S. Go, A. A. Adjei, *J. Clin. Oncol.* **1999**, 17, 409.
- [50] a) J. L. Misset, H. Bleiberg, W. Sutherland, M. Bekradda, E. Cvitkovic, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2000**, 35, 75; b) C. R. Culy, D. Clemett, L. R. Wiseman, *Drugs* **2000**, 60, 895; c) J. Cassidy, *Int. J. Clin. Pract.* **2000**, 54, 399; d) A. Laadem, E. Cvitkovic, *Bull. Cancer* **2001**, 88, 9.
- [51] O. Raab, *Z. Biol.* **1900**, 39, 524.
- [52] H. von Tappeiner, A. Jodlbauer, *Dtsch. Arch. Klein. Med.* **1904**, 80, 524.
- [53] H. von Tappeiner, A. Jessionek, *Münch. Med. Wochenschr.* **1903**, 47, 2042.
- [54] H. Auler, G. Banzer, *Z. Krebsforsch.* **1942**, 53, 65.
- [55] a) R. L. Lipson, F. J. Blades, *Arch. Dermatol.* **1960**, 82, 508; b) R. L. Lipson, F. J. Blades, A. M. Olsen, *J. Natl. Cancer Inst.* **1961**, 26, 1.
- [56] a) T. J. Dougherty, G. B. Grindey, R. Fiel, K. R. Weishaupt, D. G. Boyle, *J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, 55, 115; b) T. J. Dougherty, J. E. Kaufman, A. Gold-

- farb, K. R. Weishaupt, D. G. Boyle, A. Mittleman, *Cancer Res.* **1978**, 38, 2628.
- [57] T. J. Dougherty, *Photochem. Photobiol.* **1987**, 45, 879.
- [58] C. S. Foote, *Photochem. Photobiol.* **1991**, 54, 649.
- [59] a) D. Wöhrle, M. W. Tausch, W.-D. Stohrer, *Photochemie – Konzepte, Methoden, Experimente*, Wiley-VCH, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, **1998**; b) B. Roeder in *Photodynamic Tumor Therapy (2nd and 3rd Generation Photosensitizers)* (Hrsg.: J. G. Moser), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, **1998**.
- [60] M. Prein, W. Adam, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 519.
- [61] A. Michaeli, J. Feitelson, *Photochem. Photobiol.* **1994**, 59, 284.
- [62] B. B. Noodt, E. Kvam, H. B. Stehen, J. Moan, *Photochem. Photobiol.* **1993**, 58, 541.
- [63] J. Moan, K. Berg, *Photochem. Photobiol.* **1992**, 55, 931.
- [64] B. W. Henderson, T. J. Dougherty, *Photochem. Photobiol.* **1992**, 55, 145.
- [65] a) J. P. J. Boegheim, J. W. M. Lagerberg, E. M. A. R. Dubbelman, K. Tussen, H. J. Tanke, J. van der Meulen, J. van Steveninck, *Photochem. Photobiol.* **1988**, 48, 613; b) G. Bottioli, A. C. Croce, R. Rampone, P. Vaghi, *Photochem. Photobiol.* **1992**, 55, 575; c) J. Y. Chen, N. K. Mak, C. M. Yow, M. C. Fung, L. C. Chiu, W. N. Leung, N. H. Cheung, *Photochem. Photobiol.* **2000**, 72, 541; d) E. Weizman, C. Rothmann, L. Greenbaum, A. Shainberg, M. Adamek, B. Ehrenberg, Z. Malik, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2000**, 59, 92.
- [66] R. C. Krieg, Dissertation, Universität Regensburg, **2001**.

- [67] a) W. Torinuki, T. Miura, M. Seiji, *Br. J. Dermatol.* **1980**, 102, 17; b) S. Radakovic-Fijan, K. Rappersberger, A. Tanew, H. Honigsmann, B. Ortel, *J. Invest. Dermatol.* **1999**, 112, 264; c) C. Fabris, G. Valduga, G. Miotto, L. Borsetto, G. Jori, S. Garbisa, E. Reddi, *Cancer Res.* **2001**, 61, 7495.
- [68] a) J. R. Shulok, H. M. Wade, C. Lin, *Photochem. Photobiol.* **1990**, 51, 451; b) V. O. Melnikova, L. N. Bezdetnaya, C. Bour, E. Festor, M. P. Gramain, J. L. Merlin, A. Y. Potapenko, F. Guillemin, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1999**, 49, 96.
- [69] a) D. Kessel, *Photochem. Photobiol.* **1986**, 44, 489; b) M. W. Leach, R. J. Higgins, S. A. Autry, J. E. Boggan, S. J. Lee, K. M. Smith, *Photochem. Photobiol.* **1993**, 58, 653; c) A. Casas, C. Perotti, M. Saccoliti, P. Sacca, H. Fukuda, A. M. Battle, *Br. J. Cancer* **2002**, 86, 837.
- [70] D. Yu, S. Chang, C. Ma, *J. Urol.* **1993**, 149, 1198.
- [71] a) R. Bonnet, M. Berenbaum in *Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use* (Hrsg.: G. Bock, S. Harnett), John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, **1989**; b) D. V. Ash, S. B. Brown, *Eur. J. Cancer* **1993**, 29A, 1781.
- [72] a) A. J. MacRobert, S. G. Brown, D. Phillips in *Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use* (Hrsg.: G. Bock, S. Harnett), John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, **1989**; b) J. C. Kennedy, B. H. Pottier, D. C. Pross, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1990**, 6, 143.
- [73] T. Takemura, S. Nakajima, I. Sakata, *Photochem. Photobiol.* **1994**, 59, 366.
- [74] a) P. Schlag, M. Hünerbein, J. Stern, J. Gahlen, G. Graschew, *Dtsch. Med. Wschr.* **1991**, 116, 619; b) T. J. Dougherty in *Innovations in Radiation Oncology* (Hrsg.: H. R. Withers, L. J. Peters), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

- berg, **1988**; c) D. Jocham, *Münch. Med. Wochenschr.* **1991**, 15, 20; d) H. I. Pass, *J. Natl. Cancer Inst.* **1993**, 85, 443.
- [75] a) L. I. Grossweiner, *ACS Symp. Ser. (Porphyric Pesticides)* **1994**, 559, 255; b) K. Berg, J. Moan, *Photochem. Photobiol.* **1997**, 65, 403; c) C. J. Gomer, N. Rucker, A. Ferrario, S. Wong, *Radiat. Res.* **1989**, 120, 1; d) N. Rebeiz, K. W. Kelley, C. A. Rebeiz, *ACS Symp. Ser. (Porphyric Pesticides)* **1994**, 559, 233.
- [76] C. J. Tralan, H. Barr, D. R. Sandmann, M. R. Lewin, S. G. Brown, *Photochem. Photobiol.* **1987**, 46, 777.
- [77] a) J. Moan, K. Berg, A. Western, Z. Malik, A. Rück, H. Schneckenburger in *Intracellular localisation of photosensitizers in Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use* (Hrsg.: G. Bock, S. Harnett), John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, **1989**; b) G. Jori in *Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use* (Hrsg.: G. Bock, S. Harnett), John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, **1989**.
- [78] a) R. H. Pottier, J. C. Kennedy, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1990**, 8, 1; b) A. J. Barrett, J. C. Kennedy, R. A. Jones, P. Nadeau, R. H. Pottier, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1990**, 6, 309.
- [79] a) J. L. Wike-Hooley, J. Haveman, H. S. Reinhold, *Radiother. Oncol.* **1984**, 2, 343; b) I. F. Tannock, D. Rotin, *Cancer Res.* **1989**, 49, 4373; c) M. Volpin, I. Levitin, S. Osinsky, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2516.
- [80] M. Scann, *Nature* **1977**, 270, 209.
- [81] a) P. Karlson, *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, 13. neubearb. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1988**; b) L. Stryer, *Biochemie*, 4. Aufl., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.

- [82] a) M. Korbelik, J. Hung, *Photochem. Photobiol.* **1991**, 53, 501; b) D. Kessel, K. Woodbum, *Int. J. Biochem.* **1993**, 25, 1377.
- [83] C. Lin, *Cancer Cells* **1991**, 3, 437.
- [84] J. C. Kennedy, R. H. Pottier, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1992**, 14, 275.
- [85] A. Hirth, U. Michelsen, D. Wöhrle, *Chemie in unserer Zeit* **1999**, 33, 84.
- [86] S. Wan, R. R. Anderson, J. A. Parrish, *Photochem. Photobiol.* **1981**, 34, 493.
- [87] B. C. Wilson, W. P. Jeeves, D. M. Lowe, *Photochem. Photobiol.* **1985**, 42, 153.
- [88] R. K. Pandey, D. A. Bellinier, K. M. Smith, T. J. Dougherty, *Photochem. Photobiol.* **1991**, 53, 65.
- [89] a) I. Rosenthal in *Phthalocyanines: Properties and Applications, Vol. 4* (Hrsg.: C. C. Lezboff, A. B. P. Lever), VCH, New York, Weinheim, Cambridge, **1996**; b) J. Moan, V. Iani, L. W. Ma, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1998**, 42, 100; c) T. J. Farrell, B. C. Wilson, M. S. Patterson, M. C. Olivo, *Photochem. Photobiol.* **1998**, 68, 394; d) G. H. Rodal, S. K. Rodal, J. Moan, K. Berg, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1998**, 45, 150; e) N. Brasseur, R. Ouellet, C. La-Madeleine, J. E. van-Lier, *Br. J. Cancer* **1999**, 80, 1533; f) S. M. Chiu, T. W. Davis, M. Meyers, N. Ahmad, H. Mukhtar, D. Separovic, *Int. J. Oncol.* **2000**, 16, 423; g) L. Gao, X. Qian, L. Zhang, Y. Zhang, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2001**, 65, 35; h) A. Gijsens, A. Derycke, L. Missiaen, D. de Vos, J. Huwyler, A. Aberle, P. de Witte, *Int. J. Cancer* **2002**, 101, 78.
- [90] a) M. J. Cook, I. Chambrier, S. J. Cracknell, D. A. Mayes, D. A. Russel, *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62, 123; b) N. Michailov, M. Peeva, I. Angelov, D. Wöhrle, S. Müller, G. Jori, F. Ricchelli, M. Shopova, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1997**, 37, 154; c) V. Mantareva, M. Shopova, G. Spassova, D.

- Wöhrle, S. Müller, G. Jori, F. Ricchelli, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1997**, 40, 258; d) M. Soncin, A. Busetti, R. Biolo, G. Jori, G. Kwag, Y. S. Li, M. E. Kenney, M. A. Rodgers, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1998**, 42, 202; e) A. Busetti, M. Soncin, E. Reddi, M. A. Rodgers, M. E. Kenney, G. Jori, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1999**, 53, 103.
- [91] a) H. Rezzoug, M. Barberi-Heyob, J. L. Merlin, L. Bolotine, D. Lignon, F. Guillemin, *Bull. Cancer* **1996**, 83, 816; b) G. M. Garbo, V. H. Fingar, T. J. Wieman, E. B. Noakes III, P. S. Haydon, P. B. Cerrito, D. H. Kessel, A. R. Morgan, *Photochem. Photobiol.* **1998**, 68, 561; c) I. Amit, Z. Malik, D. Kessel, *Photochem. Photobiol.* **1999**, 69, 700; d) R. Hornung, M. K. Fehr, J. Monti-Frayne, T. B. Krasieva, B. J. Tromberg, M. W. Berns, Y. Tadir, *Photochem. Photobiol.* **1999**, 70, 624; e) H. J. Hopkinson, D. I. Vernon, S. B. Brown, *Photochem. Photobiol.* **1999**, 69, 482; f) D. J. Ball, D. I. Vernon, S. B. Brown, *Photochem. Photobiol.* **1999**, 69, 360; g) A. Grichine, A. Feofanov, T. Karmakova, N. Kazachkina, E. Pecherskikh, R. Yakubovskaya, A. Mironov, M. Egert-Charlier, P. Vigny, *Photochem. Photobiol.* **2001**, 73, 267; h) S. Murugesan, S. Shetty, T. Srivastava, A. Samuel, O. Noronha, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2002**, 68, 33.
- [92] a) H. Brunner, H. Obermeier, R.-M. Szeimies, *Chem. Ber.* **1995**, 128, 173; b) M. Canete, A. Villanueva, V. Dominguez, S. Polo, A. Juarranz, J. C. Stockert, *Int. J. Oncol.* **1998**, 13, 497; c) K. Berlin, R. K. Jain, C. Richert, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 61, 107; d) D. A. James, N. Swamy, N. Paz, R. N. Hanson, R. Ray, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2379; e) S. P. Songca, *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, 53, 1469; f) C. Lottner, K.-C. Bart, G. Bernhardt, H. Brunner, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2079.
- [93] a) S. Gluck, A. Chadderton, A. D. Ho, *Photochem. Photobiol.* **1996**, 63, 846; b) T. Momma, M. R. Hamblin, H. C. Wu, T. Hasan, *Cancer Res.* **1998**, 58, 5425; c) J. M. Runnels, N. Chen, B. Ortel, D. Kato, T. Hasan, *Br. J. Cancer*

- 1999, 80, 946; d) N. Rousset, V. Vonarx, S. Eleouet, J. Carre, E. Kerninon, Y. Lajat, T. Patrice, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1999**, 52, 65; e) M. M. Tsoukas, S. Gonzalez, T. J. Flotte, R. R. Anderson, M. E. Sherwood, N. Kollias, *J. Invest. Dermatol.* **2000**, 114, 303; f) H. Brunner, K.-M. Schellerer, *Monatsh. Chem.* **2002**, 133, 669.
- [94] a) C. J. Gomes, S. W. Ryter, A. Ferrario, N. Rucker, S. Wong, A. M. Fisher, *Cancer Res.* **1996**, 56, 2355; b) G. M. Garbo, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1996**, 34, 109; c) M. J. Kaplan, R. G. Somers, R. H. Greenberg, J. Ackers, *J. Surg. Oncol.* **1998**, 67, 121; d) G. Zheng, W. R. Potter, A. Sumlin, T. J. Dougherty, R. K. Pandey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 123; e) A. Di Steffano, A. Ettorre, S. Sbrana, C. Giovani, P. Neri, *Photochem. Photobiol.* **2001**, 73, 290.
- [95] a) S. Evrard, P. Keller, A. Hajri, G. Balboni, L. Mendoza-Burgos, C. Damge, J. Marescaux, M. Aprahamian, *Br. J. Surg.* **1994**, 81, 1185; b) P. Keller, M. Sowinska, V. Tassetti, F. Heisel, A. Hajri, S. Evrard, J. A. Miehe, J. Marescaux, M. Aprahamian, *Photochem. Photobiol.* **1996**, 63, 860; c) V. Tassetti, A. Hajri, M. Sowinska, S. Evrard, F. Heisel, L. Q. Cheng, J. A. Miehe, J. Marescaux, M. Aprahamian, *Photochem. Photobiol.* **1997**, 65, 997; d) J.-Y. Matroule, A. C. Hellin, P. Morlière, A.-S. Fabiano, R. Santus, M.-P. Merville, J. Piette, *Photochem. Photobiol.* **1999**, 70, 540; e) C. Tanielian, M. Kobayashi, C. Wolff, *J. Biomed. Opt.* **2001**, 6, 252; f) A. Hajri, S. Wack, C. Meyer, M. K. Smith, C. Leberquier, M. Kedinger, M. Aprahamian, *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75, 140.
- [96] H. Ali, J. E. van Lier, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2379.
- [97] a) D. J. Roberts, F. Cairnduff, *Br. J. Plast. Surg.* **1995**, 48, 360; b) D. J. Robinson, P. Collins, M. R. Stringer, D. I. Vernon, G. I. Stables, S. B. Brown, R. A. Sheehan-Dare, *Acta Derm. Venerol.* **1999**, 79, 451; c) W. C. Tan, C. Fulljames, N. Stone, A. J. Dix, N. Shepherd, D. J. Roberts, S. B. Brown, N.

- Krasner, H. Barr, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1999**, 53, 75; d) S. Karrer, R. M. Szeimies, C. Abels, U. Wlotzke, W. Stolz, M. Landthaler, *Br. J. Dermatol.* **1999**, 140, 935; e) P. Jichlinski, H. J. Leisinger, *Urol. Res.* **2001**, 29, 396; f) H. Brunner, F. Hausmann, R. C. Krieg, E. Endlicher, J. Schölmerich, R. Knüchel, H. Messmann, *Photochem. Photobiol.* **2001**, 74, 721; g) E. Endlicher, P. Rümmele, F. Hausmann, R. Krieg, R. Knüchel, H. C. Rath, J. Schölmerich, H. Messmann, *Br. J. Cancer* **2001**, 85, 1572; h) E. L. Tayler, S. B. Brown, *J. Dermatolog. Treat.* **2002**, 14, 3.
- [98] K.-C. Bart, Dissertation, Universität Regensburg, **2001**.
- [99] C. Lottner, K.-C. Bart, G. Bernhardt, H. Brunner, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2064.
- [100] a) J. J. Whang-Peng, E. C. Lee, C. S. Kao-Shan, K. Seibert, M. E. Lippman, *J. Natl. Cancer Inst.* **1983**, 71, 687; b) J. J. Yunis, *Science* **1983**, 221, 227.
- [101] a) K. Seibert, S. M. Shafie, T. J. Triche, J. J. Whang-Peng, S. J. O'Brien, J. H. Toney, K. K. Huff, M. E. Lippman, *Cancer Res.* **1983**, 43, 2223; b) R. R. Reddel, I. E. Alexander, M. Koga, J. Shine, R. L. Sutherland, *Cancer Res.* **1988**, 48, 4340.
- [102] R. J. Hay, *Anal. Biochem.* **1988**, 171, 225.
- [103] C. M. O'Toole in *In Vitro Models for Cancer Research* (Hrsg.: M. M. Webber), CRC Press, Baco Raton, Florida, **1986**.
- [104] J. L. Petzoldt, I. M. Leigh, P. G. Duffy, C. Sexton, J. R. Masters, *Urol. Res.* **1995**, 23, 377.
- [105] T. Lindl, *Zell- und Gewebekultur*, 4. überarb. Aufl., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, **2000**.

- [106] P. Winkelmeier, B. Glauner, T. Lindl, *ATLA (Alternatives To Laboratory Animals)* **1993**, 21, 269.
- [107] D. E. Rooney, B. H. Czepulkowski in *Human cytogenetics – a practical approach*, IRL Press Ltd., Oxford, **1986**.
- [108] C. Lottner, Diplomarbeit, Universität Regensburg, **2000**.
- [109] H. Reile, Dissertation, Universität Regensburg, **1991**.
- [110] a) G. Bernhardt, H. Reile, H. Birnböck, T. Spruß, H. Schönenberger, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1992**, 118, 35; b) H. Reile, H. Birnböck, G. Bernhardt, T. Spruß, H. Schönenberger, *Anal. Biochem.* **1990**, 187, 262.
- [111] H. Haken, H. C. Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **1992**.
- [112] a) D. He, S. Sassa, H. W. Lim, *Photochem. Photobiol.* **1993**, 57, 825; b) L. Wyld, J. L. Burn, M. W. R. Reed, N. J. Brown, *Br. J. Cancer* **1997**, 76, 705.
- [113] K. Wiechelmann, R. Braun, J. Fitzpatrick, *Anal. Biochem.* **1988**, 175, 231.
- [114] R. Knüchel, *Pathologe* **1994**, 15, 1.
- [115] R. Knüchel, G. Brockhoff, E. Endl, P. Steinbach in *Aktuelle Aspekte der Tumorimmunologie in der Gynäkologie* (Hrsg.: R. Kreienberg, H. J. Grill, U. Koldovsky), Zuckschwerdt Verlag, München, **1995**.
- [116] A. Köhler, *Z. wiss. Mikrosk.* **1904**, 21, 129.
- [117] R. Krieg, S. Fickweiler, H. Messmann, R. Knüchel in *Fluorescent Microscopy and Fluorescent Probes 3* (Hrsg.: A. Kotyk), espero Publishing, Ústí Nad Labem, **1999**.
- [118] a) L. V. Johnson, M. L. Walch, B. J. Bockus, L. B. Chen, *J. Cell Biol.* **1981**, 88, 526; b) R.-M. Szeimies, S. Karrer, C. Abels, P. Steinbach, S. Fickweiler,

- H. Messmann, W. Bäumler, M. Landthaler, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1996**, 34, 67.
- [119] a) N. G. Lipsky, R. E. Pagano, *Science* **1985**, 228, 745; b) Y.-L. Wang in *Methods of Cell Biology* (Hrsg.: D. Lansing-Tayler), Academic Press, San Diego, **1989**.
- [120] L. A. Kunz-Schughart, *Cell Biol. Int.* **1999**, 23, 157.
- [121] L. A. Kunz-Schughart, M. Kreutz, R. Knüchel, *Int. J. Exp. Path.* **1998**, 79, 1.
- [122] L. A. Kunz-Schughart, W. Müller-Klieser in *Animal Cell Culture – A Practical Approach* (Hrsg.: J. R. W. Masters), 3rd Ed., University Press, Oxford, **2000**.
- [123] C. E. Bigelow, S. Mitra, R. Knüchel, T. H. Foster, *Br. J. Cancer* **2001**, 85, 727.
- [124] a) H. C. Burck, *Histologische Technik*, 6. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1988**; b) B. Romeis, *Mikroskopische Technik* (Hrsg.: P. Böck), 17. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München, **1989**.
- [125] R. C. Gaver, G. Deeb, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1986**, 16, 201.
- [126] R. Riccardi, A. Riccardi, C. Di Rocco, G. Carelli, R. L. Tartaglia, A. Lasorella, T. Servidei, R. Mastrangelo, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1991**, 30, 21.
- [127] a) R. J. Motzer, E. Reed, F. Perera, D. Tang, H. Shamkhani, M. C. Poirier, W. Y. Tsai, R. J. Parker, G. J. Bosl, *Cancer* **1994**, 73, 2843; b) A. M. Fichtinger-Schepman, H. C. van-Dijk-Knijnenburg, S. D. van-der-Velde-Visser, F. Berends, R. A. Baan, *Carcinogenesis* **1995**, 16, 2447; c) M. J. McKeage, F. Raynaud, J. Ward, C. Berry, D. O'Dell, L. R. Kelland, B. A. Murrer, P. Santabarbara, K. R. Harrap, I. R. Judson, *J. Clin. Oncol.* **1997**, 15, 2691; d)

- B. Peng, M. J. Tilby, M. W. English, L. Price, A. D. Pearson, A. V. Boddy, D. R. Newell, *Br. J. Cancer* **1997**, 76, 1466; e) M. S. Newman, G. T. Colbern, P. K. Working, C. Engbers, M. A. Amantea, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, 43, 1; f) M. J. Welters, A. M. Fichtinger-Schepman, R. A. Baan, A. J. Jacobs-Bergmans, A. Kegel, W. J. van-der-Vijgh, B. J. Braakhuis, *Br. J. Cancer* **1999**, 79, 82.
- [128] B. Welz, M. Sperling, *Atomabsorptionsspektrometrie*, 4. neubearb. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Toronto, Brisbane, Singapore, **1997**.
- [129] M. Koch, Dissertation, Universität Regensburg, **1993**.
- [130] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248.
- [131] Bio-Rad Protein Assay, *Beiheft zum Farbstoffkonzentrat*, Bio-Rad Laboratories, **1990**.
- [132] a) D. M. Wallace, *Methods Enzymol.* **1987**, 152, 33; b) M. Borst, D. M. Miller, *Am. J. Med. Sci.* **1990**, 299, 356.
- [133] M. Gross-Bellard, P. Oudet, P. Chembon, *Eur. J. Biochem.* **1973**, 36, 32.
- [134] a) K. J. Scanlon, M. Kashani-Sabet, L. C. Sowers, *Cancer Res.* **1989**, 43, 4211; b) K. J. Scanlon, M. Kashani-Sabet, H. Miyachi, L. C. Sowers, J. Rossi, *Anticancer Res.* **1989**, 9, 1301; c) C. C. Chao, *J. Formos Med. Assoc.* **1996**, 95, 893.
- [135] a) M. Osmak, L. Beketic-Oreskovic, M. Matulic, J. Soric, *Mutat. Res.* **1993**, 303, 113; b) E. Levy, C. Baroche, J. M. Barret, C. Alapetite, B. Salles, D. Averbeck, E. Moustacchi, *Carcinogenesis* **1994**, 15, 845; c) B. K. Sinha, H. Yamazaki, H. M. Eliot, E. Schneider, M. M. Borner, P. M. O'Connor, *Biochem. Biophys. Acta* **1995**, 1270, 12; d) H. M. Warenius, L. A. Seabra, P.

- Maw, *Int. J. Cancer* **1996**, 67, 224; e) Y. Kinashi, M. Akaboshi, S. Masunaga, K. Ono, M. Watanabe, *Radiat. Med.* **1998**, 16, 233.
- [136] a) S. W. Johnson, D. Shen, I. Pastan, M. M. Gottesman, T. C. Hamilton, *Exp. Cell Res.* **1996**, 226, 133; b) L. R. Kelland, S. Y. Sharp, C. F. O'Neill, F. I. Raynaud, P. J. Beale, I. R. Judson, *J. Inorg. Biochem.* **1999**, 77, 111.
- [137] a) A. Eastman, N. Schulte, N. Sheibani, C. M. Sorenson in *Platinum and other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, **1988**; b) A. de Graeff, R. J. C. Slebos, S. Rodenhuis, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1988**, 44, 325; c) H. Masuda, R. F. Ozols, G.-M. Lai, A. Fojo, M. Rothenberg, T. C. Hamilton, *Cancer Res.* **1988**, 48, 5713; d) H. Masuda, T. Tanaka, I. Kusaba, *Cancer Res.* **1990**, 50, 1863; e) L. N. Petersen, E. L. Mamenta, T. Stevensner, S. G. Chaney, V. A. Bohr, *Carcinogenesis* **1996**, 17, 2597.
- [138] a) G. Batist, B. C. Behrends, R. Makuch, T. C. Hamilton, A. G. Katki, K. G. Louie, C. E. Myers, R. F. Ozols, *Biochem. Pharmacol.* **1986**, 35, 2257; b) C. R. Wolf, I. P. Hayward, S. S. Lawrie, K. Buckton, M. A. McIntyre, D. J. Adams, A. D. Lewis, A. R. R. Scott, J. F. Smyth, *Int. J. Cancer* **1987**, 39, 696; c) V. M. Richon, N. Schulte, A. Eastman, *Cancer Res.* **1987**, 47, 2956; d) S. Sekiya, T. Oosaki, S. Andoh, N. Suzuki, M. Akaboshi, H. Takamizawa, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1989**, 25, 429; e) P. A. Andrews, M. P. Murphy, S. B. Howell, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1989**, 25, 619; f) C. R. Yang, Y. C. Ou, J. H. Kuo, Y. L. Kao, C. L. Chen, S. Y. Yean, Y. Y. Horng, C. S. Yang, *Cancer Lett.* **1997**, 119, 157; g) K. Ikeda, K. Miura, S. Himeno, N. Imura, A. Naganuma, *Mol. Cell Biochem.* **2001**, 219, 51; h) S. Daubeuf, P. Leroy, A. Paolicchi, A. Pompella, M. Wellman, M. M. Galteau, A. Visvikis, *Biochem. Pharmacol.* **2002**, 64, 207.

- [139] a) M. Dietel, *Pathol. Res. Pract.* **1991**, 187, 892; b) D. Oudard, J. P. Marie, E. Pujade-Lauraine, *Bull. Cancer* **1996**, 83, 609; c) B. Savas, G. Arslan, T. Gelen, G. Karpuzoglu, C. Ozkaynak, *Anticancer Res.* **1999**, 19, 4413.
- [140] a) R. F. Ozols, T. C. Hamilton, E. Reed, M. C. Poirier, H. Masuda, G. Lai, R. C. Young in *Platinum and other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, **1988**; b) G. Chen, D. J. Waxman, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 47, 1079; c) D. Oudard, J. P. Marie, E. Pujade-Lauraine, *Bull. Cancer* **1996**, 83, 609; d) B. A. Janson, J. Brouwer, J. Reedijk, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 89, 197.
- [141] a) Y. Hishikawa, S. Abe, S. Kinugasa, H. Yoshimura, N. Monden, M. Igarashi, M. Tachibana, N. Nagasue, *Oncology* **1997**, 54, 342; b) T. Yasuno, T. Matsumura, T. Shikata, J. Inazawa, T. Sakabe, S. Tsuchida, T. Takahata, S. Miyairi, A. Naganuma, T. Sawada, *Anticancer Res.* **1999**, 19, 4049; c) D. Vandier, V. Calvez, L. Massade, A. Gouyette, L. Mickley, T. Fojo, O. Rixe, *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, 92, 642.
- [142] G. Bernhardt, R. Müller, R. Gust, H. Reile, C. Keller, T. Spruß, H. Schönenberger, *Arch. Pharm.* **1992**, 325, 93.
- [143] a) G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, 74, 443; b) G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, 82, 70.
- [144] a) J. Sedlak, R. H. Lindsay, *Anal. Biochem.* **1968**, 25, 192; b) J.-L. Moretti, M. D. Cordobes, A. Starzec, V. de Beco, J. Vergote, F. Benazzouz, B. Boissier, H. Cohen, N. Safi, S. Piperno-Neumann, J.-C. Kouyoumdjian, *J. Nucl. Med.* **1998**, 39, 1214.
- [145] T. Spruß, G. Bernhardt, E. Schickaneder, H. Schönenberger, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1991**, 117, 35.

- [146] a) C. N. Sternberg, A. Yagoda, H. I. Scher, R. C. Watson, N. Geller, H. W. Herr, M. J. Morse, P. C. Sogani, E. D. Vaughan, N. Bander, *Cancer* **1989**, 64, 2448; b) P. J. Loehrer, P. Elson, J. P. Kuebler, E. D. Crawford, I. Tannock, D. Raghavan, R. Stuart-Harris, D. Drump, L. H. Einhorn, *Prog. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1990**, 9, 132; c) B. J. Roth, *Semin. Oncol.* **1996**, 23, 633; d) Deutsche Gesellschaft für Urologie, *Urologe A* **1998**, 37, 440.
- [147] C. Bokemeyer, J. T. Hartmann, M. A. Kuczyk, M. C. Truss, C. Kollmannsberger, J. Beyer, U. Jonas, L. Kanz, *World J. Urol.* **1998**, 16, 155.
- [148] C. C. Ribgy, L. M. Franks, *Br. J. Cancer* **1970**, 24, 746.
- [149] R. C. Krieg, S. Fickweiler, O. S. Wolfbeis, R. Knüchel, *Photochem. Photobiol.* **2000**, 72, 226.
- [150] a) H. van den Bergh, *Chem. Br.* **1986**, 22, 430; b) C. P. Lowdell, D. V. Ash, I. Driver, S. B. Brown, *Br. J. Cancer* **1993**, 67, 1398.
- [151] a) D. Jocham, R. Baumgartner, H. Stepp, E. Unsold, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1990**, 6, 183; b) C. Prinsze, L. C. Penning, T. M. Dubbelmann, J. VanSteveninck, *Cancer Res.* **1992**, 52, 117; c) J. G. Post, J. A. M. te Poele, J. J. Schuitmaker, F. A. Stewart, *Photochem. Photobiol.* **1996**, 63, 314.
- [152] M. Ochsner, *Drug Res.* **1997**, 47, 1185.
- [153] a) S. G. Bown, *Endoscopy* **1993**, 25, 683; b) A. M. R. Fisher, A. M. Murphy, C. J. Gomer, *Lasers Surg. Med.* **1995**, 17, 2.
- [154] a) E. Reddi, G. LoCastro, R. Biolo, G. Jori, *Br. J. Cancer* **1987**, 56, 597; b) E. Reddi, C. Zhou, R. Biolo, E. Menegaldo, G. Jori, *Br. J. Cancer* **1990**, 61, 407; c) E. Reddi, S. Cernuschi, R. Biolo, G. Jori, *Lasers Med. Sci.* **1990**, 5, 339.
- [155] W.-S. Chan, J. F. Marshall, R. Svensen, J. Bedwell, I. R. Hart, *Cancer Res.* **1990**, 50, 90.

- [156] A. Hajri, S. Wack, C. Meyer, M. K. Smith, C. Leberquier, M. Kedinger, M. Aprahamian, *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75, 140.
- [157] a) R. Hornung, M. K. Fehr, J. Monti-Frayne, R. B. Krasieva, B. J. Tromberg, M. W. Berns, Y. Tadir, *Photochem. Photobiol.* **1999**, 70, 624; b) R. Hornung, M. K. Fehr, H. Walt, P. Wyss, M. W. Berns, Y. Tadir, *Photochem. Photobiol.* **2000**, 72, 696.
- [158] R. W. Boyle, D. Dolphin, *Photochem. Photobiol.* **1996**, 64, 469.
- [159] J. Moan, K. Berg, *Photochem. Photobiol.* **1991**, 53, 549.
- [160] J. Seidl, Dissertation, Universität Regensburg, **2002**.
- [161] D. Métivier, B. Dallaporta, N. Zamzami, N. Larochette, S. A. Susin, I. Marzo, G. Kroemer, *Immunology Letters* **1998**, 61, 157.
- [162] P. B. Simpson, S. Mehota, G. D. Lange, J. T. Russel, *J. Biol. Chem.* **1997**, 514, 22654.
- [163] a) S. D. Bernal, H. M. Shapiro, L. B. Chen, *Int. J. Cancer*, 1982, 30, 219; b) B. C. Wilson, M. Olivo, G. Singh, *Photochem. Photobiol.* **1997**, 65, 166.
- [164] a) K. Woodburn, N. J. Vardaxis, S. A. Autry, *Photochem. Photobiol.* **1991**, 54, 725; b) D. Kessel, K. Woodburn, *Int. J. Biochem.* **1993**, 10, 1377; c) M. Geze, P. Morliere, J. C. Maziere, K. M. Smith, R. Santus, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1993**, 20, 23; d) M. W. Leach, R. J. Higgens, S. A. Autry, J. E. Boggan, K. M. Smith, *Photochem. Photobiol.* **1993**, 58, 653; e) I. J. MacDonald, T. J. Dougherty, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**, 5, 105.
- [165] a) D. Kessel in *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors* (Hrsg.: D. R. Doiron, C. J. Gomer), Alan R. Liss, Inc., New York, **1984**.
- [166] B. C. Wilson, M. Olivo, G. Singh, *Photochem. Photobiol.* **1997**, 65, 166.

- [167] a) J. M. Gaullier, M. Geze, R. Santus, T. Sae Melo, J. C. Maziere, M. Bazin, P. Morliere, L. Dubertret, *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62, 114; b) Z. Malik, M. Dishi, Y. Garini, *Photochem. Photobiol.* **1996**, 63, 608; c) S. Fickweiler, Dissertation, Universität Regensburg, **1997**.
- [168] a) S. Wood, J. A. Holroyd, S. B. Brown, *Photochem. Photobiol.* **1997**, 65, 397; b) D. J. Ball, S. Mayhew, S. R. Wood, J. Griffiths, D. I. Vernon, S. B. Brown, *Photochem. Photobiol.* **1999**, 69, 390.
- [169] J. Moan, K. Berg, A. Anholt, A. Madslien, *Int. J. Cancer* **1994**, 58, 865.
- [170] W. N. Leung, X. Sun, N. K. Mak, C. M. N. Yow, *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75, 406.
- [171] a) S. K. Mauldin, F. A. Richard, M. Plescia, S. D. Wyrick, A. Sancar, S. G. Chaney, *Anal. Biochem.* **1988**, 157, 129; b) R. E. Norman, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 3583; c) P. J. Bednarski, B. Truembach, N. A. Kratochwil, H. Schönenberger, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 4479; d) P. J. Bednarski, N. A. Kratochwil, M. A. Otto, *Drug Metabol. Dispos.* **1994**, 22, 419; e) P. J. Bednarski, *J. Inorg. Biochem.* **1995**, 60, 1; f) A. M. Otto, N. A. Kratochwil, H. Eggers, P. J. Bednarski, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1995**, 121, 31.
- [172] T. Ishikawa, F. Ali-Osman, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 20116.
- [173] a) H. Reile, G. Bernhardt, M. Koch, H. Schönenberger, M. Hollstein, F. Lux, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1992**, 30, 113; b) F. Lux, M. Hollstein, H. Reile, G. Bernhardt, H. Schönenberger, *Biol. Trace Elem. Res.* **1996**, 53, 113.
- [174] a) S. A. Shellard, L. K. Hosking, B. T. Hill, *Cancer Res.* **1991**, 51, 4557; b) S. W. Johnson, R. P. Perez, A. K. Godwin, A. T. Yeung, L. M. Handel, R. F. Ozols, T. C. Hamilton, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 47, 689.
- [175] S. A. Shellard, A. M. J. Fichtinger-Schepman, J. S. Lazo, B. T. Hill, *Anticancer Drugs* **1993**, 4, 491.

- [176] M. W. J. Sark, H. Timmer-Bosscha, C. Meijer, D. R. A. Uges, W. J. Sluiter, W. H. M. Peters, N. H. Mulder, E. G. E. Devries, *Br. J. Cancer* **1995**, 71, 684.
- [177] a) M. F. Pera, F. Friedlos, J. Mills, J. J. Roberts, *Cancer Res.* **1987**, 47, 6810; b) P. Bedford, A. M. J. Fichtinger-Schepman, S. A. Shellard, M. C. Walker, J. R. W. Masters, B. T. Hill, *Cancer Res.* **1988**, 3019; c) B. T. Hill, K. J. Scanlon, J. Hansson, A. Harstrick, M. F. Pera, A. M. J. Fichtinger-Schepman, S. A. Shellard, *Eur. J. Cancer* **1994**, 30, 832.
- [178] a) A. L. Pinto, S. J. Lippard, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 780, 167; b) A. Pasini, F. Zunino, *Angew. Chemie* **1987**, 99, 632.
- [179] a) E. Reed, S. H. Yuspa, L. A. Zwelling, R. F. Ozols, M. C. Poirier, *J. Clin. Invest.* **1986**, 77, 545; b) A. Eastman, N. Schulte, *Biochem.* **1988**, 27, 4730; c) N. Sheibani, M. M. Jennerwein, A. Eastman, *Biochem.* **1989**, 28, 3120; d) R. J. Parker, A. Eastman, F. Bostick-Bruton, E. Reed, *J. Clin. Invest.* **1991**, 87, 772.
- [180] a) M. C. Walker, C. N. Parris, J. R. W. Masters, *J. Natl. Cancer Inst.* **1987**, 79, 213; b) J. R. W. Masters, E. J. Osborne, M. C. Walker, C. N. Parris, *Int. J. Cancer* **1993**, 53, 340; c) M. F. Pera, B. Köberle, J. R. W. Masters, *Br. J. Cancer* **1995**, 71, 904.
- [181] B. Köberle, K. A. Grimaldi, A. Sunters, J. A. Hartley, L. R. Kelland, J. R. W. Masters, *Int. J. Cancer* **1997**, 70, 551.
- [182] a) S. Karren, R.-M. Szeimies, A. Ebert, S. Fickweiler, C. Abels, W. Bäumler, M. Landthaler, *Lasers in Medical Science* **1997**, 12, 307; b) R.-M. Szeimies, R. Hein, W. Bäumler, A. Heine, M. Landthaler, *Acta Derm. Venerol.* **1994**, 74, 117.
- [183] E. Holler in *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy* (Hrsg.: B. K. Keppler), VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Toronto, **1993**.

- [184] a) H. Sinn, H. Schrenk, E. Friedrich, U. Schulling, W. Maier-Borst, *Nucl. Med. Biol.* **1990**, 17, 819; b) M. R. Hamblin, J. L. Miller, I. Rizvi, B. Ortel, E. V. Maytin, T. Hasan, *Cancer Res.* **2001**, 61, 7155.

9 Kapitel

Dank

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei

der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie e.V. für ein zweijähriges Promotionsstipendium und allen Kollegen und Mitarbeitern der Lehrstühle für ihre stete Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Herrn **Prof. Dr. F. Hofstädter** (Institut für Pathologie) und Herrn **Prof. Dr. A. Buschauer** (Institut für Pharmazeutische Chemie II) für die Möglichkeit, an ihren Lehrstühlen zu arbeiten.

Frau **Prof. Dr. R. Knüchel-Clarke** (Institut für Pathologie) für ihre umfassende und engagierte Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für zahlreiche wertvolle Anregungen.

Herrn **PD Dr. G. Bernhardt** (Institut für Pharmazeutische Chemie II) für viele wertvolle Ratschläge und Diskussionen, sein ständiges Engagement sowie die stets offene Kritik.

Herrn **Dr. R. C. Krieg** (Institut für Pathologie) für die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie und in die Durchflusszytometrie und für zahlreiche anregende Diskussionen rund um die photodynamische Tumortherapie.

Herrn **Dr. K.-C. Bart** (Institut für Anorganische Chemie) für das Bereitstellen der Porphyrin-Platin(II)-Komplexe, für zahlreiche Diskussionen und Ratschläge rund um die Porphyrin-Platin(II)-Chemie.

Frau **S. Dietrich** und Frau **R. Kromas** (Institut für Pathologie) für ihre qualifizierten und engagierten Hilfestellungen bei den Sphäroidversuchen sowie Frau **S. Bollwein** (Institut für Pharmazeutische Chemie II) für die zuverlässige Unterstützung und ihre Mitarbeit bei der Durchführung der Zellversuche.

Herrn **Dr. K.-C. Bart**, Herrn **Dr. N. Gruber**, Herrn **F. Hausmann** und **Frau B. Treitinger** (Institut für Anorganische Chemie) für den kollegialen Austausch in der PDT-Arbeitsgruppe.

Besonders möchte ich meinen Kollegen aus den Arbeitskreisen, Andrea, Georg, Jochen, Julia, Martina, Matthias, Michael, Monika, Peter und Sabine, für ihre Freundschaft danken.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern, meinen Schwestern und meiner Oma, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich in all den Jahren stets unterstützten.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Freundin Lucia.

