

Aus der
Orthopädischen Universitätsklinik mit Poliklinik Tübingen

**5-Aminolävulinsäure-vermittelte Photodynamische
Therapie verstärkt die Wirksamkeit von Doxorubicin bei
Ewing-Sarkomen in vitro**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Marocco, Lea

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professorin Dr. D. Alexander-Friedrich

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Ebinger

Tag der Disputation: 30.03.2026

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
Einheitenverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Ewing-Sarkome	7
1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie	7
1.1.2 Klinische Darstellung und Diagnostik	9
1.1.3 Therapie, Prognose und Nachsorge	11
1.2 Doxorubicin	14
1.3 Photodynamische Therapie	17
1.3.1 Mechanismen der Photodynamischen Therapie	17
1.3.2 Photosensibilisator 5-Aminolävulinsäure	20
1.3.3 Kombination von PDT und DOX	22
1.4 Das IlluminOss-Stabilisationssystem	23
1.4.1 Verfahren und Anwendungsbereiche	23
1.5 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Zelllinien und Kultivierung	28
2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze	32
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	33
2.1.4 Geräte	34
2.1.5 Lösungen, Chemikalien und Farbstoffe	36
2.1.6 Software	38
2.2 Methoden	39
2.2.1 Zellkulturverfahren	39
2.2.2 PDT-Exposition mit 5-Aminolävulinsäure	41
2.2.3 Doxorubicin-Behandlung	42

2.2.4	Kombinierte Behandlung mit DOX und 5-ALA-PDT	43
2.2.5	MTS-Assay	44
2.2.6	ROS-Assay	44
2.2.7	Rasterkraftmikroskopie	45
2.2.8	Statistische Auswertung	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Beurteilung der Lebensfähigkeit (MTS Assay)	56
3.1.1	DOX reduziert die zelluläre Lebensfähigkeit	56
3.1.2	5-ALA-PDT reduziert die zelluläre Lebensfähigkeit	59
3.1.3	DOX mit 5-ALA-PDT steigert die Zellsterblichkeit	63
3.2	Beurteilung der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	66
3.2.1	DOX und 5-ALA-PDT induzieren zelluläre ROS-Bildung	66
3.3	Rasterkraftmikroskopie	70
3.3.1	AFM-Ergebnisse der Zelllinie RD-ES	70
3.3.2	AFM-Ergebnisse der Zelllinie A-673	72
3.3.3	AFM-Ergebnisse der Zelllinie TC-71	74
3.3.4	AFM-Ergebnisse der Zelllinie MSC	76
4	Diskussion	78
4.1	Vitalitätsbestimmung	78
4.2	Reaktive Sauerstoffspezies	80
4.3	Rasterkraftmikroskopie	82
4.4	Einsatz der Photodynamischen Therapie	84
4.5	Limitationen der Arbeit	85
4.6	Schlussfolgerung aus der Arbeit	86
5	Zusammenfassung	87
6	Literaturverzeichnis	89
7	Erklärung zum Eigenanteil	100
8	Veröffentlichungen	101
9	Danksagung	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekülstruktur von Doxorubicin (DOX)	16
Abbildung 2: Schematische Darstellung des PDT-Mechanismus.....	19
Abbildung 3: Molekülstruktur von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA).....	21
Abbildung 4: IlluminOss-Osteosynthesystem	25
Abbildung 5: Zelllinie RD-ES	28
Abbildung 6: Zelllinie A-673.....	29
Abbildung 7: Zelllinie TC-71	30
Abbildung 8: Zelllinie MSC	31
Abbildung 9: IlluminOss-Lichtbox mit Lichtquellenanschluss	42
Abbildung 10: AFM-Apparatur Übersichtsaufnahme	47
Abbildung 11: AFM-Messkopf (A) mit Nahaufnahme der Cantilever-Halterung (B) und schematischer Darstellung des Cantilever (C)	48
Abbildung 12: RD-ES AFM-Aufnahme ohne und mit Cantilever	51
Abbildung 13: Schematische Darstellung einer Kraft-Distanz-Kurve im AFM- Kontaktmodus	53
Abbildung 14: MTS-Ergebnisse der Ewing-Sarkom-Zelllinien nach DOX- Inkubation.....	57
Abbildung 15: MTS-Ergebnisse der Ewing-Sarkom-Zelllinien nach 5-ALA-PDT	60
Abbildung 16: MTS-Ergebnisse der Ewing-Sarkom-Zelllinien nach verschiedenen Behandlungsansätzen.....	64
Abbildung 17: ROS-Ergebnisse der Ewing-Sarkom-Zelllinien nach verschiedenen Behandlungsansätzen.....	67
Abbildung 18: Box-Plot-Diagramm der Elastizität von RD-ES-Zellen nach verschiedenen Behandlungsansätzen.....	71
Abbildung 19: Box-Plot-Diagramm der Elastizität von A-673-Zellen nach verschiedenen Behandlungsansätzen.....	73
Abbildung 20: Box-Plot-Diagramm der Elastizität von TC-71-Zellen nach verschiedenen Behandlungsansätzen.....	75
Abbildung 21: Box-Plot-Diagramm der Elastizität von MSC-Zellen nach verschiedenen Behandlungsansätzen.....	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung aller Zellkulturmedien und Zusätze	32
Tabelle 2: Auflistung aller Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 3: Auflistung aller verwendeten Geräte	34
Tabelle 4: Auflistung des verwendeten Zytostatikums und Photosensibilisators	36
Tabelle 5: Auflistung aller Lösungen, Chemikalien, Farbstoffe und Kits	37
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Software	38
Tabelle 7: Einstellungen des Spektroskopie-Bedienfeldes zur Kalibrierung	49
Tabelle 8: P-Werte der MTS-Ergebnisse nach DOX-Inkubation.....	57
Tabelle 9: P-Werte der MTS-Ergebnisse nach 5-ALA-PDT.....	60

Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
Abb.	Abbildung
Arb. unit	Arbitrary unit (Willkürliche Einheit)
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Corp.	Corporation
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DOX	Doxorubicin
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution
Dr.	Doktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	Ewing-Sarkom
Et al.	Et alia (und andere)
ETS	Erythroblast Transformation Specific
FBS	Fetal bovine serum (Fetales Kälberserum)
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
FDA	U.S. Food and Drug Administration (Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten)
GlutaMAX™-I	Dipeptid aus L-Alanin und L-Glutamin

H ₂ O	Wasser
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
Inc.	Incorporated
Kap.	Kapitel
LDH	Laktatdehydrogenase
LED	Light-emitting diode
L-Glut	L-Glutamin
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
MW	Mittelwert
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PDT	Photodynamische Therapie
PNET	Primitiv neuroektodermaler Tumor
P/S	Penicillin-Streptomycin
PS	Photosensitizer (Photosensibilisator)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
Rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
R0-Resektion	Kein Nachweis von malignen Zellen im Resektionsrand des histologischen Präparates bei Tumorentfernungen
Tab.	Tabelle

Einheitenverzeichnis

SI-Einheiten, SI-Präfixe und zum Gebrauch mit dem SI zugelassene Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celcius
c	Zenti-
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde(n)
J	Joule
l	Liter
m	Meter
m	Milli-
min	Minute(n)
mol	Mol
μ	Mikro-
n	Nano-
Pa	Pascal
s	Sekunde(n)
U	Unit

1 Einleitung

1.1 Ewing-Sarkome

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

James R. Ewing (1866-1943), renommierter New Yorker Krebsforscher und Pathologe, beschrieb 1921 erstmals eine Tumorentität, die sich durch das aggressive Wachstum vor allem in Knochen- und Weichteilgewebe von Kindern und jungen Erwachsenen auszeichnet und fortan seinen Namen tragen sollte (Cripe, 2011). Ewing-Sarkome (ES), darunter auch maligne Primitive neuroektodermale Tumoren (PNETs), zählen zu den zweithäufigsten malignen Knochentumoren im Kindes- und Jugendalter und gehen mit einer bis heute ernüchternden Prognose einher (Dirksen, 2022). Frühe Metastasierung bei gleichzeitig später und unspezifischer Symptomatik führt dazu, dass bei 20-30% der meist jungen Erkrankten bei Diagnosestellung bereits Tumorzellen vorzugsweise in der Lunge oder das Skelettsystem fernmetastasiert sind (Le Deley et al., 2010, Delattre et al., 1994).

Die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr wird auf ca. 3/1.000.000 Kinder und Jugendliche geschätzt und macht damit etwa 2% aller Krebserkrankungen in dieser Altersgruppe aus (Esiashvili et al., 2008). Hierbei liegt das Prädilektionsalter in der zweiten Lebensdekade mit einem Median bei ca. 15 Jahren. Mit einem Geschlechterverhältnis von 1,5:1 erkranken Jungen häufiger als Mädchen (Parkin et al., 1993). Des Weiteren ist eine ethnische Präferenz zu verzeichnen, wobei vor allem Angehörige der kaukasischen Bevölkerung betroffen sind (Ozaki, 2015). Dieses gehäufte Auftreten wird auf eine genetische Prädisposition zurückgeführt, bei der das Vorhandensein bestimmter Motive in der Promotorregion von zellulären Wachstums- und Proliferationskaskaden eine neoplastische Entartung begünstigt (Grunewald et al., 2015).

Der Großteil der ES betrifft knöcherne Strukturen, wobei davon abgesehen ein kleinerer Teil als reine Weichgewebesarkome auftritt. Diese entstehen vor allem im höheren Erwachsenenalter, sind aber bezüglich der Therapiekonzepte und Prognose mit den Knochensarkomen im Kindesalter vergleichbar.

Wie bei den meisten primären Knochentumoren ist die Ätiologie der ES nicht hinreichend geklärt. Auch Risikofaktoren, die zur Entstehung des malignen Tumors beitragen, sind bislang nicht eindeutig identifiziert. Der aktuelle Forschungsstand geht von einem sporadischen Auftreten aus, bei dem weder familiäre Häufungen auftreten noch ES mit tumorprädisponierenden Syndromen assoziiert werden (Gargallo et al., 2020). Vergleichbar mit anderen Tumorentitäten scheint ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ES und dem erhöhten Alter der Eltern zu bestehen (Johnson et al., 2009).

Als Ursprungszelle werden u. a. mesenchymale Stammzellen (MSCs) oder neuroektodermale Stammzellen diskutiert (Ross et al., 2013). Auch das histologische Bild ist nicht eindeutig differenzierbar, wobei sich vor allem kleine runde Zellen mit runden Kernkörperchen und wenig Zytoplasma abbilden (Ozaki, 2015). Als Gemeinsamkeit aller Tumortypen steht jedoch die hochgradige Malignität im Vordergrund, weshalb ES im Rahmen der histopathologischen Klassifikation stets als G3-Tumoren eingestuft werden (Dirksen, 2022). Im Gegensatz zu Zellen in gutartigen Tumoren dringen, vereinfacht gesagt, maligne Zellen in das umliegende Gewebe ein und können sich auch auf andere Teile des Körpers ausbreiten, was zu metastasierenden Krebserkrankungen führen kann (Boutry et al., 2022, Aktipis et al., 2015).

Erkenntnisse über das genetische Profil von ES werden bereits seit Jahrzehnten gesammelt und bieten Grundlagen für neue therapeutische Ansätze in der Forschung. Typische Chromosomenveränderungen verleihen hierbei einem Gen auf Chromosom 22 den Namen des Ewing-Sarkom-Gens (EWS-FLI1) (Giovannini et al., 1994). Während das EWS-FLI1-Gen im Gesunden für ein Bindungsprotein für Ribonukleinsäure (RNA) codiert, fusioniert es bei der Erkrankung mit einer Domäne eines Erythroblast Transformation Specific Transkriptionsfaktors, kurz ETS, der Desoxyribonukleinsäure (DNA) bindet und in Zellproliferation und Tumorgenese involviert ist. Es handelt sich hierbei um eine Translokation, die kombiniert mit Chromosom 11 (t(11;22)(q24;q12)-Translokation) pathognomisch für ES ist (Turc-Carel et al., 1988) und in 85% der ES auftritt (Sorensen et al., 1994). Andere Translokationstypen sind bekannt,

haben aber aufgrund ihrer Seltenheit und fehlender prognostischer Bedeutung kaum klinische Relevanz (Le Deley et al., 2010).

Das Auftreten von ES im Rahmen von Tumorprädispositionssyndromen ist zwar wie die Mutationen innerhalb der Sarkome möglich, jedoch selten (Grobner et al., 2018, Randall et al., 2010).

1.1.2 Klinische Darstellung und Diagnostik

Knochtumore können sich in ihrem klinischen Bild so unspezifisch darstellen, dass dadurch die Diagnosestellung verzögert wird. Oft bleiben Tumoren inapparent wegen geringer Beschwerden. Im Vordergrund stehen eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes sowie lokale Anzeichen wie Schmerzen, Schwellung und Bewegungseinschränkungen bis hin zu pathologischen Frakturen (Widhe and Widhe, 2000). Nach ausführlicher Anamnese über das Auftreten der Symptomatik und Erhebung von Vorerkrankungen sowie Familienanamnese liefert eine Bildgebung und Biopsie i. d. R. die zur Diagnose notwendigen Befunde. Hierbei spielt u. a. die Lokalisationsverteilung eine zentrale Rolle, die für die Tumorentitäten oft typisch ist. ES können zwar an Knochen oder Weichteilen jeder Körperstelle entstehen, häufen sich jedoch in erster Linie diaphysär in den langen Röhrenknochen, gefolgt von Lokalisationen an den Rippen oder dem Beckengürtel (Ozaki, 2015). Auch die Altersverteilung kann Erkenntnisse über die vorliegende Tumorart liefern. Während das Osteosarkom, der häufigste maligne Knochtumor, einen bimodalen Altersgipfel aufweist und neben dem Kindesalter vor allem im Erwachsenenalter auftritt (Mirabello et al., 2009), sind beim ES vorwiegend Kinder und junge Erwachsene betroffen.

Lokale Symptome wie Schmerzen und Schwellung treten vor allem in bereits fortgeschrittenen Stadien auf und gehen oft mit einem erhöhten Risiko für pathologische Frakturen aufgrund mechanischer Belastung der osteolytisch geschwächten Knochen einher. Dabei kann der Schmerz belastungsabhängig sein oder auch in der Nacht imponieren. Zudem können ausgeprägte Raumforderungen gesundes Gewebe verdrängen und so Komplikationen wie die Kompression von Blutgefäßen oder Nerven verursachen und in Gelenknähe

zusätzlich zu Bewegungseinschränkungen führen. Nicht selten kann es zu Fehlinterpretationen kommen, bei denen die Symptome vor allem im Kindesalter als Wachstumsschmerzen oder Sportverletzungen fehlgedeutet werden.

Unspezifischer, aber nicht weniger von Bedeutung sind Veränderungen im Allgemeinbefinden. B-Symptomatik wie Gewichtsverlust, Nachtschweiß oder Fieber deutet auf ein malignes, disseminiertes Geschehen hin und erschwert beim ES u. a. die Abgrenzung zur Osteomyelitis (Bacci et al., 2006). Des Weiteren müssen differentialdiagnostisch maligne Lymphome, das eosinophile Granulom, ein Osteosarkom oder Neuroblastom ausgeschlossen werden, was i. d. R. über immunhistochemische und molekulare Parameter möglich ist. Besteht der Verdacht auf eine maligne Tumorerkrankung, sollte die diagnostische Abklärung nach aktuellen Leitlinien in einem spezialisierten Zentrum zur optimalen Versorgung erfolgen (Dirksen, 2022). Zu den wichtigsten Maßnahmen zählen hierbei Laboruntersuchungen sowie bildgebende Verfahren, klassischerweise eine Röntgenuntersuchung, MRT und CT zur Beurteilung von Größe, Ausdehnung und Lagebeziehungen des Primärtumors zu Nachbarstrukturen. Eine Ganzkörperbildgebung ist vor allem im Rahmen einer Abklärung möglicher Metastasen von Bedeutung. MRT-Aufnahmen können aufgrund des erhöhten Weichteilkontrastes für die Resektionsplanung und für Verlaufskontrollen essentiell sein (Bernstein et al., 2006). ES imponieren hierbei häufig als osteolytische Raumforderungen, die das umgebene Weichgewebe infiltrieren (Ozaki, 2015).

Die Diagnosesicherung kann über die Entnahme einer Gewebeprobe im Rahmen einer offenen Biopsie oder Stanzbiopsie erfolgen. Histologische Verfahren ermöglichen eine Abgrenzung von anderen Tumorentitäten, wodurch eine zielgerichtete Therapie eingeleitet werden kann. Die Abgrenzung zu anderen rundzelligen Sarkomen erfolgt neben der typisch positiven PAS-Reaktion und dem Nachweis von CD-99-Oberflächenantigenen auf immunhistochemischer und molekulargenetischer Grundlage (Desai and Jambhekar, 2010). Zusätzliche Untersuchungen bezüglich des Staging oder Knochenmarkspunktionen können anschließend erforderlich sein.

1.1.3 Therapie, Prognose und Nachsorge

Bleibt ein ES unbehandelt, so beläuft sich die 5-Jahres-Überlebensrate auf lediglich 5-10% (Rosen et al., 1974). Daher verlangt das aggressive Wachstumsverhalten von ES eine ebenso radikale Behandlungsstrategie. Diese umfasst eine an die individuelle Situation der Erkrankten adaptierte Chemotherapie, Bestrahlung und chirurgische Intervention. Alleinige Lokal- oder Chemotherapien sind aufgrund der schlechten Ergebnisse obsolet (Gartrell and Rodriguez-Galindo, 2021). Wichtige prognostische Faktoren sind hierbei Lokalisation und Ausdehnung sowie der Metastasierungsstatus des Tumors. Hinweise auf systemische Schäden wie eine erhöhte Serumaktivität von LDH und Ferritin, Fieber oder eine Blutarmut verschlechtern die Prognose (Balamuth and Womer, 2010). Zusätzlich wirkt sich die Mutation von p53 und p16 negativ auf die Prognose aus, da apoptotische Defekte die Wahrscheinlichkeit für Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung erhöhen (Huang et al., 2005, Hientz et al., 2017).

Es ist zu beachten, dass ohne adäquate Therapie die Mehrzahl der Erkrankten Metastasen entwickelt (Dirksen, 2022). Die Möglichkeit zur vollständigen Resektion im Gesunden (R0-Resektion) nach Enneking (Enneking and Dunham, 1978) spielt also eine prognostisch bedeutsame Rolle, wenn es um die Lebensqualität und Lebenserwartung der Betroffenen geht. Sollte eine R0-Resektion technisch nicht umsetzbar sein, ist aufgrund der hohen Gefahr der Tumordissemination von einer chirurgischen Entfernung abzusehen. Das Tumoransprechen auf die Polychemotherapie entscheidet besonders bei großen, kompliziert lokalisierten Tumoren maßgeblich, ob eine R0-Resektion durchführbar ist.

Es gilt bei der Therapie so radikal wie nötig zu handeln, während gleichzeitig das Risiko therapiebegleitender Nebenwirkungen und Spätkomplikationen so niedrig wie möglich gehalten werden soll. Dies ist vor allem in Betracht des oft frühen Erkrankungsalters von großer Bedeutung. Neoadjuvante Therapiemaßnahmen wie die Polychemotherapie sind vor allem aufgrund häufig okkult Metastasen indiziert. Auch die Bestrahlung (36-55 Gy) kann, wenn das Krankheitsbild es erfordert, präoperativ erfolgen und trägt zur lokalen Kontrolle bei (Ozaki, 2015).

Es ist zu beachten, dass der Einsatz der Strahlentherapie bei Kindern aufgrund gravierender Spätfolgen wie Zweitmalignomen und Wachstumsstörungen in den letzten Jahrzehnten an Bedeutung verloren hat (Balamuth and Womer, 2010).

Pathologische Frakturen deuten im Rahmen der Tumorerkrankung auf ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium hin und sind mit aufwändigeren therapeutischen Maßnahmen verbunden. Es kann notwendig sein, eine extraartikuläre Resektion oder gar eine Amputation vorzunehmen. Diese muss auch erwogen werden, wenn eine R0-Resektion nicht anders umzusetzen scheint.

Aufgrund der häufig metastasierten Befunde ist neben der lokoregionären Behandlung wie Bestrahlung und Operation eine systemische Therapie in Form von Chemotherapeutika unerlässlich. Diese steht als Induktionstherapie am Anfang der Behandlung und zielt darauf ab, die Eradikation von Mikrometastasen zu erreichen, die operative Versorgung zu vereinfachen und Kenntnisse über die Chemosensibilität für postoperative Behandlungen zu gewinnen (Potratz et al., 2012). Hierfür hat sich ein Kombinationsschema von Zytostatika durchgesetzt, die das Zellwachstum der Tumorzellen am effektivsten hemmen. Unter dem Akronym „VDC/IE“ finden die Medikamente Vincristin, Doxorubicin (DOX), Cyclophosphamid, Ifosfamid und Etoposid ihre Anwendung gegen ES (Brennan et al., 2022). Durch verkürzte, zweiwöchige Pausen zwischen den Chemotherapiezyklen konnte bereits eine erfolgreiche Dosissteigerung bei vergleichbarer Toxizität erreicht werden, was sich positiv auf das tumorfreie Überleben bei lokalisierten Malignomen auswirkt (Womer et al., 2012). Auf DOX, ein Anthrazyklin, das sich bereits wirksam gegen häufige Tumorentitäten wie Brust-, Blasen- oder Lungenkrebs erwiesen hat (Rivankar, 2014), wird in Kapitel 1.2 noch einmal näher eingegangen. DOX wird in dieser Arbeit aufgrund seiner hohen Wirksamkeit, aber limitierten Einsatzmöglichkeiten in Kombination mit anderen Therapiemodalitäten, auf seine Effektivität gegen ES-Zelllinien untersucht.

Rezidive stellen aufgrund aktuell fehlender klarer Behandlungsempfehlungen eine besondere Herausforderung dar. Nichtsdestotrotz erleiden etwa ein Drittel

der Erkrankten mit ES einen Krankheitsrückfall, bei dem entweder eine intensiviertere Therapie oder palliative Versorgung in Betracht gezogen wird (Leavey and Collier, 2008). Im Vordergrund stehen hierbei Verbesserung der Lebenserwartung und Erhalt der Lebensqualität. Um Rezidive und Spätfolgen im Rahmen der therapeutischen Maßnahmen frühzeitig zu erkennen und versorgen zu können, ist eine engmaschige Nachsorge unerlässlich. Diese ist vor allem in den ersten Jahren nach der Diagnosestellung aufgrund des erhöhten Rezidivrisikos indiziert und kann im Verlauf angepasst werden (Heinemann et al., 2021). Im Zuge der Nachsorge in Form von bildgebenden Verfahren zur Tumorsuche müssen des Weiteren vor allem diejenigen Organe überwacht werden, die durch den Einsatz von Strahlentherapie und zytotoxischen Medikamenten wie DOX unter Umständen Schaden erleiden.

Insgesamt beläuft sich bei Wiederauftreten des Tumors die 2-Jahres-Überlebensrate auf etwa 20% (Dirksen, 2022), weswegen in diesem Fall eine palliative Versorgung mit Erhalt der Lebensqualität und Schmerzreduktion im Vordergrund steht.

Gute Chancen auf Heilung bestehen vor allem, wenn keine Metastasen nachweisbar sind. Ein multimodaler Therapieansatz hat sich über die Jahre durchgesetzt und stützt sich auf etliche Forschungsarbeiten und klinische Beobachtungen (Bacci et al., 1989, Wilkins et al., 1986, Gartrell and Rodriguez-Galindo, 2021). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Erkrankten mit lokoregionaler Erkrankung bei etwa 80% durch die Kombination von systemischer und lokaler Therapie (Subbiah et al., 2009, Womer et al., 2012). Voraussetzung stellt hierbei eine vollständige Resektion sowie Ansprechen auf die Chemotherapie dar. Wird die Diagnose erst nach der Metastasierung des Tumors gestellt, was bei ca. 34% der Erkrankten der Fall ist (Ozaki, 2015), beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate unter 30% (Gaspar et al., 2015). Zu differenzieren ist hierbei, dass Fernmetastasen mit einer signifikant schlechteren Prognose einhergehen (Ladenstein et al., 2010), wobei therapeutisch eine Bestrahlung lokalthérapeutischen Maßnahmen vorzuziehen ist (Haeusler et al., 2010).

Bei Rezidiven der Erkrankung sinkt die Überlebensrate ähnlich drastisch (Stahl et al., 2011).

Der ungedeckte Bedarf an neuen therapeutischen Strategien wird vor allem anhand der schlechten Prognose der meist jungen Erkrankten deutlich. Dieser Kernpunkt repräsentiert sowohl Intention als auch Motivation dieser Arbeit.

1.2 Doxorubicin

Wie bereits in Kap. 1.1.3 angedeutet, spielt Doxorubicin (DOX) seit dem Einsatz von Zytostatika im Behandlungsschema bei ES eine zentrale Rolle als Teil der Polychemotherapie. Es handelt sich hierbei um ein 1968 aus dem Mikroorganismus *Streptomyces peucetius* var. *caesius* erstmals isolierten, heutzutage chemisch hergestellten Anthrazyklin (Arcamone et al., 1969). Obwohl sich die Anwendung von DOX bei vielen Tumorentitäten bewährt hat, ist der Einsatz aufgrund des gefährlichen Nebenwirkungsprofils limitiert und nur unter engmaschigem Monitoring möglich. Schwere Schäden an Herz, Gehirn, Leber und Niere beschränken die Anwendung von DOX (Zhao et al., 2018, Tacar et al., 2013).

DOX, auch als Adriamycin oder Hydroxyldaunorubicin bekannt, übt zytotoxische Wirkung über verschiedene Mechanismen aus, die noch nicht vollständig geklärt sind. Diese umfassen u. a. DNA-Interkalation, Hemmung der Topoisomerase-II, Produktion von freien Radikalen und oxidativem Stress sowie Zerstörung der Zellmembran über Sphingolipid-Manipulation (Nicoletto and Ofner, 2022). DOX gelangt über einfache Diffusion in das Zytoplasma der Zellen und wird von dort über eine proteasomale Untereinheit in den Zellkern transportiert. Das sich dort befindliche Erbgut in Form der DNA wird durch DOX gebunden, ohne dass sich dabei Struktur oder Sequenz der Desoxynukleotide verändern. Dieser Vorgang der Einlagerung wird als Interkalation bezeichnet und stört physiologische Vorgänge wie z. B. die Nukleinsäuresynthese. Möglich ist das durch die planare Molekülstruktur (siehe Abb. 1). Des Weiteren induziert DOX durch die Hemmung des Enzyms Topoisomerase-II Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA. Die Wirkung von DOX ist bei erhöhter Expression von Topoisomerase-II gesteigert, weil DOX durch die kovalente Bindung die DNA-Replikation verhindert. Vor allem entartete Zellen, die eine starke Proliferation aufweisen, reagieren daher

besonders sensibel gegenüber der Behandlung mit DOX (Minotti et al., 2004, Tewey et al., 1984). Kommt es zusätzlich zu einer DOX-vermittelten p53-Aktivierung, resultieren beschriebene Vorgänge in der Apoptose der Zellen. Weitere Schäden im Rahmen der DOX-Applikation entstehen durch oxidativen Stress, der durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt wird, die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c, erhöhte Produktion von Ceramiden oder Induktion von Serin-Theronin-Proteasen wie Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)-Kinasen (Granados-Principal et al., 2010, Varela-Lopez et al., 2019). Inwiefern diese und noch mehr Mechanismen zum Zelltod beitragen, ist Bestandteil aktueller Forschungsansätze.

Erstmals wurden die zellwachstumshemmenden Eigenschaften von DOX von Di Marco et al. 1969 nachgewiesen, die dessen hohes therapeutisches Potenzial im Einsatz gegen verschiedene Tumorentitäten entdeckten (Cassinelli, 2016). Seither hat sich DOX als fester Bestandteil in der Therapie von Karzinomen, Sarkomen und hämatologischen Malignitäten etabliert (Wang et al., 1971, Granados-Principal et al., 2010). Während die Anwendung des Zytostatikums auch als Monochemotherapie denkbar ist, hat sich eine Kombination mit anderen Arzneimitteln in vielen Behandlungsstrategien durchgesetzt, um durch die daraus resultierende Dosisreduzierung von DOX schwere Nebenwirkungen zu verringern.

Die Applikation von DOX erfolgt ausschließlich intravenös oder intravesikal und ist aufgrund der systemisch toxischen Wirkung unter engmaschiger Überwachung zu verabreichen. Bei einer mittleren Halbwertszeit von 48 h weist das typische Nebenwirkungsprofil Übelkeit, Erbrechen, Alopezie sowie Entzündungsreaktionen, Blutbildungsstörungen und Hauterkrankungen auf. Schwerwiegende chronische Komplikationen wie Herzerkrankungen oder eine Knochenmarksdepression müssen beim Einsatz von Anthrazyklinen in Kauf genommen werden. Hierbei steht das Auftreten der Kardiotoxizität in direkter Relation zur Höhe der kumulativen Gesamtdosis und kann im Rahmen der Anthrazyklin-induzierten Kardiomyopathie letal verlaufen (Leonard et al., 2009). Als postmitotische Zellen reagieren Kardiomyozyten mit einer apoptotischen Antwort anfälliger auf DOX als andere Zelltypen (Bernuzzi et al., 2009).

Ferner kommt es zu Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln. Bei bestehender Leber- oder Nierenfunktionsstörung muss eine Dosisanpassung vorgenommen werden. Alter, Übergewicht und Immunsuppression sind bei der Verwertung und Metabolisation von DOX von Bedeutung und sollten bei der individuellen Dosisanpassung beachtet werden. Absolute Kontraindikationen stellen das Erreichen der maximalen Kumulativdosis, eine Blutungsneigung, schwere Erkrankungen von Leber, Herz oder Knochenmark sowie Schwangerschaft und Stillzeit dar.

Im Rahmen des ES-Behandlungsregimes ist wie bei anderen Tumorentitäten eine kombinierte Chemotherapie der Monotherapie von DOX vorzuziehen, wobei DOX als Anthrazyklin neben Alkylantien und Topoisomerase-Inhibitoren zu den wichtigsten Substanzgruppen zählt (Zollner et al., 2021). Ziel ist es, höhere Ansprechraten bei niedrigeren Konzentrationen zu erreichen. Dies soll im Rahmen dieser Arbeit mit einer kombinierten Therapie von DOX und 5-Aminolävulinsäure-basierte Photodynamischen Therapie untersucht werden.

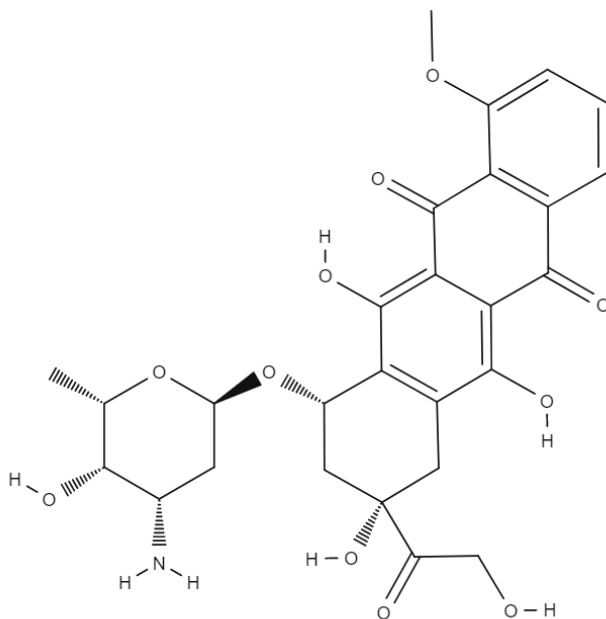


Abbildung 1: Molekülstruktur von Doxorubicin (DOX)

Doxorubicin (DOX) besteht aus einem hydrophoben Anthracyclin-Gerüst, in dem vier aromatische Ringe mit hydrophilen funktionellen Gruppen (wie Hydroxygruppen und Aminogruppen) in Verbindung stehen und so ein planares, amphiphiles Molekül bilden.

Eigene Darstellung.

1.3 Photodynamische Therapie

1.3.1 *Mechanismen der Photodynamischen Therapie*

Während die wirksamen Eigenschaften von Licht bereits im alten Ägypten in Form von Heliotherapie bekannt waren, etabliert sich die Photodynamische Therapie (PDT) erst in den letzten Jahrzehnten als Therapieansatz bei der Behandlung von Tumoren (Abdel-Kader, 2016). Licht in Form der PDT zur Behandlung von Erkrankungen zu nutzen gelang Arnold Rikli, was im Jahre 1999 zur Freigabe des ersten PDT-Medikaments durch die FDA führte. Seither findet die PDT viele Anwendungsbereiche und stellt als minimalinvasives und nebenwirkungsarmes Behandlungsverfahren einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Krebstherapie dar. Dabei schließt die kosteneffiziente und einfach anwendbare Behandlung eine Kombination mit konventionellen Therapieansätzen nicht aus.

Um die Energie von harmlosem, sichtbarem Licht gegen Zellen anwenden zu können, muss ein sogenannter Photosensibilisator (PS) anwesend sein. Die Applikation kann lokal, topisch oder systemisch je nach Zielgewebe erfolgen. Der sonst ungefährliche PS kann bei Anregung durch eine spezifische Wellenlänge über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) Zellschäden anrichten (Castano et al., 2004). Die hochreaktiven Biomoleküle entstehen im Rahmen von Oxidationsreaktionen. Die dadurch geschädigten Zellkompartimente umfassen bspw. die Zellmembran und zelluläre Proteine, die nach Angriff der ROS den Zelltod induzieren können (Kessel and Oleinick, 2018).

Es werden zwei Reaktionsmechanismen unterschieden, die bei der Lichtabsorption und Bildung von instabilen ROS und damit der Zellschädigung durch PS eine Rolle spielen. Zunächst absorbiert der PS Photonen aus einer Lichtquelle und geht so in einen angeregten Singulett-Zustand über, der nur wenige Nanosekunden andauert. Sofern diese Energie nicht über interne Umwandlung in Wärme oder durch das Aussenden von Licht in Form von Fluoreszenz verloren geht, wandelt sich der PS in einen relativ stabilen, Mikrosekunden andauernden Triplett-Zustand um. Aus diesem Zustand entsteht entweder wieder der Singulett-Zustand oder der PS reagiert mit umgebenen

Molekülen auf zwei verschiedene Weisen. So reagiert zum einen der angeregte PS direkt mit einem zellulären Substrat (Lipid, Protein oder Nukleinsäure) und erzeugt durch Protonen- oder Elektronentransfer hochreaktive Radikale, die in der Gegenwart von Sauerstoff zu ROS, bspw. Superoxidanion-Radikale, Hydroxyl-Radikale oder Wasserstoffperoxid weiterreagieren (Sai et al., 2021). Diese Typ-I-Reaktion ermöglicht dem angeregten PS wiederum mit molekularem Sauerstoff zu reagieren, was zur Bildung von energiereichem Singulett-Sauerstoff im Rahmen der Typ-II-Reaktion führt (Sai et al., 2021). In welchem Verhältnis und wie effektiv die zwei Reaktionstypen ablaufen, hängt maßgeblich von Faktoren wie Art, Konzentration und Akkumulationsort des PS, dem Sauerstoffgehalt und Art und Dauer der Bestrahlung ab (Dougherty et al., 1998).

Es wurde früh gezeigt, dass ein Großteil der PS nur zu geringen Anteilen DNA-Schäden verursacht und damit ein geringes Risiko für Mutationen und Karzinogenese mit sich bringt (Moan, 1986). Je nach Zellkompartiment und Lichtintensität können PS Apoptose oder Zellnekrose induzieren (Dougherty et al., 1998). Bei hohen Lichtintensitäten ist die Freisetzung von Kalzium, Zytokinen und toxischen Stoffwechselnebenprodukten nicht mehr mit physiologischen Vorgängen der Zellen vereinbar und resultiert in Nekrose der betroffenen sowie benachbarten Zellen (Allison and Moghissi, 2013, Dougherty et al., 1998). Ohne immunologische Reaktion oder die Freisetzung toxischer Chemikalien kommt es zum programmierten Zelltod, der vor allem bei niedrigeren Lichtintensitäten eingeleitet wird (Huang et al., 2008).

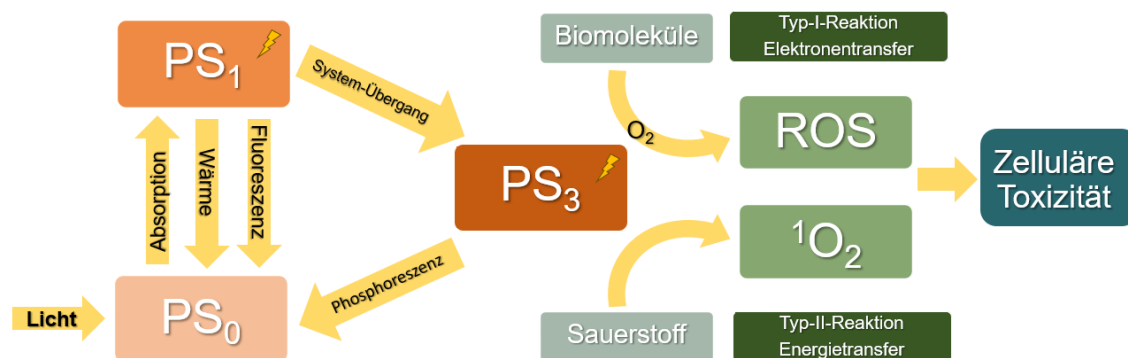


Abbildung 2: Schematische Darstellung des PDT-Mechanismus

Dargestellt sind Typ-I- und Typ-II-Reaktion im Rahmen der Photodynamischen Therapie (PDT). Absorbiert der Photosensibilisator (PS) Licht einer spezifischen Wellenlänge, geht er in einen angeregten Singulett-Zustand über. Aus diesem Zustand kann ein Triplett-Zustand hervorgehen, aus dem der PS auf zwei Arten reagieren kann. Typ-I-Reaktion: Der PS bildet durch die Reaktion mit Biomolekülen durch die Übertragung von Wasserstoffatomen (Elektronentransfer) Radikale, die mit molekularem Sauerstoff reagieren und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugen. Typ-II-Reaktion: Der PS reagiert direkt mit Sauerstoff durch Energietransfer, sodass Singulett-Sauerstoff entsteht. Beide Reaktionen resultieren in zellulärer Toxizität.

PS₀: Photosensibilisator im Grundzustand

PS₁: Photosensibilisator im angeregten Singulett-Zustand

PS₃: Photosensibilisator im angeregten Triplett-Zustand

ROS: reaktive Sauerstoffspezies

¹O₂: Singulett-Sauerstoff

Eigene Darstellung, modifiziert nach Calixto et al. (Calixto et al., 2016).

1.3.2 Photosensibilisator 5-Aminolävulinsäure

Angeregt durch Licht kann ein PS über verschiedene Reaktionen zur Bildung von instabilen ROS beitragen, die im Optimalfall zur selektiven Destruktion von Tumorzellen führen, ohne dabei gesunde Zellen zu schädigen.

Unter den verschiedenen Gruppen der Photosensibilisatoren (PS) gelten nach aktuellem Forschungsstand die Porphyrine zu den am ausführlichsten untersuchten und damit genutzten PS. Porphyrine spielen in vielen physiologischen Prozessen eine entscheidende Rolle und bilden das Grundgerüst für lebenswichtige Proteine. Zu den biologischen Vertretern auf Porphyrinbasis zählen u. a. Hämine, Cytochrome oder Vitamin B12. Sie ermöglichen damit Speicherung und Transport von Sauerstoff in kernhaltigen Zellen im menschlichen Körper (Kennedy et al., 1990).

In dieser Arbeit wird 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) als PS eingesetzt. Physiologisch wird 5-ALA mitochondrial aus Glycin und Succinyl-Coenzym A gebildet und fungiert als Zwischenprodukt in der Hämsynthese (Dougherty et al., 1998). 5-ALA kann abgesehen von der körpereigenen Produktion sowohl chemisch als auch durch Bakterien hergestellt werden und verursacht deutlich weniger unerwünschte phototoxische Nebenwirkungen als vorangegangene PS (Kenan et al., 2020). Hierbei spielt vor allem die systemische Phototoxizität eine entscheidende Rolle, die sich bei den verschiedenen PS stark unterscheidet.

Die Zulassung durch die FDA erlangte 5-ALA im Jahr 1999 in den USA zur Behandlung der Aktinischen Keratose, die häufigste Krebsvorstufe der Haut. Auch in Europa ist der Einsatz von 5-ALA durch die Europäische Arzneimittel-Agentur aufgrund der niedrigen Toxizität und schnellen Metabolisierung genehmigt (Dalton et al., 2002). Genau betrachtet fungiert 5-ALA lediglich als Prodrug und als PS, der in diesem Fall Protoporphyrin IX (PpIX) ist. Da es sich bei 5-ALA jedoch um das applizierte Substrat handelt, wird im Folgenden von 5-ALA als PS ausgegangen.

Die Verstoffwechslung und Akkumulation von 5-ALA zu PpIX findet aufgrund veränderter Enzymaktivitäten in Tumorzellen schneller statt und führt zu einer bevorzugten Anreicherung des phototoxischen Mittels in den Zielzellen (Peng et

al., 2001, Frank et al., 2007). Die selektive Aufnahme in pathologischem Gewebe wird zusätzlich durch physikalische Bedingungen, verstärkte Vaskularisation sowie tumorassoziierte Phagozytose beeinflusst (Freitas, 1990). Die Bildung von ROS und damit die Schädigung der Zelle konzentriert sich bei Bestrahlung somit auf Tumorzellen und kann zur gezielten Therapie eingesetzt werden (Kim et al., 2011, Sai et al., 2021). Des Weiteren kann das bei Lichtabsorption fluoreszierende 5-ALA, wie die meisten PS, für sogenannte Photodynamische Diagnostik (PDD) eingesetzt werden. Wie andere PS der zweiten Generation weist auch 5-ALA ein Absorptionsspektrum im langwelligen Bereich auf.

Diese Eigenschaften von 5-ALA werden bereits in der Anwendung zur intraoperativen Tumorresektionsrandbestimmung in Form eines fluoreszierenden Kontrastmittels genutzt (PDD) oder als direktes Mittel zur Zerstörung von Zellen (PDT) (Kenan et al., 2020, Colditz et al., 2012). Der Kenntnisstand über die Verwendung von 5-ALA in der Behandlung von Sarkomen ist jedoch für die klinische Nutzung nicht ausreichend und soll in dieser Arbeit erweitert werden.

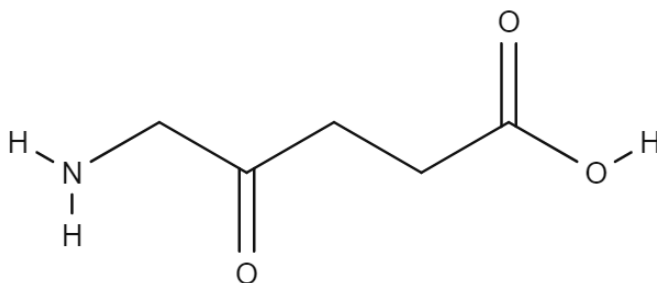


Abbildung 3: Molekülstruktur von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)

5-Aminolävulinsäure (5-ALA) besteht aus einem Fünf-Kohlenstoff-Gerüst, an dessen Enden je eine saure Carboxylgruppe sowie eine Aminogruppe hängt und somit hydrophile als auch hydrophobe Eigenschaften aufweist.

Eigene Darstellung.

1.3.3 Kombination von PDT und DOX

Während die aktuelle Studienlage zur Anwendung von 5-ALA-basierter PDT kombiniert mit Chemotherapeutika wie DOX gering ist, gibt es aufgrund der vielversprechenden Anwendungsmöglichkeiten der PDT etliche Forschungsansätze. Das Prinzip, Chemotherapeutika in Kombination mit PDT in der Behandlung von Tumoren einzusetzen, wurde bereits 1988 erfolgreich von Nahabedian et al. an Mäusen getestet (Nahabedian et al., 1988). Der untersuchte Brustkrebs in Mausversuchen zeigte sich schwach empfindlich gegenüber PDT und DOX, konnte jedoch durch die kombinierte Behandlung signifikant in seinem Wachstum gehemmt werden. Inwiefern es zu synergistischen Effekten in der Tumorbehandlung kommt, hängt hierbei stark von der Tumorentität, dem Chemotherapeutikum und der Wahl des PS ab und kann keineswegs als allgemeingültig angenommen werden. Die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Therapieansätze stützt sich auf den Forschungsstand, dass eine grundsätzliche Wirksamkeit gegenüber ES gegeben ist (Brennan et al., 2022, Sun et al., 2016).

Es konnte bereits in mehreren In-vitro-Studien therapeutische Vorteile in der Kombination der Therapiemodalitäten (DOX und PDT) bei verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden (Cacaccio et al., 2022, Aniogo et al., 2017, Diez et al., 2012). Während sich synergistische Effekte von DOX und PDT in der Behandlung von Brustkrebs-Zellen (Yousefi Sadeghloo et al., 2020, Kurokawa and Matsui, 2021), Lungenkrebs-Zellen (Cacaccio et al., 2022, Han et al., 2022) oder hämatologischen Malignitäten (Sando et al., 2020) zeigten, stehen aktuell nur wenig Informationen in Bezug auf Ewing-Sarkome zur Verfügung.

1.4 Das IlluminOss-Stabilisationssystem

1.4.1 Verfahren und Anwendungsbereiche

Neben einem PS und Sauerstoff stellt Licht die dritte Hauptkomponente der PDT dar. Hierfür bieten sich unterschiedliche Lichtquellen an, wobei hauptsächlich Laser oder Light Emitting Diodes (LED) zur Anwendung kommen. Die Wirksamkeit der PDT hängt in erster Linie nicht von der Art der Lichtquelle ab, sondern der Fähigkeit, Licht in einem für den PS erforderlichen Lichtspektrum zu emittieren. Im Falle dieser Dissertation wird durch Bestrahlung mit blauem Licht die maximale Absorption für 5-ALA erreicht (Montcel et al., 2013).

Die in dieser Arbeit verwendete Lichtquelle findet bereits unter einem anderen Verwendungszweck klinische Anwendung. Es handelt sich hierbei um die Lichtbox der Firma „IlluminOss Medical, Inc.“ (East Providence, USA), die im Rahmen eines Stabilisationssystems für die Behandlung von traumatischen, pathologischen und osteoporotischen Frakturen seit 2010 eingesetzt wird. Alle aufgeführten Informationen zu dem System beziehen sich auf die Herstellerangaben der Firma IlluminOss Medical, Inc.

Die Verwendung eines IlluminOss-Implantats erlaubt die Stabilisierung von Frakturen, die durch lichtinduzierte Aushärtung des Implantats minimalinvasiv versorgt werden können. Die Osteosynthese wird über einen flexiblen Dacron-Ballonkatheter im Markraum des Knochens vorbereitet, indem der Ballon bis zur Kortikalis dilatiert und anschließend an ein Lichtkabel angeschlossen wird. Das sich im Ballon befindliche flüssige Monomer passt sich an die Form des betroffenen Knochens an und reagiert erst durch die Licht-Aktivierung zu einem stabilen, biokompatiblen Polymer. Hierfür generiert die Lichtbox extern mit einer Wellenlänge von 436 nm blaues Licht, das bei einer Energie von etwa $3,8 \text{ J/cm}^2$ zur Aushärtung des Implantats führt. Die im Ballon adaptierten Lichtleiter sorgen für die gleichmäßige Bestrahlung des Kunststoffes. Die Dauer der Belichtung variiert von 300 bis zu 2000 Sekunden und hängt hierbei von der Ballongröße ab, dessen Lage über die in die Ballonwand integrierten röntgendichten Grenzmarkierungen kontrolliert werden kann.

Je nach klinischem Befund kann sowohl die Ballongröße als auch die Dauer der Lichtzufuhr individuell angepasst werden. Eine adjuvante Bestrahlung ist nach der Implantation grundsätzlich möglich.

Im Vergleich zu anderen Osteosynthese-Verfahren wie bspw. einem konventionellen Marknagel, gewährleistet das IlluminOss-Stabilisierungssystem neben der Längsstabilität zusätzliche Rotationsstabilität bei gleichzeitig minimalinvasiver Methodik. Dank interner Stabilisierung erfordert das Verfahren keine zusätzlichen Verriegelungen im Markraum und bei der Nachbehandlung kann auf einen Gips verzichtet werden. Komplikationen umfassen, analog zu anderen Techniken, Infektions- und Emboliegefahr sowie die Aufspaltung ausgedünnter Kortikalisareale. Aufgrund der erschwerten Entfernungsbedingungen des Implantats fokussiert sich der Einsatz auf instabile Osteolysen und pathologische Frakturen an nicht-tragenden Röhrenknochen der oberen Extremität. Auch bei der Behandlung von Beckenfrakturen bietet das System einen sicheren und wirksamen Ansatz für eine zügige Heilung und funktionelle Herstellung der betroffenen Knochen im Verlauf von 12 Monaten (Gausepohl et al., 2017). Des Weiteren ist die Kombination mit anderen Frakturfixationssystemen zur Behandlung von Frakturen der unteren Extremität zumindest in den USA zugelassen, während die EU derzeit die Anwendung auf Knochen beschränkt, die keinen nennenswerten Gewichtskräften ausgesetzt sind. Aktuelle klinische Fallstudien zeigen jedoch das Potenzial des Verfahrens in einem ausgeweiteten Anwendungsbereich, wobei vor allem die Weichteilgewebe-schonende Technik vielversprechende postoperative Ergebnisse liefert (Madi et al., 2023, Zyskowski et al., 2019). Inwiefern sich die Langzeitresultate des photodynamischen Systems zur Knochenstabilisierung von konventionellen Methoden unterscheiden, muss in weiteren Studien eruiert werden.

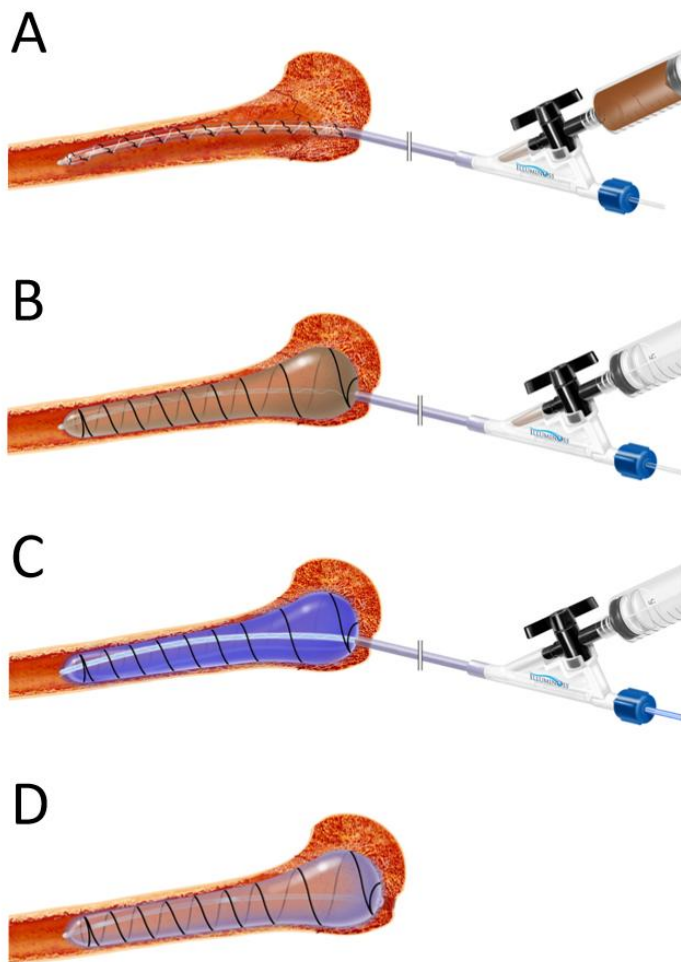


Abbildung 4: IlluminOss-Osteosynthesesystem

Mit freundlicher Genehmigung von IlluminOss Medical, Inc. (<http://www.illuminoss.com>)

A: Ein flexibler Ballonkatheter wird durch einen kleinen, vom Chirurgen im Knochen angelegten, Kanal eingeführt und über dem Knochenbruch positioniert.

B: Ein spezieller flüssiger Klebstoff, der bei Blaulicht-Exposition aushärtet, wird mit einer Spritze in den Ballonkatheter eingebracht. Während sich der Ballon mit der Flüssigkeit füllt, dehnt er sich aus und passt sich der Form des Knocheninnenraums an.

C: Beim Einschalten der Lichtquelle wird das blaue Licht in den Ballon geleitet, das zum Aushärten des flüssigen Klebers führt.

D: Der ausgehärtete Klebstoff verhält sich wie ein Gips auf der Innenseite des Knochens, der den Knochen in Form eines Implantats stützt, festigt und die Heilung der Fraktur ermöglicht.

Schematische Darstellung.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ewing-Sarkome (ES) fordern ein aggressives Therapiekonzept, was für Erkrankte Einbußen in ihrer Lebensqualität bedeutet. Trotz intensiver Forschung kann aktuell durch konventionelle Ansätze wie chirurgische Resektion, Bestrahlung oder Chemotherapeutika keine zufriedenstellende Prognose erreicht werden. Es gilt daher neue, nebenwirkungsarme Therapiemodalitäten zu entwickeln, welche bestehende Behandlungen wirksamer machen. Gleichzeitig gewinnt die Photodynamische Therapie (PDT) als wirksame und gleichzeitig nebenwirkungsarme Behandlungsmöglichkeit u. a. in der Tumorthherapie an Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, Auswirkungen der 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)-vermittelten PDT auf ES-Zelllinien sowohl als Einzelbehandlung als auch in Kombination mit Doxorubicin (DOX) zu untersuchen. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass die 5-ALA-vermittelte PDT die Wirksamkeit von DOX in ES-Zelllinien potenziert. Diese Hypothese stützt sich auf den aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand über multimodale Therapieansätze bei Tumorbehandlung, insbesondere in Bezug auf die Kombination aus Chemotherapeutika und PDT. Für ES ist der Einsatz der PDT aufgrund von fehlenden Informationen zur Wirksamkeit und Nebenwirkungen zurzeit nicht in klinischer Anwendung.

Als wichtigster prognostischer Faktor spielt das Metastasierungsstadium eine entscheidende Rolle in der Therapie von ES. Eine tumorfreie Resektion stellt hierbei ein zentrales Element der Behandlung dar und wird durch Größe, Ausdehnung und Lage des Tumors oft erschwert. Eine neoadjuvante Chemotherapie kann diesem Problem aufgrund von Resistenzen und Dosislimitierungen nur begrenzt entgegenwirken. Als nebenwirkungsarme Therapieergänzung könnte die PDT hingegen während der operativen Tumorentfernung zur sicheren Destruktion von Tumorzellen beitragen und letztlich Lebensqualität und -erwartung von Erkrankten verbessern. Diese praxisbezogene Überlegung, eine ergänzende Therapiemodalität wie die PDT mit der standardisierten Resektion verknüpfen zu können, soll Aufwand, Kosten und Nachteile für Erkrankte so gering wie möglich halten.

Im Fokus dieser In-vitro-Arbeit soll also nicht nur das grundsätzliche Potenzial der PDT im Einsatz gegen ES untersucht werden, sondern gleichzeitig die Durchführung der Experimente so kliniknah wie möglich erfolgen. Hierfür wird das bereits für chirurgische Zwecke entwickelte IlluminOss-Stabilisationssystem als PDT-Vorrichtung verwendet. In Kombination mit einem als Goldstandard verwendeten Zytostatikum (DOX) soll hervorgehen, dass ES sich zum einen grundsätzlich sensitiv gegenüber einer PDT verhalten und zum anderen dadurch Dosisreduzierungen von zytotoxischen Medikamenten wie DOX im Rahmen von neuen Therapiekonzepten zum Wohle der Erkrankten in Betracht gezogen werden können. Um sicherzustellen, dass hierbei ausschließlich die ES-Zelllinien selektiv Schaden nehmen, werden alle Experimente an mesenchymalen Stammzellen (MSCs) als Kontrollgruppe durchgeführt. Es gilt als Grundvoraussetzung, dass die untersuchten Therapiemöglichkeiten sich nicht negativ auf gesundes, umliegendes Gewebe auswirken. Die Auswahl der Methoden deckt die Testung der Lebensfähigkeit der ES-Zelllinien sowie die Messung gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Behandlung ab. In einem weiteren Experiment soll anhand von Elastizitätsmessungen am Rasterkraftmikroskop Veränderungen im Metastasierungspotenzial analysiert werden. Alle Experimente orientieren sich an der klinischen Nutzung des IlluminOss-Osteosynthese-Systems und sollen die Grundlage von In-vivo-Studien darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien und Kultivierung

Für alle Experimente wurden die humanen ES-Zelllinien RD-ES, A-673 sowie TC-71 verwendet. Als Kontrollgruppe dienten mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus dem Knochenmark eines gesunden Spenders. Die Isolierung und Kultivierung der MSCs wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen genehmigt (855/2021BO2, 14. Februar 2022).

2.1.1.1 Zelllinie RD-ES

Die Zelllinie RD-ES wurde von der CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Deutschland) bezogen und in RPMI-1640 mit L-Glutamin (Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) kultiviert, dem anteilig 15% (v/v) fetales Kälberserum (FCS) sowie 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (P/S) zugesetzt wurde. Ihren Ursprung haben die Zellen aus dem Primärtumor eines 19-jährigen kaukasischen Mannes, aus dessen Oberarmknochen 1984 ES-Zellen durch G. Marshall und M. Kirchen gewonnen wurden. Es handelt sich bei der Zelllinie um adhärenz Zellen, die einen Durchmesser von 20 bis 25 μm fassen und in losen Zellclustern als Monoschicht wachsen.

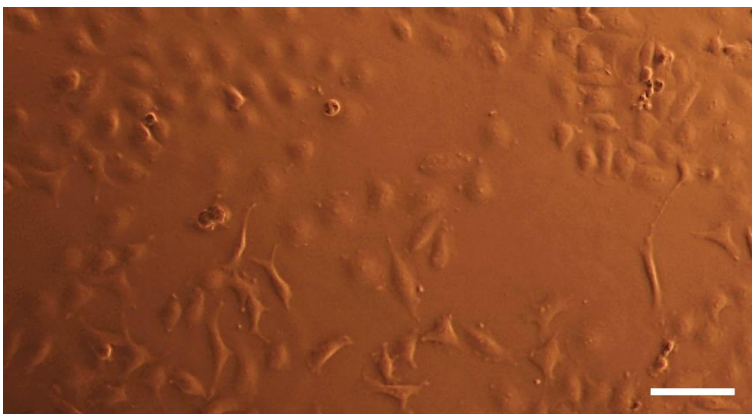


Abbildung 5: Zelllinie RD-ES

Lichtmikroskopisches Bild der Zelllinie RD-ES bei 10-facher Vergrößerung. Maßstabsleiste (weiß) entspricht 100 μm . Eigene Aufnahme.

2.1.1.2 Zelllinie A-673

Die Zelllinie A-673 wurde von der CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Deutschland) bezogen und in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit GlutaMAX™ 4,5g/l D-Glukose aufgezogen, mit dem Zusatz von anteilig 10% FCS und 1% P/S. Die erstmalige Kultivierung der Zelllinie erfolgte 1973 durch D. J. Giard nach der Zellentnahme aus einem als ES klassifizierten Tumor eines 15-jährigen Mädchens (Martinez-Ramirez et al., 2003). Es handelt sich bei der Zelllinie A-673 um adhärenente Zellen, die eine polygonale Morphologie aufweisen und als Monoschicht wachsen.

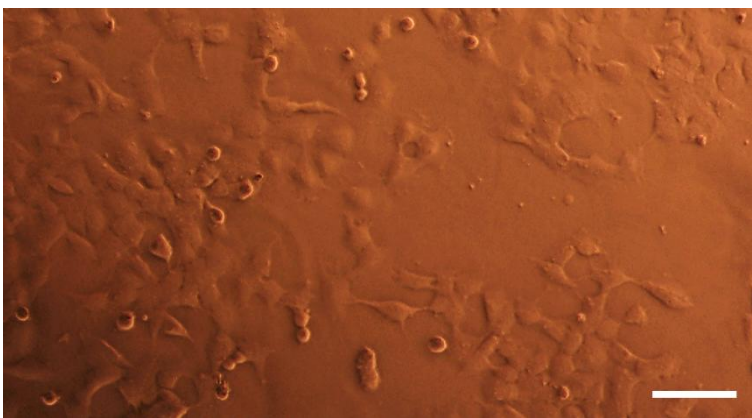


Abbildung 6: Zelllinie A-673

Lichtmikroskopisches Bild der Zelllinie A-673 bei 10-facher Vergrößerung. Maßstabsleiste (weiß) entspricht 100 µm. Eigene Aufnahme.

2.1.1.3 Zelllinie TC-71

Die Zelllinie TC-71 wurde vom Leibniz-Institut DSMZ (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Iscove's MDM mit L-Glutamin (Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) angereichert, mit anteilig 10% FCS und 1% P/S (Gibco, Life Technologies), wurde zur Kultivierung verwendet. Gewonnen wurde die Zelllinie im Rahmen einer Biopsie 1981 aus dem Tumor eines 22-jährigen Mannes mit metastasiertem ES mit Ursprung am Oberarmknochen. Es handelt sich um adhärente Zellen, die in einer Einzelzellschicht wachsen.

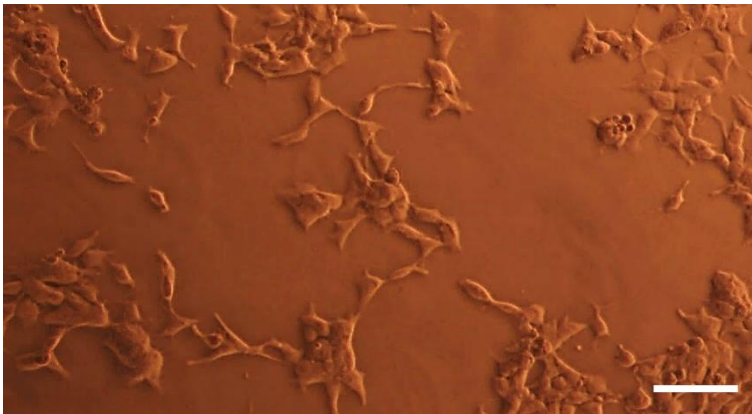


Abbildung 7: Zelllinie TC-71

Lichtmikroskopisches Bild der Zelllinie TC-71 bei 10-facher Vergrößerung. Maßstabsleiste (weiß) entspricht 100 μm . Eigene Aufnahme.

2.1.1.4 Zelllinie MSC

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) werden als Ursprungszellen für ES postuliert (Ross et al., 2013). Daher werden sie in dieser Arbeit als Kontrollgruppe für alle Experimente verwendet. Diese Zellen sind in der Lage, sich in eine Vielzahl von Zelltypen wie bspw. Knochenzellen, Knorpelzellen, Fettzellen und Muskelzellen zu differenzieren. Hierfür weisen sie eine charakteristische Morphologie auf, die sich durch eine längliche Form und faserige Ausläufer auszeichnet. Die spindelförmigen Zellen wachsen deutlich langsamer als die in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien.

Die MSCs wurden aus dem Knochenmark des Beckens und Femurs eines gesunden Spenders bezogen. Die Isolierung und Kultivierung der MSCs wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen genehmigt (855/2021BO2, 14. Februar 2022) und basierte methodisch auf bereits beschriebenen Verfahren (Battula et al., 2009, Riester, 2013). Als Nährmedium diente DMEM mit GlutaMAX™ mit 1g/l D-Glukose und Pyruvat (v/v), das zusätzlich mit anteilig 5% gefrorenem Frischplasma (GFP), 5% Thrombozytenkonzentrat (TK) und 1% P/S angereichert wurde.

Für die Experimente wurden MSCs nach dreimaligem Passagieren verwendet.

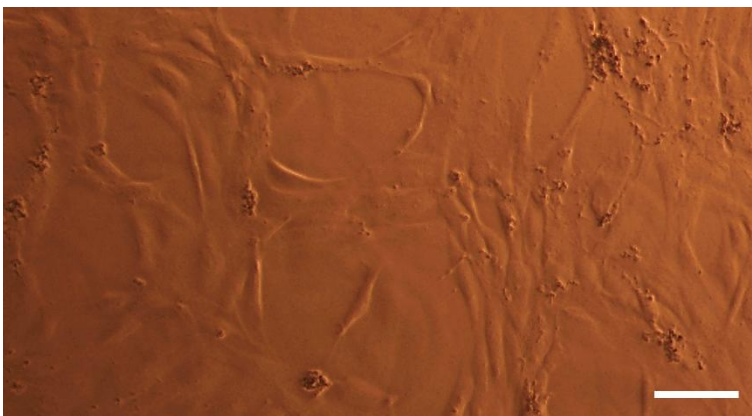


Abbildung 8: Zelllinie MSC

Lichtmikroskopisches Bild der Zelllinie MSC bei 10-facher Vergrößerung. Maßstabsleiste (weiß) entspricht 100 µm. Eigene Aufnahme.

2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 1: Auflistung aller Zellkulturmedien und Zusätze

Name	Bezeichnung	Referenznummer	Hersteller
Zellkulturmedium für MSC	DMEM(1x) + GlutaMAX™-I + 1g/l D-Glucose + Pyruvate	21885-025	Gibco Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Zellkulturmedium für RD-ES	RPMI 1640(1x) + GlutaMAX™-I	61870-010	Gibco Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Zellkulturmedium für A-673	DMEM(1x) + GlutaMAX™-I + 4,5 g/l D-Glucose	31966-021	Gibco Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Zellkulturmedium für TC-71	IMDM (1x) + GlutaMAX™-I + 25 mM HEPES	21980-032	Gibco Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Fetal Bovine Serum	FBS Superior	S0615	Biochrom, Berlin, Deutschland
P/S	Penicillin-Streptomycin	P4333	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin-EDTA	10X	T4174	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DPBS	DPBS (1x) Dulbecco`s Phosphate buffered Saline	14190-094	Gibco Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA

GFP	Gefrorenes Frischplasma	15900014	Blutbank, Universitätsklinik Tübingen, Tübingen, Deutschland
TK	Thrombozyten- konzentrat	15900011	Blutbank, Universitätsklinik Tübingen, Tübingen, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Auflistung aller Verbrauchsmaterialien

Name	Referenznummer	Hersteller
Zellkulturschalen 40	93040	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen 250 ml	658170	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96-Loch-Zellkulturplatten Flachboden	655180	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkultur Mikroplatten, 96 well, F-Boden, schwarz	655090	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15ml	188261	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
50ml	210261	Deutschland
Kryo-Röhrchen, 1.5 ml	72379004	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Nitrilhandschuhe	942206	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Pipettenspitzen		
10 µl	692150	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
100 µl	692066	
200 µl	692069	
1250 µl	790058	
Eppendorfgefäße,		
0.5 ml	0030124537	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
1.5 ml	0030120086	
2.0 ml	0030120094	
Serologische Pipetten		
5 ml	357543	Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
10 ml	357551	

2.1.4 Geräte

Tabelle 3: Auflistung aller verwendeten Geräte

Funktion	Bezeichnung/Artikelnummer	Hersteller
Mikroskop	Fluovert FS	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop	DM IRBE	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop	DMi8 automaed	Leica, Wetzlar, Deutschland
Atomic Force Microscopy (AFM)	Axio Observer Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland

Mikroplatten Lesegerät (ROS- Reader)	GloMAX Discover Microplate Reader GM3000	Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA
Mikroplatten Lesegerät (MTS- Reader)	EL 800	Bio-Tek, Winooski, Vermont, USA
Elektrische Pipette	Pipetus akku 9907200	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Einkanalpipette	Research Plus 3120000020, 3120000046, 3120000054, 3120000062	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer- Zählkammer	T=0,1 mm; 0,0025 mm ² 40441001	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland
Tischzentrifuge	5424R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexmischer	REAXtop 541-10000-00	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Kamera	Nikon D3100	Chiyoda, Tokio, Japan
Wasserbad	WB 22 8419 8998	Memmert, Schwabach, Deutschland

Sterilwerkbank	Sicherheitswerkbank BDK®SB II	BDK, Sonnenbühl- Genkingen, Deutschland
Gefrierschrank (- 20 °C)	LGex 3410 MediLine 9005382171059	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank (- 80 °C)	Tiefkühlschrank Bestell-Nr. 6483	GFL, Burgwedel, Deutschland
Kühlschrank (4 °C)	A2 Kühlschrank OBR 88012	Haier, Qingdao, China
Inkubator	Heracell™ VIOS 160i CO2-Inkubator	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Digital Lux Meter	Beleuchtungsmessgerät LX1010BS	Dr.meter, Newark, USA
IlluminOss- System	Photodynamisches System zur Stabilisierung von Knochen; Lichtquelle und Lichtleiter	IlluminOss Medical Inc., East Providence, RI, USA

2.1.5 Lösungen, Chemikalien und Farbstoffe

Tabelle 4: Auflistung des verwendeten Zytostatikums und Photosensibilisators

Inhibitor	Lösungsmittel	Artikelnummer	Hersteller
Doxorubicin	DMSO (5 mM)	S1208	Selleckchem, Houston, Texas, USA
5-Aminolävulinsäure- hydrochlorid	H ₂ O (50 mM)	A7793-10MG	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 5: Auflistung aller Lösungen, Chemikalien, Farbstoffe und Kits

Funktion	Artikelname	Artikelnummer	Hersteller
Vitalfarbstoff	Trypanblau-Lösung	T8154	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol	Ethanol absolut für Analysen	1.00983.2511	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MTS Assay	Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation (MTS) Assay	G3580	Promega, Mannheim, Deutschland
ROS Assay	DCFDA / H2DCFDA - Cellular ROS Assay Kit	ab113851	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
EDTA	Ethylendiamintetraessig- säure	8040.3	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid	C6295-50ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Leibovitz	L-15 Leibovitz Medium ohne L-Glutamin	12-700F	Merck KGaA, Darmstadt, Germany

2.1.6 Software

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Software

Programmname	Hersteller
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA
IBM SPSS Statistics 22	International Business Machines Corporation
AFM Software Version 5.0.86	Bruker Corporation, Billerica, USA
MTT-Analyse Programm Gen5 1.09	BioTek Instruments, Winooski, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturverfahren

2.2.1.1 Passagieren von Zellen

Bei den verwendeten ES-Zellen RD-ES, A-673, TC-71 sowie der Kontrollgruppe (MSC) handelt es sich um adhärenente Zellarten, die in zelllinienspezifischem Medium unter sterilen Bedingungen angezüchtet wurden.

Die Kultivierung fand in T75-Zellkulturflaschen bei einer Umgebungstemperatur von 37 °C bei 5% CO₂ statt. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das verbrauchte Medium mit Hilfe einer Stangenpipette entfernt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 1 x Trypsin-EDTA enzymatisch von den Zellkulturflaschen abgelöst. Diese Reaktion wurde mithilfe des Lichtmikroskops kontrolliert und nach fünfminütiger Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ durch Zugabe von Medium mit fetalem Kälberserum gestoppt. Die Zellsuspension wurde zum Passagieren in eine Zellkulturflasche mit der gewünschten Verdünnung überführt oder zur Bestimmung der Zellzahl weiterverwendet. Hierfür wurde die Zellsuspension in ein Falcon pipettiert, das sich zur Zentrifugation eignete.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Eine Methode zur Ermittlung der Zellzahl, um diese für Experimente verwenden zu können, stellt die direkte, mikroskopische Auszählung in einer Zählkammer dar. Zur Vorbereitung wurde hierfür die Zellsuspension 7 min lang bei 7 °C und 1500 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 1 ml Medium verdünnt und 100 µl einer 1:10 verdünnten Zellsuspension mit Trypanblau hergestellt, um beim Zählen nur lebende Zellen (also nichtgefärbte Zellen) zu berücksichtigen. 10 µl dieser Zellsuspension wurden zwischen ein Deckglas und eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen in den vier großen Quadranten unter dem Lichtmikroskop bei zehnfacher Vergrößerung gezählt. Die Anzahl der Zellen pro ml wurde wie folgt berechnet (1):

$$\text{Zellzahl} \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = X \div 4 \times 10^4 \times 10 \quad (1)$$

X = gezählte Zellen in allen vier großen Quadranten der Neubauer-Zählkammer

4 = Anzahl der ausgezählten Quadrate

10^4 = Kammerfaktor

10 = Verdünnungsfaktor

Die gezählten Zellen in den vier großen Quadranten der Neubauer Zählkammer (X) wurden zunächst durch die Anzahl der Quadrate (4) geteilt, um den Mittelwert zu erhalten. Dieser Wert wurde anschließend mit dem Kammerfaktor (10^4) multipliziert, der die Umrechnung auf ein Volumen von einem Milliliter ermöglicht. Schließlich wurde der Verdünnungsfaktor (10) berücksichtigt.

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren von Zellen ermöglicht ihre Verwendung zu einem späteren Zeitpunkt. Hierfür wurden die Zellen wie oben beschrieben gezählt und die Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen wurde 7 min lang bei 7 °C und 1500 rpm zentrifugiert. Das vom Überstand befreite Zellpellet wurde in 1 ml Gefriermedium (10 % DMSO und 90 % FCS) resuspendiert und die Zellen in ein Kryoröhrchen überführt. DMSO, also Dimethylsulfoxid, fungiert wie ein Gefrierschutz und verhindert die Bildung von Eiskristallen, die für die Zellen schädlich wären.

Stufenweise wurden die Zellen zunächst eine Stunde lang bei -20 °C aufbewahrt, anschließend über Nacht in einen Gefrierschrank bei -70 °C überführt und zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff bei -180 °C aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurde ein Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und bis zum Verflüssigen der Zellsuspension erwärmt. Um die zytotoxische Wirkung von DMSO aufzuheben, wurden 5 ml Kulturmedium hinzugefügt und die Suspension in ein 15-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellen wurden 7 min lang bei 7 °C und 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml zellinienspezifischem Medium resuspendiert. Zur Kultivierung der Zellen wurden diese anschließend eine Zellkulturflasche (T75) überführt, die mit dem entsprechenden Medium auf 15 ml Endvolumen aufgefüllt wurde. Zellen, die sich nicht angeheftet hatten, wurden am Folgetag mittels eines Mediumwechsels entfernt.

2.2.2 PDT-Exposition mit 5-Aminolävulinsäure

Für alle In-vitro-Experimente wurde 5-ALA als Photosensibilisator verwendet. Hierfür wurde eine Stammkonzentration von 50 mM angesetzt, in der pulverisiertes 5-ALA-Hydrochlorid in H₂O gelöst und bei -4 °C gelagert wurde.

In vorläufigen Testreihen wurden alle Zellreihen in 96-Well-Platten mit frischem Kulturmedium in verschiedenen Zelldichten ($0,3-1 \times 10^4$ Zellen/Well) ausgesät und 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. So wurde die optimale Aussaatdichte und Konfluenz für jede Zelllinie bestimmt. Für die schnell wachsenden ES-Zelllinien RD-ES und TC-71 ergab sich eine Zelldichte von $0,3 \times 10^4$ Zellen/Well, A-673 wurden mit einer Zelldichte von $0,6 \times 10^4$ Zellen/Well und MSCs mit $0,5 \times 10^4$ Zellen/Well ausgesät. Diesen wurde nach Inkubation über Nacht das Medium durch serumfreies Medium mit verschiedenen 5-ALA-Konzentrationen (0,1-0,35 mM) ersetzt. Die Bestrahlung der Zellen für einen vordefinierten Zeitraum von 600 s mit Licht erfolgte 4 h nach der Exposition und Inkubation mit 5-ALA. Zu diesem Zweck wurde das IlluminOss-System als Lichtquelle (siehe Kap. 1.4) verwendet. Im kontinuierlichen Ausgabemodus emittiert es blaues Licht mit einer Wellenlänge von 436 nm über einen Lichtleiter aus Polyethylen. Dieser wurde über ein Transmitterkabel an die Lichtquelle angeschlossen und kann über fluoridbeschichtete Fiberglasleiter das Licht über die Länge von 12 cm emittieren. Der in der klinischen Anwendung adaptierte Dacron-Ballon wurde für diesen Zweck entfernt und der Lichtleiter über eine eigens konstruierte Box unter den zu bestrahlenden Platten eingespannt. Diese wurde von innen mit Aluminium-Folie ausgekleidet, um das auf die Zellen treffende Licht zu maximieren. Mit einem Abstand von 5 cm zum Lichtleiter wurden die Zellen in schwarzen 96-Well-Platten gleichmäßig von unten beleuchtet. In Vorexperimenten konnte ausgeschlossen werden, dass in diesem Versuchsaufbau die Zellen allein durch die Bestrahlung ohne Zusatz des Photosensibilisators (5-ALA) in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt werden. Analog hierzu wurde sichergestellt, dass die Exposition der Zellen mit 5-ALA in den ausgewählten Konzentrationen (0,15 – 0,35 mM) ohne anschließende Bestrahlung messbare Effekte auf die Lebensfähigkeit hat.

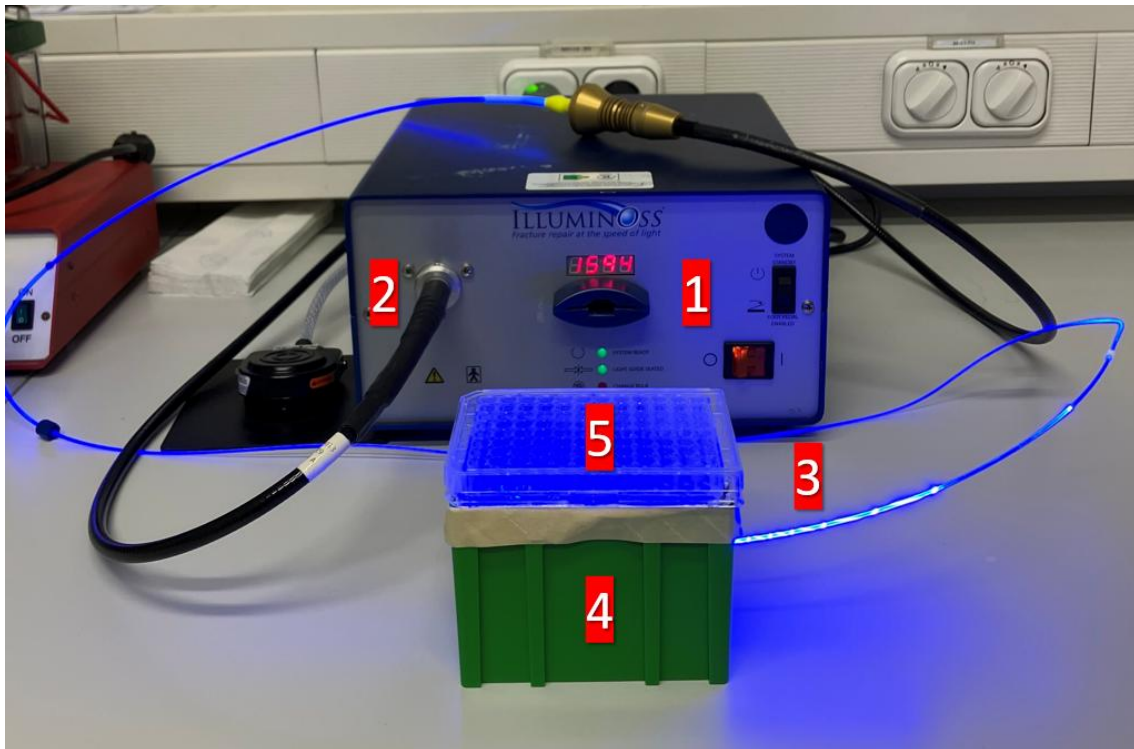


Abbildung 9: IlluminOss-Lichtbox mit Lichtquellenanschluss

Die Beleuchtung der Zellen erfolgt von unten mittels eines in einer reflektierenden Box fixierten Lichtleiters.

- 1: IlluminOss-Lichtbox als Lichtquelle
 - 2: Transmitterkabel als Verbindungsstück zwischen IlluminOss-Lichtbox und Lichtleiter
 - 3: Lichtleiter mit fluoridbeschichteter Fiberglasleiter
 - 4: Halteapparat für die 96-Well-Platte mit der Möglichkeit, den Lichtleiter unter der Platte einzuspannen. Die Innenwände sind mit lichtreflektierender Folie ausgekleidet. Eigene Konstruktion.
 - 5: 96-Well-Platte (hier zur besseren Darstellung in transparenter Ausführung)
- Eigene Aufnahme.

2.2.3 Doxorubicin-Behandlung

Das in dieser Arbeit verwendete Doxorubicin-Hydrochlorid (DOX HCL) ist als Goldstandard in der zytostatischen Therapie von ES etabliert. Zur Behandlung der Zellen wurde für alle In-vitro-Experimente eine Stammkonzentration von 50 mM angesetzt, in der DOX in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und bei -80 °C gelagert wurde. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit vom DMSO wurde die Bearbeitung der Zellen unter Ausschluss von Licht durchgeführt, um eine Beeinträchtigung der Substanzaktivität zu vermeiden. In Vorversuchen wurde

sichergestellt, dass DMSO als Lösungsmittel in den hier applizierten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Zellviabilität nimmt.

In vorläufigen Testreihen wurden alle Zellreihen in 96-Well-Platten mit frischem Kulturmedium in verschiedenen Zelldichten ($0,3-1 \times 10^4$ Zellen/Well) ausgesät und 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. So wurde die optimale Aussaatdichte und Konfluenz für jede Zelllinie bestimmt. Für die schnell wachsenden ES-Zelllinien RD-ES und TC-71 ergab sich eine Zelldichte von $0,3 \times 10^4$ Zellen/Well, A-673 wurden mit einer Zelldichte von $0,6 \times 10^4$ Zellen/Well und MSCs mit $0,5 \times 10^4$ Zellen/Well ausgesät. Für die Messungen mit dem AFM wurden größere Zellschalen (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) verwendet. Die hierfür gewählten Zelldichten betragen für die Zelllinie RD-ES 2×10^4 Zellen/Schale, für A-673 und TC-71 4×10^4 Zellen/Schale und für MSCs $2,5 \times 10^4$ Zellen/Schale.

Nach der Kultivierung der Zellen in 96-Well-Platten oder AFM-Schalen in frischem Medium über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Zellen verschiedenen DOX-Konzentrationen (10-100 nM) in zelllinienspezifischen Medien für 72 h ausgesetzt. Diese Inkubation erfolgte ebenfalls bei 37 °C und 5% CO₂.

2.2.4 Kombinierte Behandlung mit DOX und 5-ALA-PDT

Die Kombination der beiden Behandlungsansätze mit DOX und 5-ALA-basierter PDT gestaltete sich analog zu den einzelnen Anwendungsmethoden und ist in den jeweiligen Kap. 2.2.2 und 2.2.3 einsehbar.

Nach dem Aussäen der Zellen über Nacht wurden die Zellen zunächst für weitere 72 h mit 15 nM DOX inkubiert. Zur anschließenden Bestrahlung wurde das DOX-Medium entfernt und durch ein FCS-freies Medium mit verschiedenen 5-ALA-Konzentrationen (0,15-0,35 mM) ersetzt. Einer vierstündigen Inkubation im Dunkeln folgte die Bestrahlung der Zellen für je 600 Sekunden im Rahmen der PDT sowie das Überführen aller Zellen in ihr zellspezifisches Kulturmedium. Alle anschließenden Experimente wurden 24 h nach der Bestrahlung durchgeführt.

2.2.5 MTS-Assay

Zur Beurteilung der Lebensfähigkeit der Zellen wurde der „Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation (MTS) Assay“ verwendet. Die Vitalitätsanalyse erfolgte kolorimetrisch durch die mitochondriale Umwandlung von gelbem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium (MTS) in violette Formazan. Die Formazanmenge korreliert hierbei direkt mit dem Prozentsatz der lebensfähigen und stoffwechselaktiven Zellen und wird durch die Reaktion mit den Reduktionsäquivalenten NADPH und NADH gebildet (Mosmann, 1983). Wird die Absorption der Negativ-Kontrolle auf eine Vitalität von 100% gesetzt, kann die Lebensfähigkeit der behandelten Zellen entsprechend unter Berücksichtigung der Blanko-Werte berechnet werden. Es ist möglich, zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen zu differenzieren, jedoch kann durch diese Methode keine Quantifizierung von seneszenten Zellen vorgenommen werden.

Die Durchführung des MTS-Assays erfolgte nach Herstellerangaben und orientierte sich an der initial beschriebenen Methode von Cole und Carmichael et al. (Cole, 1986, Carmichael et al., 1987).

Nach der wie in 2.2.4 beschriebenen 5-ALA-basierten PDT-Exposition und der DOX-Behandlung wurden ES-Zellen und MSCs mit je 15 µl pro Well einer 2 mg/ml-Lösung der MTS-Reagenz in Medium versetzt und 90 min lang bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm mit einem EL800-Mikroplattenlesegerät (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland) gemessen.

2.2.6 ROS-Assay

Die Aktivität reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in metabolisch aktiven Zellen wurde mit dem „Cellular ROS Assay Kit“ gemäß des Herstellerprotokolls gemessen. 2',7'-Dichlorfluorescindiaceat (H₂DCFDA) ist ein nicht-fluoreszierendes, zelldurchlässiges Reagenz, das nach der Diffusion in die Zelle durch zelluläre Esterasen zu 2',7'-Dichlorfluorescin (H₂DCF) deacetyliert wird. In Anwesenheit von ROS wird das nicht-fluoreszierende H₂DCF im Anschluss zu stark fluoreszierendem 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert (Nova et al., 2020).

Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist hierbei proportional zum ROS-Gehalt der Zelle (Joshi and Bakowska, 2011).

ES-Zellen wurden zur Durchführung nach der wie in Kap. 2.2.2 beschriebenen 5-ALA-basierten PDT mit oder ohne DOX-Behandlung mit 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat-Lösung (20 μ M) angefärbt und 45 min lang bei 37 °C und 5% CO₂ im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde das DCFDA-Reagenz durch Assay-Puffer ersetzt und die daraus entstehende Fluoreszenz mit einem Fluoreszenz-Mikroplattenlesegerät bei einem maximalen Anregungs- und Emissionsspektrum von 475 nm bzw. 500-550 nm gemessen.

Als Positivkontrolle des ROS-Assays wurde die vom Hersteller zur Verfügung gestellte 1,1-Dimethylethylhydroperoxid-Reagenz verwendet. Zudem wurde eine Kontrolle mit dem Lösungsmittel des DOX, in diesem Fall DMSO, entsprechend der höchsten angewandten DOX-Konzentration durchgeführt.

2.2.7 Rasterkraftmikroskopie

Zur Beurteilung von Zellelastizitäten wird die im Jahre 1986 von Binnig, Quate und Gerber (Binnig et al., 1986) eingeführte Rasterkraftmikroskopie verwendet, die die Wechselwirkung zwischen einer scharfen Spitze und einer Oberfläche untersucht.

Die Rasterkraftmikroskopie hat sich als moderne Technik zur mechanischen Untersuchung von Zellen bei der Frage, welche Rolle biomechanische Veränderungen in Zellen und Gewebe unter physiologischen und pathologischen Bedingungen spielen (Moeendarbary and Harris, 2014), etabliert. Anwendungsbereiche sind bspw. die Abbildung von Oberflächentopographien von Biomolekülen wie DNA, Proteinen und Lipiden (Viji Babu et al., 2019), die Untersuchung einzelner chemischer Verbindungen (Giessibl, 2021), oder wie in dieser Arbeit die Erfassung biomechanischer Eigenschaften wie die Elastizität von Zellen (Luo et al., 2016). Zur Nutzung dieser Zwecke ist die Kombination der Rasterkraftmikroskopie mit anderen Mikroskopie-Techniken wie Färbungen und Bildgebungsmethoden möglich, während keine Fixierung der vitalen Zellen erforderlich ist (Kahle et al., 2022). Die hohe räumliche Auflösung des AFM zum Abtasten von Oberflächen befindet sich, abhängig von der Messspitze, hierbei im

Nanometerbereich, bei gleichzeitiger Kraftempfindlichkeit von pN bis μN . Beeinflusst wird diese durch thermische, akustische und Vibrationsgeräuschpegel. Um solche Auflösungen zu erreichen, besteht der filigrane Messapparat aus einer biegsamen Blattfeder (engl. Cantilever) mit einer Messspitze (engl. Tip). Dieser Tip, der sich je nach Verwendungszweck in Form, Größe und Beschaffenheit (Beschichtung, Federkonstante) unterscheidet, wird bei der Messung in die Probe mit einer vordefinierten konstanten Kraft eingedrückt. Der Cantilever verhält sich bei dieser Auslenkung wie eine lineare Feder und ermöglicht, bei bekannter Federkonstante des Cantilever, die Messung von absoluten Kräften. Ein zuvor auf den Cantilever ausgerichteter Laserstrahl reflektiert auf eine Photodiode und lenkt bei mechanischer Manipulation am Cantilever aus. So wird bei korrekter Kalibrierung der Laser im Zentrum der 4-Quadranten-Diode ausgerichtet und bei Interaktion von Cantilever und Probe die Verbiegung jener über die Auslenkung des Laserstrahls erfasst. Aus den daraus alternierenden Lichtenergien können im Folgenden Analysen über die Elastizität der gemessenen Probe durchgeführt werden.

2.2.7.1 Aufbau

Die Elastizität der ES-Zellen wurde mit einem AFM-System (CellHesion200; Bruker, Billerica, MA, USA) gemessen, das auf einem inversen Lichtmikroskop (AxioObserver D1; Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Deutschland) montiert war. Dieser Aufbau ermöglicht die optische Ausrichtung der Messspitze auf einen ausgewählten Bereich zur Messung biomechanischer Eigenschaften einzelner, lebender Zellen.

Für die Messungen standen zusätzlich Computer zur Steuerung der Apparatur sowie zum Bedienen der Software zur Verfügung. Um eine konstante Temperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu gewährleisten und so die physiologische Körpertemperatur des Menschen nachzuempfinden, war eine Heizvorrichtung in den Aufbau integriert und mit der Tragefläche des AFMs verbunden.

Der Cantilever muss vor Verwendung des AFM manuell in den AFM-Messkopf eingespannt werden. Befestigt wird der Cantilever mittels einer Metallfeder, die den Chip auf der Glasvorrichtung einklemmt (siehe Abb. 11 [B]). Der Glasblock

kann anschließend in den Messkopf über einen integrierten Verschlussmechanismus eingebettet und ausgerichtet werden. Sobald der Messkopf in das AFM eingebaut ist, kann der Laser auf dem Cantilever zentral positioniert und die Kalibrierung gestartet werden. Um sowohl die Probe als auch den Cantilever frei im Raum bewegen zu können, ist das AFM mit einem piezoelektrischen x-y-z-Scanner ausgestattet.



Abbildung 10: AFM-Apparatur Übersichtsaufnahme

Dargestellt ist der Aufbau des AFM im Zellbiologischen Forschungslabor in Derendingen, Tübingen.

- 1: Inverses Lichtmikroskop
- 2: Motorisch betriebener AFM-Kopf
- 3: Adjustierbare Tragefläche für Gewebeprobe
- 4: Isolationsplatte zum Schutz vor externen Störvibrationen
- 5: Heizvorrichtung für Objektträger bzw. Petrischalen
- 6: Computer mit Steuerungssoftware

Eigene Aufnahme.

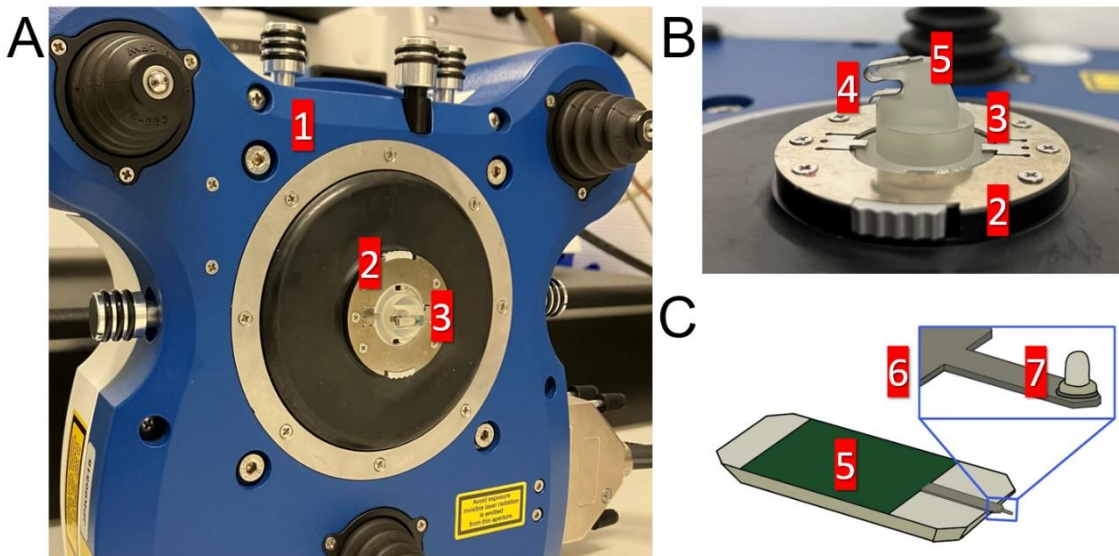


Abbildung 11: AFM-Messkopf (A) mit Nahaufnahme der Cantilever-Halterung (B) und schematischer Darstellung des Cantilever (C)

Dargestellt sind Nahaufnahmen des AFM-Messkopfes inklusive eingespannten Cantilever.

- 1: Motorisch betriebener AFM-Kopf
- 2: Verriegelung für den Glasblock als Cantilever-Halterung (3)
- 3: Cantilever-Halterung bestehend aus Glasblock und Metallfeder (4)
- 4: Metallfeder
- 5: Träger-Chip
- 6: Blattfeder (Cantilever)
- 7: Messsonde in Kugelform (Tip)

Eigene Aufnahmen und Darstellungen.

2.2.7.2 Kalibrierung

Zur Gewährleistung präziser und reproduzierbarer Messergebnisse ist die Kalibrierung des AFM unerlässlich. Sie ermöglicht die korrekte Umrechnung von elektrischen Signalen in physikalische Größen wie beispielsweise Kraft oder Länge. Ein im AFM eingebauter und auf den Cantilever fokussierter Laser reflektiert auf eine positionsempfindliche Photodiode. Diese kann kleinste Bewegungsänderungen des Tips abbilden, wenn es zu Wechselwirkungen von Probe und AFM-Messsonde kommt. Die Ablenkungsempfindlichkeit der Detektoren muss vor der eigentlichen Messung kalibriert werden.

Zur Kalibrierung auf einer flachen Oberfläche wurde der Cantilever über einer leeren Schale positioniert, die mit auf 37 °C vorgewärmten Leibovitz L-Medium ohne L-Glutamin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefüllt wurde. Die Federkonstante des Cantilever wurde mit Hilfe der in der Gerätesoftware (JPK Instruments, Berlin, Deutschland) integrierten Methode des thermischen Rauschens bestimmt, während die Kalibrierung anhand der Retraktionskurve erfolgte. Folgende Parameter für die Kraftkurve wurden verwendet:

Tabelle 7: Einstellungen des Spektroskopie-Bedienfeldes zur Kalibrierung

<i>Parameter</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Einstellung</i>
<i>Setpoint</i>	Sollwert	1 V
<i>Pulling Length</i>	Zuglänge	90 µm
<i>Z Movement</i>	Bewegung in der Z-Achse	Konstante Geschwindigkeit
<i>Extend Speed</i>	Ausfahrgeschwindigkeit	5 µm/s
<i>Contact Time</i>	Kontaktzeit	0 s
<i>Delay Mode</i>	Verzögerung	Konstante Kraft
<i>Sample Rate</i>	Abtastrate	2000 Hz

Durch diesen Aufbau ist es möglich, eine in Volt gemessene Stromänderung auf der Photodiode bei Auslenkung des Cantilever als Kraft in Newton anzugeben. Bei bekannter Kraft sowie Auslenkung des Cantilever kann so die Federkonstante des Cantilever gemäß des Hookeschen Gesetzes bestimmt werden. In diesen Experimenten wurden die Kraft-Abstands-Kurven mit einer Messfrequenz von 2 kHz aufgenommen, wobei die AFM-Spitze jeweils bis zu einer maximalen Kraft von 2 nN auf die Zellen gedrückt wurde. Bei einer vordefinierten Stromänderung von einem Volt (siehe Setpoint) bei Probenkontakt muss eine bestimmte Auslenkung des Cantilever stattfinden, um diesen Strom auf der Photodiode abzubilden. Analog hierzu kann bei einer vordefinierten konstanten Krafteinwirkung bei bekannter Federkonstante auf die Auslenkung des Cantilever durch die Stromänderung an der Photodiode geschlossen werden.

Zu diesem Zweck wurde der Cantilever in einem automatisierten Annäherungsprozess (Approach) auf den flachen und annähernd unendlich

harten Boden der Kalibrierungsschale in 100- μm -Schritten bis zum Kontakt mit der Schale zubewegt. Die bei Kontakt mit dem Schalenboden entstehende Kalibrierungskurve ließ im Anschluss auf die Ablenkungsempfindlichkeit des Cantilever schließen, indem die Steigung des steilsten Kurvenabschnittes die Auslenkung des Cantilever im Verhältnis zur Stromänderung abbildet. Wird der Kontaktpunkt erreicht und das Zurückziehen (Retract) ausgelöst, befindet sich die Messsonde exakt 100 μm über der Probenoberfläche.

Zur genauen Ermittlung der Cantilever-Federkonstante wurde innerhalb der Betriebssoftware des AFM eine Wärmerauschmessung durchgeführt. Die Federkonstante in Kombination mit der ebenfalls konstanten Cantileversensitivität kann zur Bestimmung der Kraft zwischen Cantilever und Probe bei Kontakt verwendet werden.

2.2.7.3 Messung

Nach erfolgreicher Kalibrierung konnten Messexperimente zur Beurteilung der elastischen Eigenschaften von ES-Zellen durchgeführt werden. Der Kontakt zwischen der Cantilever-Spitze und den Proben wurde im Kraftspektroskopie-Modus durch Aufzeichnung einzelner Kraft-Abstands-Kurven beobachtet. Hierfür wurde eine 5 μm große kugelförmige AFM-Messspitze (Model SAA-SPH-5UM, $k = 0,2 \text{ N/m}$; Bruker, Billerica, MA, USA) zum Eindrücken der Zellen verwendet.

Die Zellen wurden für die Messungen auf Zellkulturschalen (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) kultiviert. Nach der Behandlung der Zellen mit 5-ALA-basierter PDT oder DOX (siehe Kap. 2.2.2 und 2.2.3), wurde das Kulturmedium durch Leibovitz L-15 Medium ohne L-Glutamin mit entsprechender Zelldichte ersetzt. Die hierfür gewählten Zelldichten betragen für die Zelllinie RD-ES 2×10^4 Zellen/Schale, für A-673 und TC-71 4×10^4 Zellen/Schale und für MSCs $2,5 \times 10^4$ Zellen/Schale.

Bedingung für die Auswahl der zu messenden Zellen war, dass die Zellen nicht in direktem Kontakt zu benachbarten Zellen standen, um so mögliche Störfaktoren zu vermeiden. Nach genauer Positionierung der AFM-Messsonde über der ausgewählten Zelle wurden jeweils drei Messungen durchgeführt. Diesem Procedere folgend wurden pro Zelllinie 30 Zellen für jeden Behandlungs-

Ansatz gemessen und von jeder Untersuchung drei unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Die dabei erzeugten Kraft-Abstands-Kurven wurden mittels des sogenannten Hertz-Modells in der Datenverarbeitungssoftware von Bruker verarbeitet. Dieses ist zur Berechnung der Zellelastizität unabdingbar, da es die sphärische Form der Messsonde bei der punktuellen und somit inhomogenen Eindringung zwischen Sonde und Zelle berücksichtigt. Das Hertz-Modell bedient sich folgender zwei Formeln (2), die Kraft und Verformung sowie Eindringtiefe und Kontaktradius aufeinander beziehen (Oliver and Pharr, 1992). Die Sonde wird hierbei als starr angenommen und $\alpha < R_s$ wird vorausgesetzt.

$$F = \frac{E}{1-\nu^2} \left[\frac{a^2 + R_s^2}{2} \ln \frac{R_s + a}{R_s - a} - aR_s \right] \quad (2)$$

$$\delta = \frac{a}{2} \ln \frac{R_s + a}{R_s - a}$$

F: Kraft, die vom AFM-Tip auf die Probe wirkt

E: Young'scher Modul (Elastizitätsmodul) der Probe

V: Poisson-Zahl (hier auf 0,5 gesetzt)

α : Radius der Kontaktfläche zwischen Sonde und Probe

R_s : Kugelradius der AFM-Tip-Sonde

δ : Eindringtiefe (Indentation) der Sonde in die Probe

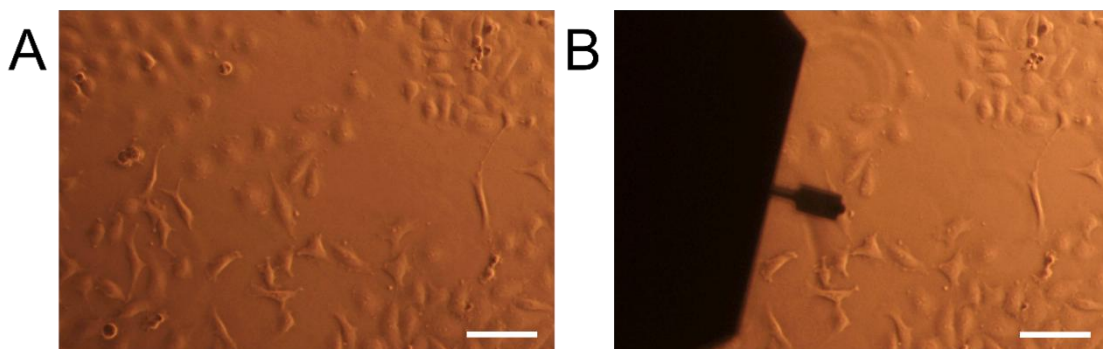


Abbildung 12: RD-ES AFM-Aufnahme ohne und mit Cantilever

Lichtmikroskopische Bilder bei 10-facher Vergrößerung. Dargestellt ist die Aufnahme einer mit RD-ES-Zellen kultivierten AFM-Platte (A). Der Cantilever kann gezielt über Zellen platziert werden (B). Die Maßstabsleiste (weiß) entspricht 100 μm .

Eigene Aufnahmen.

2.2.7.4 AFM-Kontaktmodus und Kraft-Abstands-Kurvenanalyse

Der Aufbau des AFM ermöglicht die Art der Wechselwirkung zwischen Messspitze und Probenoberfläche mittels verschiedener Modi zu variieren (Danalache, 2020). Der in dieser Arbeit verwendete AFM-Kontaktmodus zeichnet sich durch den direkten Kontakt des Tips mit der zu messenden Zelle aus, wobei die vertikale Verbiegung des Cantilever gemessen wird. So kann eine quantitative Untersuchung von biomechanischen Eigenschaften wie der Zellelastizität stattfinden. Die daraus entstehende Kraft-Abstands-Kurve kann anschließend zur Analyse verwendet werden. Hierfür wird der Abstand des Cantilever zur Zelle sowie die aus dem Kontakt resultierende Auslenkung des Cantilever gegeneinander aufgezeichnet (siehe Abb. 13). Der Messvorgang wird in zwei Phasen dargestellt, der Annäherung (Approach-Kurve) des Cantilever an den Messpunkt, sowie das Zurückziehen (Retraction-Kurve) des Cantilever. Die Annäherung des Cantilever an die Probe erfolgt senkrecht und damit ohne Auslenkung (siehe Abb. 13 [1]), wobei unmittelbar vor Kontaktaufnahme mit der Probe Adhäsionskräfte durch die Annäherung zur beschleunigten Berührung mit dem Cantilever führen (siehe Abb. 13 [2]). Die daraus resultierende Verbiegung des Cantilever wird detektiert und bildet sich in Form einer Abwärtsauslenkung in der Kraft-Abstands-Kurve ab. Mit einer konstanten Kraft (eng: Constant Force mode) wird der Cantilever daraufhin in die Probe gedrückt, wobei sich die Feder biegt und die Kraft-Abstands-Kurve die vordefinierte Aufwärtsauslenkung verzeichnet (siehe Abb. 13 [3]). Das anschließende Zurückziehen des Cantilever geht häufig mit einer Auslenkung abwärts einher (siehe Abb. 13 [4]), was auf das Hängenbleiben der Messspitze an der Probe zurückzuführen ist. Es wirken hierbei Adhäsionskräfte zwischen Probe und Cantilever. Das weitere Zurückziehen erfolgt analog zur Annäherung ohne vertikale Verbiegung (siehe Abb. 13 [5]).

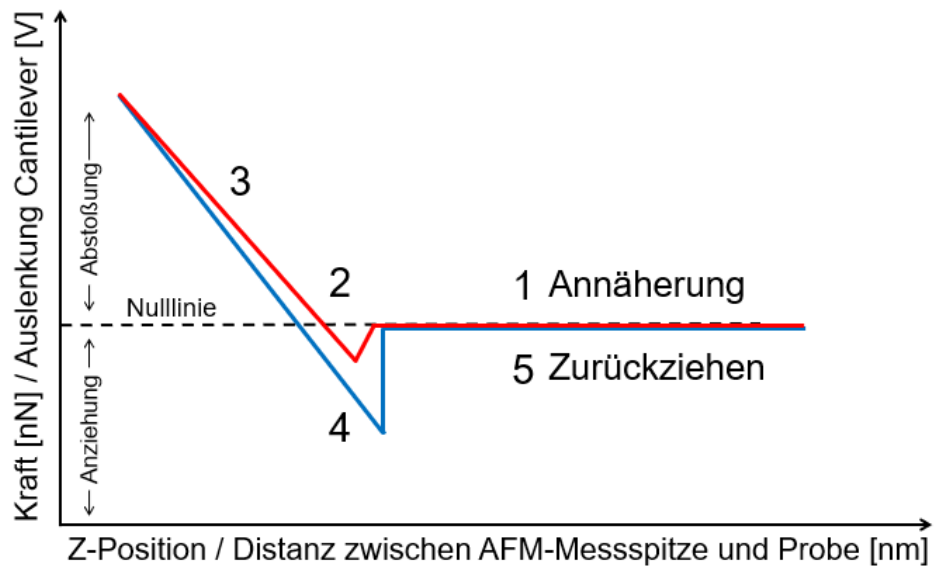


Abbildung 13: Schematische Darstellung einer Kraft-Distanz-Kurve im AFM-Kontaktmodus

Dargestellt sind die einzelnen Phasen der AFM-Messung.

- 1: Annäherung des Cantilever zur Probe
- 2: Anziehungskräfte wirken auf den Cantilever beim Annähern der Probe ein
- 3: Eindringen der Probe durch den Cantilever
- 4: Haftung des Cantilever an der Probe mit negativer Auslenkung durch Adhäsionskräfte
- 5: Zurückziehen des Cantilever von der Probe

Abkürzung: AFM – Rasterkraftmikroskop

Eigene Darstellung. Modifiziert nach Danalache (2020).

2.2.7.5 Ermittlung der Zellelastizität mit dem Youngschen Modul

Die Rasterkraftmikroskopie ermöglicht die Messung elastischer Eigenschaften von Proben wie in diesem Falle biologischer Zellen. Hierfür wird der Elastizitätsmodulus, auch Youngscher Modul (YM), anhand der Kraft-Abstands-Kurven bestimmt. Der YM misst die Fähigkeit eines Materials, sich unter Zugspannung zu verformen, ohne dabei plastisch zu werden. Als Materialkennwert aus der Werkstofftechnik findet der YM (E) Anwendung in der Beschreibung biomechanischer Eigenschaften von biologischen Materialien. Der Zusammenhang zwischen der auf das Material einwirkenden mechanischen Spannung (σ), also das Verhältnis Kraft pro Fläche, und der daraus resultierenden Dehnung (ε) des Materials wird in Pascal angegeben.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/A}{\Delta L/L_0} \quad [E] = 1 \text{ Pa} \quad (3)$$

F: Kraft, die auf ein Objekt unter Spannung ausgeübt wird

A: Fläche, die senkrecht zur aufgebrachten Kraft steht

ΔL : Betrag, um den sich die Länge des Objektes ändert.

L_0 : Originallänge des Objektes

Der Elastizitätsmodul (YM) verhält sich umgekehrt proportional zur Elastizität von Material, wächst also mit dem Widerstand, den ein fester Körper seiner elastischen Verformung entgegenwirkt. Zellen mit hoher Elastizität weisen einen niedrigeren YM auf als steifere Zellen, also mit geringer Elastizität. Als Materialkonstante ist der YM u. a. temperaturabhängig.

2.2.8 Statistische Auswertung

Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausführung in je drei unabhängigen Replikaten durchgeführt.

Zur graphischen Darstellung der Daten wurden Boxplots und Balkendiagramme verwendet.

Bei Daten, die nach Auswertung mittels Histogramms keiner Normalverteilung folgten, wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich mehrerer unabhängiger Gruppen angewendet.

Bei Annahme von Normalverteilung erfolgte eine Varianzanalyse (ANOVA) zur Überprüfung der signifikanten Unterschiede verschiedener, unabhängiger Stichproben.

Zur weiteren statistischen Auswertung folgten geeignete Post-hoc-Tests wie für den paarweisen Mehrfachvergleich der nichtparametrischen Dunn-Test oder im Anschluss an Varianzanalysen der spezifischere t-Test.

Ein Alpha-Niveau (p) von 0,05 wurde für alle Experimente angenommen. Ein Fehler 1. Art, also die Wahrscheinlichkeit, fälschlicherweise ein signifikantes Ergebnis zu finden, beträgt somit 5%.

Zur Anpassung der Konfidenzniveaus bei Mehrfachvergleichen wurde die Bonferroni-Methode angewendet, die die rohen p -Werte entsprechend korrigiert (Abdi, 2007).

Für die statistischen Auswertungen wurde die Statistiksoftware SPSS 22 (Version 28.0.0.0(190); IBM Corp., Armonk, NY) verwendet sowie Microsoft Excel zur besseren Veranschaulichung von einzelnen Datensätzen.

3 Ergebnisse

Teile der vorliegenden Ergebnisse wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Marocco, L., Umrath, F., Sachsenmaier, S., Rabiner, R., Wülker, N., & Danalache, M., 2022. 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Photodynamic Therapy Potentiates the Effectiveness of Doxorubicin in Ewing Sarcomas. *Biomedicines*, 10 (11), 2900. doi: 10.3390/biomedicines10112900. PMID: 36428464; PMCID: PMC9687703.

3.1 Beurteilung der Lebensfähigkeit (MTS Assay)

Die Negativkontrollen ohne Behandlung wurden für alle Versuchsreihen als 100% Viabilität gewertet und relative Viabilitäten davon abgeleitet.

3.1.1 DOX reduziert die zelluläre Lebensfähigkeit

MTS Assays wurden zur Beurteilung der Lebensfähigkeit der humanes ES-Zelllinien nach Behandlung mit DOX durchgeführt. Bei allen Zelllinien konnte hierbei festgestellt werden, dass die Viabilität mit steigender DOX-Konzentration abnahm (siehe Abb. 14). Diese Ergebnisse dienten als Grundlage für die Kombinationsversuche, bei denen zur besseren Vergleichbarkeit eine einheitliche DOX-Konzentration von 15 nM für alle Zelllinien gewählt wurde.

Abbildung 14 zeigt die Auswirkungen der jeweiligen DOX-Konzentration auf die relative Viabilität der jeweiligen Zelllinie.

Tabelle 8 zeigt die Signifikanz-Testung zwischen Negativkontrollen der jeweiligen Zelllinien und aufsteigenden DOX-Konzentrationen.

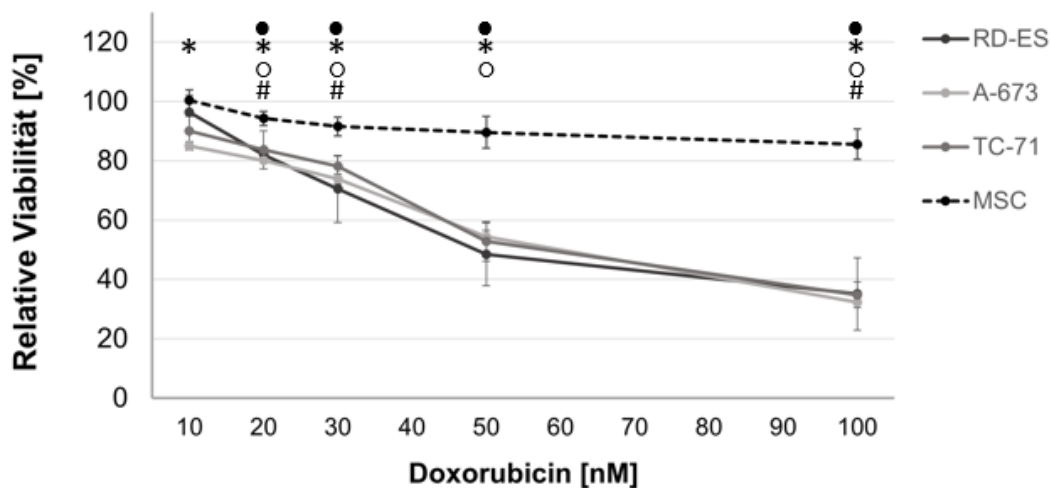


Abbildung 14: MTS-Ergebnisse der Ewing-Sarkom-Zelllinien nach DOX-Inkubation

Dargestellt sind Auswirkungen der jeweiligen Doxorubicin-Konzentration auf die relative Viabilität der jeweiligen Zelllinie. Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Fehlerbalken veranschaulichen die jeweiligen Standardabweichungen. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zur Negativkontrolle ist folgendermaßen gekennzeichnet:

RD-ES: ● A-673: * TC-7: ○ MSC: #

DOX: Doxorubicin

Modifiziert nach Marocco et al. (2022).

Tabelle 8: P-Werte der MTS-Ergebnisse nach DOX-Inkubation

Variabel \ Zelllinie	Zelllinie			
	RD-ES	A-673	TC-71	MSC
NK - 10 nM DOX	1.004	<0.001	0.072	2.506
NK - 20 nM DOX	<0.001	<0.001	0.035	0.044
NK - 30 nM DOX	0.031	<0.001	0.001	0.030
NK - 50 nM DOX	0.003	<0.001	<0.001	0.085
NK - 100 nM DOX	0.002	<0.001	<0.001	0.024

Signifikanz-Testung zwischen Negativkontrollen der jeweiligen Zelllinien und aufsteigenden DOX-Konzentrationen von 10 nM bis 100 nM. P-Werte nach Bonferroni-Korrektur sind für die ES-Zelllinien RD-ES, A-673 und TC-71 sowie die Kontrollgruppe (MSC) tabellarisch aufgelistet.

NK: Negativkontrolle

DOX: Doxorubicin

Modifiziert nach Marocco et al. (2022).

3.1.1.1 MTS-Ergebnisse der Zelllinie RD-ES nach DOX-Inkubation

Die Viabilität der Zelllinie RD-ES konnte nach Behandlung mit allen DOX-Konzentrationen (20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) ausgenommen der niedrigsten (10 nM) signifikant ($p < 0,05$) gesenkt werden. Während hierbei eine Reduktion der Lebensfähigkeit um lediglich 3,6% erreicht wurde, nahm die Anzahl vitaler Zellen nach 20 nM DOX bereits um 18% ab und nach 30 nM DOX um 29,5%. Für die Konzentration von 50 nM DOX sank die relative Viabilität um etwa die Hälfte (48,5% vitale Zellen) und betrug nach 100 nM DOX nur noch 35,1%.

3.1.1.2 MTS-Ergebnisse der Zelllinie A-673 nach DOX-Inkubation

Die Zelllinie A-673 reagierte auf alle applizierten DOX-Konzentrationen (10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) mit einer signifikanten ($p < 0,001$) Abnahme der relativen Zellviabilität. So betrug die Anzahl lebender Zellen nach der Behandlung mit 10 nM DOX 85%, sank bei 20 nM auf 80,1% und bei 30 nM auf 73,9%. Für die Konzentrationen von 50 nM konnte eine Reduzierung der Viabilität auf 54,4% festgestellt werden und bei 100 nM waren lediglich 32,3% der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle vital.

3.1.1.3 MTS-Ergebnisse der Zelllinie TC-71 nach DOX-Inkubation

Die Behandlung der Zelllinie TC-71 mit 20 nM und 30 nM DOX führte zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Abnahme der relativen Zellviabilität. Ebenso konnte die Lebensfähigkeit der Zellen durch höhere DOX-Konzentrationen (50 nM und 100 nM) signifikant ($p < 0,001$) reduziert werden. Während die niedrigste applizierte Dosis von 10 nM DOX die Anzahl vitaler Zellen um 9,9% und nach 20 nM um 16,3% herabsetzte, reagierten die Tumorzellen sensitiver auf höhere Dosen des Zytostatikums. So betrug die Reduktion der lebensfähigen Zellen nach 30 nM DOX 22,8%, nach 50 nM bereits 47,2% und 65,2% nach der Behandlung mit 100 nM DOX.

3.1.1.4 MTS-Ergebnisse der Zelllinie MSC nach DOX-Inkubation

Für die Kontrollgruppe (MSC) konnte ein abgeschwächter Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen im Vergleich zu den humanen ES-Zelllinien nach der Behandlung verschiedener DOX-Konzentrationen beobachtet werden. Signifikante ($p < 0,05$) Abweichungen der Viabilität verglichen mit der Negativkontrolle ergaben sich nach Applikation von 20 nM, 30 nM und der Höchstdosis 100 nM. Die gemessenen Werte betragen hierfür 100,4% nach 10 nM DOX, 94,3% nach 20 nM DOX, 91,6% nach 30 nM DOX, 89,6% nach 50 nM DOX und 85,6% nach 100 nM DOX.

3.1.2 5-ALA-PDT reduziert die zelluläre Lebensfähigkeit

MTS-Assays wurden durchgeführt, um die Auswirkungen auf die zelluläre Lebensfähigkeit von humanen ES-Zelllinien nach 5-ALA-basierter PDT zu untersuchen. Für alle Zelllinien konnte hierbei eine Abnahme der Viabilität bei Zunahme der 5-ALA-Konzentration verzeichnet werden, wobei sich unterschiedliche Sensitivitäten bezüglich des PS zeigten.

Abbildung 15 zeigt die Auswirkungen der jeweiligen 5-ALA-Konzentration auf die relative Viabilität der jeweiligen Zelllinie.

Tabelle 9 zeigt die Signifikanz-Testung zwischen Negativkontrollen der jeweiligen Zelllinien und aufsteigenden 5-ALA-Konzentrationen.

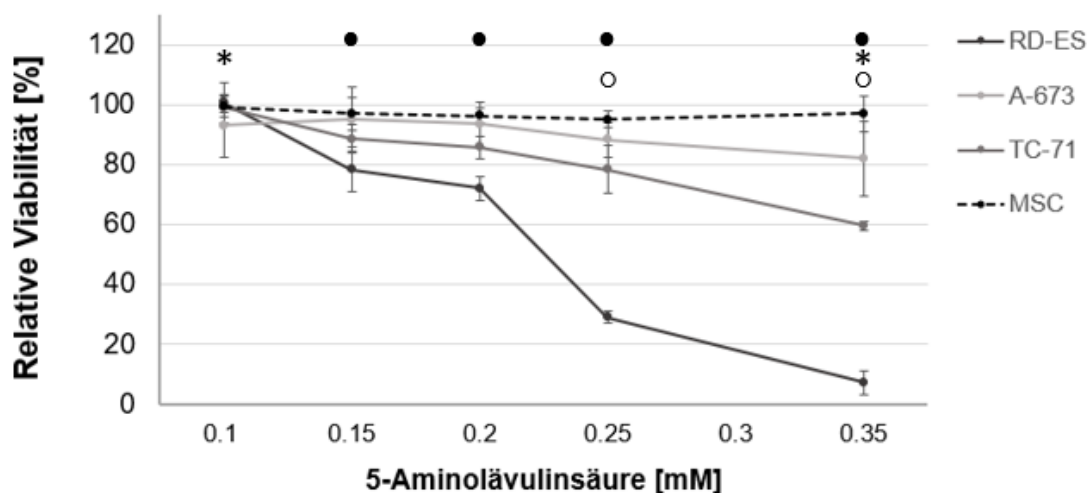


Abbildung 15: MTS-Ergebnisse der Ewing-Sarkom-Zelllinien nach 5-ALA-PDT

Dargestellt sind Auswirkungen der jeweiligen 5-Aminolävulinsäure-Konzentration auf die relative Viabilität der jeweiligen Zelllinie. Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Fehlerbalken veranschaulichen die jeweiligen Standardabweichungen. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zur Negativkontrolle ist folgendermaßen gekennzeichnet:

RD-ES: ● A-673: * TC-7: ○ MSC: #

5-ALA-PDT: 5-Aminolävulinsäure-basierte Photodynamische Therapie

Modifiziert nach Marocco et al. (2022).

Tabelle 9: P-Werte der MTS-Ergebnisse nach 5-ALA-PDT

Variabel	Zelllinie			
	RD-ES	A-673	TC-71	MSC
NK - 0.1 mM 5-ALA	2.585	0.008	2.658	2.182
NK - 0.15 mM 5-ALA	0.021	0.439	0.409	1.145
NK - 0.2 mM 5-ALA	<0.001	0.124	0.085	0.204
NK - 0.25 mM 5-ALA	<0.001	0.194	0.006	0.101
NK - 0.35 mM 5-ALA	<0.001	<0.001	0.014	1.258

Signifikanz-Testung zwischen Negativkontrollen der jeweiligen Zelllinien und aufsteigenden 5-ALA-Konzentrationen von 0,1 mM bis 0,35 mM und anschließender Photodynamischer Therapie (Lichtexposition 600 s). P-Werte nach Bonferroni-Korrektur sind für die Ewing-Sarkom-Zelllinien RD-ES, A-673 und TC-71 sowie die Kontrollgruppe (MSC) tabellarisch aufgelistet.

NK: Negativkontrolle

5-ALA-PDT: 5-Aminolävulinsäure-basierte Photodynamische Therapie

Modifiziert nach Marocco et al. (2022).

3.1.2.1 MTS-Ergebnisse der Zelllinie RD-ES nach 5-ALA-PDT

Die Zelllinie RD-ES reagierte am sensitivsten auf die 5-ALA-basierte PDT im Vergleich zu den anderen humanen ES-Zelllinien. Die Viabilität konnte nach Behandlung mit allen 5-ALA-Konzentrationen (0,15 mM, 0,2 mM, 0,25 mM, 0,35 mM) ausgenommen der niedrigsten (0,1 mM) signifikant ($p < 0,05$) gesenkt werden. Während die relative Zellviabilität bei 0,1 mM 5-ALA 100,7% betrug, nahm die Anzahl vitaler Zellen nach der Behandlung mit 0,15 mM 5-ALA bereits um 21,5% ab und bei 0,2 mM 5-ALA um 27,9%. Nach Applikation höherer Konzentrationen 5-ALA mit anschließender Belichtung sank die relative Viabilität auf 29,2% und 7,3% bei 0,25 mM beziehungsweise 0,35 mM 5-ALA. Von diesen Ergebnissen ausgehend wurde die Anwendung von 0,15 mM 5-ALA für folgende Versuche an der Zelllinie RD-ES festgelegt.

3.1.2.2 MTS-Ergebnisse der Zelllinie A-673 nach 5-ALA-PDT

Die Zelllinie A-673 zeigte die geringste Sensitivität gegenüber der 5-ALA-basierten PDT im Vergleich zu den anderen ES-Zelllinien. Lediglich die niedrigste 5-ALA-Konzentration (0,1 mM) sowie die höchste (0,35 mM) führten nach Applikation und anschließender Belichtung zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Abnahme der relativen Zellviabilität. Die Anzahl lebensfähiger Tumorzellen betrug nach der Behandlung mit 0,1 mM 5-ALA 93,1%, sank auf 95,1% nach 0,15 mM 5-ALA und 93,5% nach 0,2 mM 5-ALA. Die Konzentration von 0,25 mM 5-ALA reduzierte die relative Zellviabilität auf 88,2%. Erst die Applikation der Höchstdosis von 0,35 mM 5-ALA erreichte eine signifikante ($p < 0,05$) Abnahme auf 82%. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Anwendung von 0,35 mM 5-ALA für folgende Versuche an der Zelllinie A-673 festgelegt.

3.1.2.3 MTS-Ergebnisse der Zelllinie TC-71 nach 5-ALA-PDT

Die relative Zellviabilität der Zelllinie TC-71 konnte durch eine Applikation von 0,25 mM und 0,35 mM 5-ALA mit anschließender Belichtung signifikant ($p < 0,05$) reduziert werden. Die Abnahme der Anzahl lebensfähiger Zellen betrug nach der Behandlung mit 0,1 mM 5-ALA lediglich 0,9% und bei Konzentrationen von 0,15 mM sowie 0,2 mM 5-ALA jeweils 1,4% beziehungsweise 4,1%. Erst bei einer Dosis von 0,25 mM 5-ALA sank die Viabilität um 21,5% und erreichte bei 0,35 mM 5-ALA eine Reduktion um 40,4%. Von diesen Ergebnissen ausgehend wurde die Anwendung von 0,25 mM 5-ALA für folgende Versuche an der Zelllinie TC-71 festgelegt.

3.1.2.4 MTS-Ergebnisse der Zelllinie MSC nach 5-ALA-PDT

Keine der applizierten 5-ALA-Konzentrationen hatte einen signifikanten Effekt auf die Kontrollgruppe (MSC). Die relative Viabilität betrug nach jeweiliger Inkubation mit 5-ALA und anschließender Belichtung 99,3% für 0,1 mM 5-ALA, 96,9% für 0,15 mM 5-ALA, 96,4% für 0,2 mM 5-ALA, 95,2% für 0,25 mM 5-ALA und 96,9% für 0,35 mM 5-ALA. Für folgende Versuche wurde die Anwendung von 0,35 mM 5-ALA festgelegt, da diese der den Tumorzellen (Zelllinie A-673) applizierten Höchstkonzentration entspricht.

3.1.3 DOX mit 5-ALA-PDT steigert die Zellsterblichkeit

Zur Untersuchung potenziell synergistischer Effekte von DOX und 5-ALA-basierter PDT wurden beide Behandlungsansätze in entsprechenden Experimenten kombiniert. Es wurden jeweils zelllinienspezifische Konzentrationen gewählt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Bei allen Einzelbehandlungen wurde eine Reduktion der Lebensfähigkeit von ca. 80% als Orientierungswert für die Konzentrationen von DOX und 5-ALA bei kombinierten Versuchen gewählt. Trotz des Absterbens der Zellen durch die Einzelbehandlung konnte so sichergestellt werden, dass genügend lebensfähige Zellen für die Messungen der Kombinationsversuche vorhanden waren.

Abbildung 16 zeigt die Auswirkungen der Kombination aus DOX-Inkubation und 5-ALA-PDT auf die relative Viabilität der jeweiligen Zelllinie.

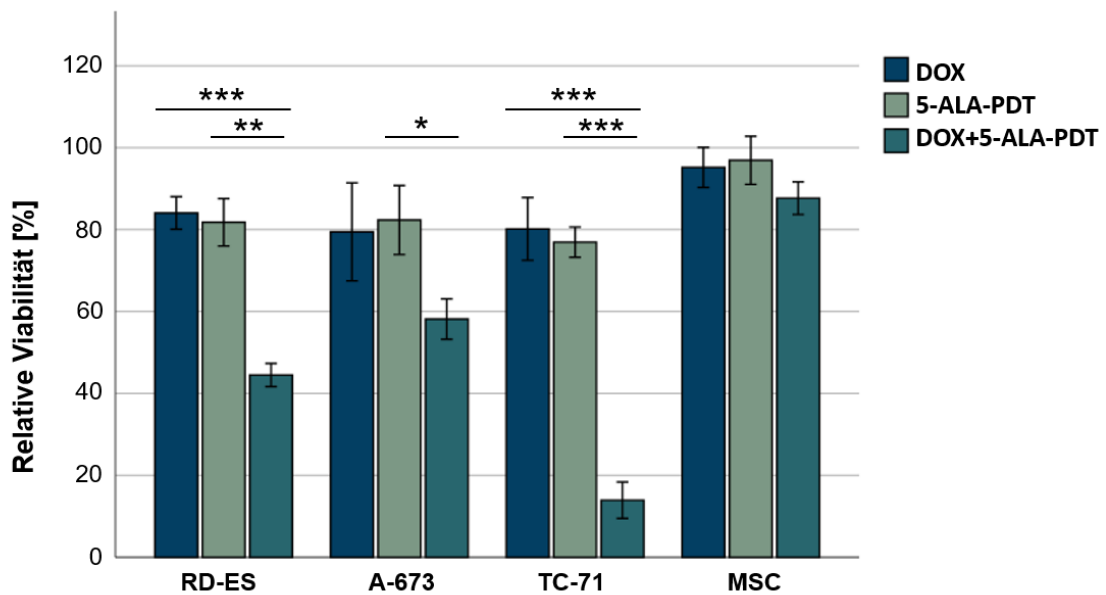


Abbildung 16: MTS-Ergebnisse der Ewing-Sarkom-Zelllinien nach verschiedenen Behandlungsansätzen

Dargestellt sind Veränderungen der Viabilität der jeweiligen ES-Zelllinien RD-ES, A-673, TC-71 sowie der Kontrollgruppe (MSC) nach DOX-Behandlung und 5-ALA-vermittelter PDT. Ergebnisse der Negativkontrolle wurden auf 100% Lebensfähigkeit angesetzt. Die Fehlerbalken veranschaulichen die Standardabweichungen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur jeweiligen Versuchsreihe).

DOX: Inkubation mit 15 nM Doxorubicin

5-ALA-PDT: Inkubation mit an die Empfindlichkeit der Zelllinien angepassten 5-Aminolävulinsäure-Konzentrationen (RD-ES: 0,15 mM, TC-71: 0,25 mM, A-673 und MSC: 0,35 mM), anschließend Photodynamische Therapie

DOX+5-ALA-PDT: Inkubation mit 15 nM Doxorubicin, gefolgt von 5-Aminolävulinsäure, anschließend Photodynamische Therapie

Modifiziert nach Marocco et al. (2022).

3.1.3.1 MTS-Ergebnisse der Zelllinie RD-ES nach DOX+5-ALA-PDT

Die Zelllinie RD-ES zeigte einen signifikanten Rückgang der Zelllebensfähigkeit auf 44,5% nach der Kombination von 15 nM DOX und 0,15 mM 5-ALA im Vergleich zu den einzeln behandelten Zellen mit DOX ($p < 0,001$) oder 5-ALA-basierter PDT ($p < 0,01$). DOX reduzierte hierbei die Anzahl vitaler Zellen auf 84,1%, während die relative Zellviabilität nach der Applikation von 5-ALA und anschließender Belichtung 81,8% betrug.

3.1.3.2 MTS-Ergebnisse der Zelllinie A-673 nach DOX+5-ALA-PDT

Die Zelllinie A-673 zeigte sich resistenter gegenüber der 5-ALA-basierten PDT. Nach der Anwendung von 15 nM DOX kombiniert mit 0,35 mM 5-ALA und anschließender Belichtung wurde ein Rückgang des Zellüberlebens auf 58,2% festgestellt, während bei den jeweiligen Einzelbehandlungen eine relative Zellviabilität von 79,5% für DOX und 82,4% für 5-ALA beobachtet wurde. Lediglich der Vergleich zwischen der alleinigen 5-ALA-vermittelten PDT und dem kombinierten Therapieansatz führte zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Abweichung der zellulären Lebensfähigkeit.

3.1.3.3 MTS-Ergebnisse der Zelllinie TC-71 nach DOX+5-ALA-PDT

Der bemerkenswerteste Effekt auf die relative Viabilität wurde bei der Zelllinie TC-71 beobachtet, die eine Reduktion der zellulären Lebensfähigkeit auf 13,9% zeigte, nach der Behandlung mit 15 nM DOX und 0,25 mM 5-ALA mit anschließender Lichtexposition. Verglichen mit den Einzelbehandlungen konnte jeweils eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Viabilität gemessen werden. Als alleinige Therapie reduzierten DOX oder 5-ALA die Anzahl vitaler Zellen nicht signifikant auf 80,2% bzw. 76,2%.

3.1.3.4 MTS-Ergebnisse der Zelllinie MSC nach DOX+5-ALA-PDT

Die Kombination der Behandlungen (DOX und 5-ALA-basierte PDT) hatte keine signifikante Wirkung auf die Lebensfähigkeit der MSCs. So konnte für die Kontrollgruppe eine Viabilität von 87,7% nach der Inkubation mit 15 nM DOX mit anschließender Lichtexposition unter 0,35 mM 5-ALA verzeichnet werden. Als alleinige Therapie reduzierten DOX oder 5-ALA die Anzahl vitaler Zellen auf 95,2% bzw. 96,9%.

3.2 Beurteilung der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

3.2.1 DOX und 5-ALA-PDT induzieren zelluläre ROS-Bildung

Die Messung der ROS-Produktion in humanen ES-Zelllinien unter Behandlung mit DOX und/oder 5-ALA-basierter PDT erfolgte auf Grundlage des wissenschaftlichen Kenntnisstandes, dass Tumorzellen durch hohen zellulären oxidativen Stress gekennzeichnet sind und daher nur eine geringe Toleranz gegenüber oxidativer Schädigung aufweisen (Liu et al., 2020).

Folgende Ergebnisse sollten in Verbindung mit den Viabilitäts-Messungen betrachtet werden (siehe Abb. 17), da sich die relativen Veränderungen in der ROS-Produktion auf die Veränderungen in der Lebensfähigkeit beziehen. So haben die absoluten ROS-Werte kaum Aussagekraft, wenn sie nicht in Relation zu der Anzahl der Zellen gesehen werden, die für die ROS-Bildung verantwortlich sind.

Abbildung 17 zeigt die relative Veränderung der ROS-Produktion der jeweiligen ES-Zelllinien nach den jeweiligen Behandlungen.

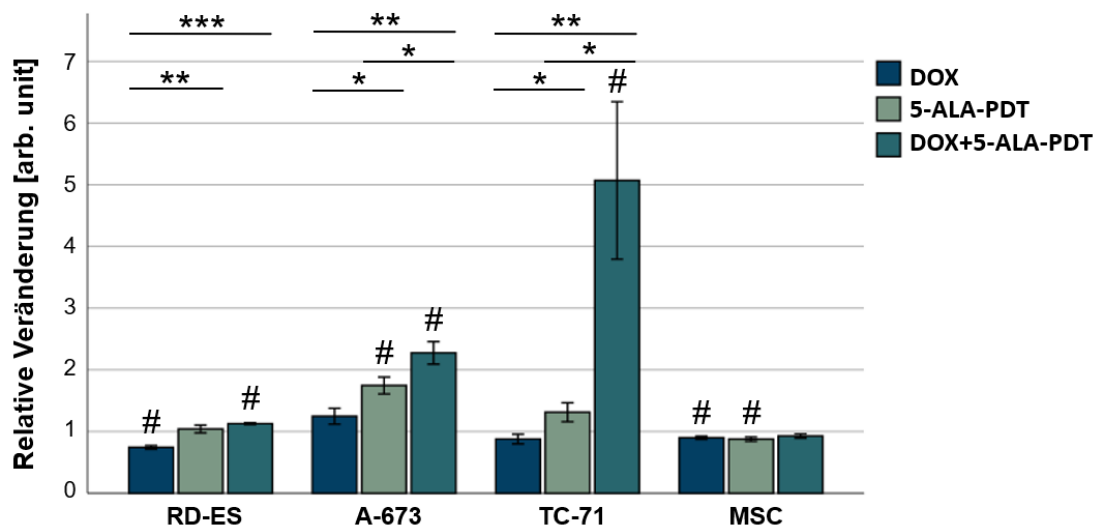


Abbildung 17: ROS-Ergebnisse der Ewing-Sarkom-Zelllinien nach verschiedenen Behandlungsansätzen

Dargestellt sind relative Veränderungen der ROS-Produktion der jeweiligen ES-Zelllinien RD-ES, A-673, TC-71 sowie der Kontrollgruppe (MSC) nach DOX-Behandlung und 5-ALA-vermittelter PDT. Ergebnisse der Viabilitäts-Messungen (siehe Kap. 3.1) wurden in Relation zu den absoluten Werten der ROS-Produktion verrechnet. Die Fehlerbalken veranschaulichen die Standardabweichungen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur jeweiligen Versuchsreihe, # $p < 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle).

DOX: Inkubation mit 15 nM Doxorubicin

5-ALA-PDT: Inkubation mit an die Empfindlichkeit der Zelllinien angepassten 5-Aminolävulinsäure-Konzentrationen (RD-ES: 0,15 mM, TC-71: 0,25 mM, A-673 und MSC: 0,35 mM), anschließend Photodynamische Therapie

DOX+5-ALA-PDT: Kombination aus Doxorubicin und 5-Aminolävulinsäure, anschließend Photodynamische Therapie

Modifiziert nach Marocco et al. (2022).

3.2.1.1 ROS-Ergebnisse der Zelllinie RD-ES

Die ROS-Bildung der Zelllinie RD-ES verringerte sich signifikant ($p < 0,05$) nach der Behandlung mit DOX im Vergleich zur Negativkontrolle (NK). Während für die alleinige Belichtung der Zellen nach 5-ALA-Inkubation keine signifikante Veränderung festgestellt werden konnte, erhöhte sich die relative Menge der gemessenen ROS bei den Zellen der kombinierten Therapieansätze signifikant ($p < 0,05$) im Vergleich zur NK. Untereinander wichen sowohl die Zellen nach 5-ALA-basierter PDT signifikant ($p < 0,01$) von den DOX-behandelten Zellen ab, als auch die Kombinationstherapie ($p < 0,001$). Die Messungen zeigten eine Abnahme der ROS-Produktion nach der Einzelbehandlung mit DOX von 26% im Vergleich zur NK (relative Veränderung 0,74), während die ROS-Bildung nach 5-ALA-basierter PDT unverändert blieb (relative Veränderung 1,04) und bei der kombinierten Therapie um 13% anstieg (relative Veränderung 1,13). Dieses Ergebnis legt nahe, dass Zellen unter der kombinierten Therapie größerem oxidativen Stress ausgesetzt waren als die unbehandelte NK.

3.2.1.2 ROS-Ergebnisse der Zelllinie A-673

Die ROS-Produktion der Zelllinie A-673 erhöhte sich signifikant ($p < 0,05$) sowohl nach der alleinigen Behandlung mit 5-ALA-basierter PDT als auch nach der Kombination mit DOX im Vergleich zur NK. Während die ROS-Bildung bei DOX-behandelten Zellen um 25% stieg (relative Veränderung 1,25), konnte für die 5-ALA-basierte PDT eine Steigerung um 75% gemessen werden (relative Veränderung 1,75) und für die Kombinationstherapie sogar eine Erhöhung von 128% (relative Veränderung 2,28). Unter den einzelnen Behandlungen konnten zwischen der DOX-Behandlung und der 5-ALA-basierten PDT eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) verzeichnet werden, ebenso wie zwischen der Einzelbehandlung mit 5-ALA-basierter PDT und der kombinierten Therapie ($p < 0,05$). Auch zwischen DOX-behandelten Zellen und der Kombitherapie stieg die ROS-Produktion signifikant ($p < 0,01$).

3.2.1.3 ROS-Ergebnisse der Zelllinie TC-71

Die ROS-Produktion der Zelllinie TC-71 erhöhte sich signifikant ($p < 0,05$) nach Behandlung der Zellen mit 5-ALA-basierter PDT in Kombination mit DOX im Vergleich zur NK. Während die ROS-Bildung bei DOX-behandelten Zellen um 12% abnahm (relative Veränderung 0,88), konnte für die 5-ALA-basierte PDT eine Steigerung um 31% gemessen werden (relative Veränderung 1,31) und für die Kombinationstherapie sogar eine Erhöhung um das 5-fache bei einer relativen Veränderung von 5,06. Unter den einzelnen Behandlungen konnten zwischen der DOX-Behandlung und der 5-ALA-basierten PDT eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) verzeichnet werden, ebenso wie zwischen der Einzelbehandlung mit 5-ALA-basierter PDT und der kombinierten Therapie ($p < 0,05$). Auch zwischen DOX-behandelten Zellen und der Kombitherapie stieg die ROS-Produktion signifikant ($p < 0,01$).

3.2.1.4 ROS-Ergebnisse der Zelllinie MSC

Geringste Abweichungen in der ROS-Produktion zeigte die Kontrollgruppe der MSCs. Zwar nahm die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei den Einzelbehandlungen mit jeweils DOX und 5-ALA-basierter PDT signifikant ($p < 0,05$) im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle ab, es konnte jedoch keine signifikante Veränderung der Kombinationstherapie im Vergleich zur Negativkontrolle verzeichnet werden. Die relativen Veränderungen betragen für die DOX-Behandlung 0,9 und für Zellen nach 5-ALA-basierter PDT 0,88. Mit einer Abweichung von 7% (relative Veränderung 0,93) bei der kombinierten Therapie konnten zwischen den einzelnen Behandlungsansätzen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

3.3 Rasterkraftmikroskopie

Um Veränderungen in der Elastizität in humanen ES-Zellen nach der Behandlung mit DOX oder 5-ALA-basierter PDT zu untersuchen, wurden AFM-Messungen an drei ES-Zellreihen sowie einer Kontrollgruppe (MSC) durchgeführt.

Der Elastizitätsmodul, auch Youngscher Modul (YM), steigt mit dem Widerstand, den die Zellen der elastischen Verformung durch das AFM entgegensetzen. Je niedriger die gemessenen Werte, desto elastischer ist das untersuchte Material. Angegeben wird der YM in Pascal und entspricht damit der mechanischen Spannung, die pro Dehnungseinheit erforderlich ist.

3.3.1 AFM-Ergebnisse der Zelllinie RD-ES

Für die Zelllinie RD-ES konnte eine signifikante Abnahme ($p < 0,001$) in der Elastizität der behandelten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) beobachtet werden. Absolute Werte zwischen der NK und DOX-Behandlung erhöhten sich um 28% (Median 240 Pa zu 307 Pa). Für die 5-ALA-PDT-behandelten Zellen wurde im Vergleich zur NK eine Erhöhung um 42% gemessen (Median: 240 Pa zu 340 Pa). Zellen, die sowohl mit DOX als auch mit 5-ALA-basierter PDT behandelt wurden, zeigten eine Zunahme von 35% (Median: 240 Pa zu 325 Pa).

Zwischen den einzelnen Behandlungsansätzen konnten keine signifikanten Veränderungen verzeichnet werden.

Abbildung 18 zeigt die Veränderungen der Elastizität der Zelllinie RD-ES nach den jeweiligen Behandlungen.

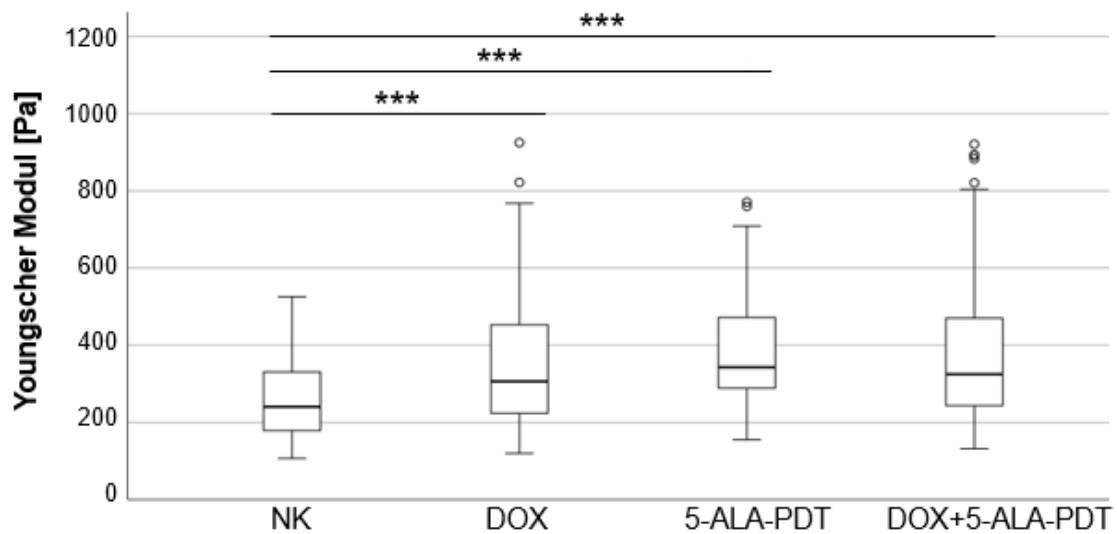


Abbildung 18: Box-Plot-Diagramm der Elastizität von RD-ES-Zellen nach verschiedenen Behandlungsansätzen

Dargestellt sind Veränderungen der Elastizität (Youngscher Modul [Pa]) der humanen Ewing-Sarkom-Zelllinie RD-ES nach den jeweiligen Behandlungen:

NK: Negativkontrolle

DOX: Inkubation mit 15 nM Doxorubicin

5-ALA-PDT: Inkubation mit 0,15 mM 5-Aminolävulinsäure, anschließend Photodynamische Therapie

DOX+5-ALA-PDT: Kombination aus Inkubation mit 15 nM Doxorubicin und 0,15 mM 5-Aminolävulinsäure, anschließend Photodynamische Therapie

Das Box-Plot-Diagramm veranschaulicht Median, Minimum und Maximum der jeweiligen Versuchsreihe. Ausreißer sind als Kreise dargestellt. Statistisch signifikante Werte sind durch Sterne über den verglichenen Datensätzen gekennzeichnet (** $p < 0,001$).

Modifiziert nach Marocco et al. (2022).

3.3.2 AFM-Ergebnisse der Zelllinie A-673

Messungen der Zelllinie A-673 zeigten sowohl für die Einzelbehandlungen im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) signifikante Erhöhungen ($p < 0,001$) als auch beim kombinierten Therapieansatz ($p < 0,05$).

Absolute Werte zwischen der NK und DOX-Behandlung stiegen um 26% (Median 600 Pa zu 754 Pa). Für die 5-ALA-PDT-behandelten Zellen wurde im Vergleich zur NK eine Erhöhung um 40% gemessen (Median: 600 Pa zu 842 Pa). Zellen, die sowohl mit DOX als auch mit 5-ALA-basierter PDT behandelt wurden, zeigten eine vergleichbar geringere Zunahme von lediglich 16% (Median: 600 Pa zu 694 Pa).

Zwischen den einzelnen Behandlungsansätzen konnten keine signifikanten Veränderungen verzeichnet werden.

Abbildung 19 zeigt die Veränderungen der Elastizität der Zelllinie A-673 nach den jeweiligen Behandlungen.

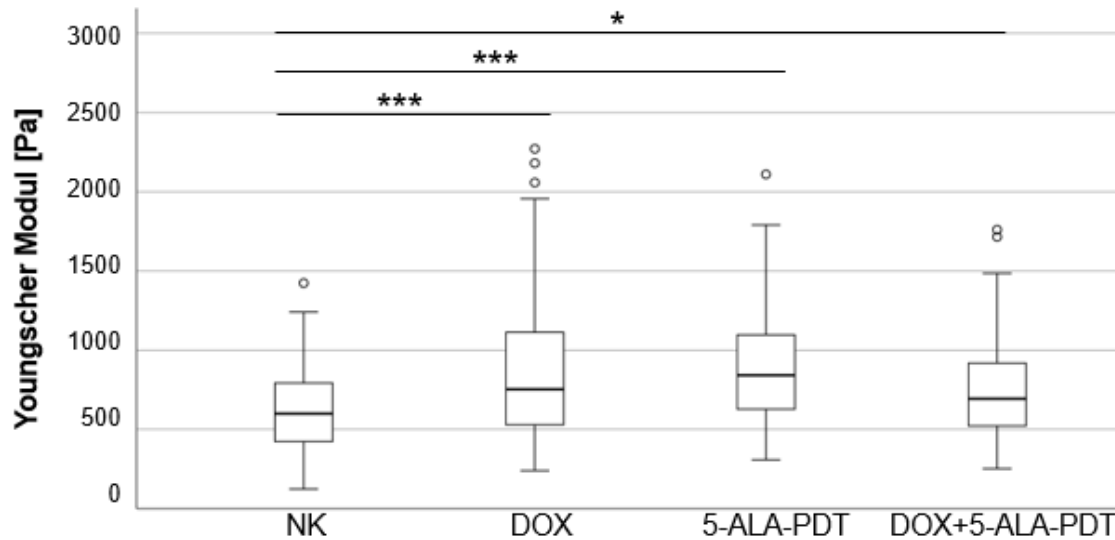


Abbildung 19: Box-Plot-Diagramm der Elastizität von A-673-Zellen nach verschiedenen Behandlungsansätzen

Dargestellt sind Veränderungen der Elastizität (Youngscher Modul [Pa]) der humanen Ewing-Sarkom-Zelllinie A-673 nach den jeweiligen Behandlungen:

NK: Negativkontrolle

DOX: Inkubation mit 15 nM Doxorubicin

5-ALA-PDT: Inkubation mit 0,35 mM 5-Aminolävulinsäure, anschließend Photodynamische Therapie

DOX+5-ALA-PDT: Kombination aus Inkubation mit 15 nM Doxorubicin und 0,35 mM 5-Aminolävulinsäure, anschließend Photodynamische Therapie

Das Box-Plot-Diagramm veranschaulicht Median, Minimum und Maximum der jeweiligen Versuchsreihe. Ausreißer sind als Kreise dargestellt. Statistisch signifikante Werte sind durch Sterne über den verglichenen Datensätzen gekennzeichnet (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Modifiziert nach Marocco et al. (2022).

3.3.3 AFM-Ergebnisse der Zelllinie TC-71

Während für die Zelllinie TC-71 die Einzelbehandlungen mit DOX und 5-ALA-basierter PDT jeweils einen signifikant veränderten Youngschen Modul im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) aufwiesen (DOX: $p < 0,05$, 5-ALA-PDT: $p < 0,001$), konnte keine signifikante Veränderung zwischen der kombinierten Therapie und der NK gemessen werden.

Absolute Werte zwischen der NK und DOX-Behandlung erhöhten sich um 19% (Median 109 Pa zu 130 Pa). Für die 5-ALA-PDT-behandelten Zellen wurde im Vergleich zur NK eine Erhöhung um 50% gemessen (Median: 109 Pa zu 163 Pa).

Interessanterweise zeigten sich die Zellen nach dem kombinierten Therapieansatz weniger elastisch als nach alleiniger Behandlung mit 5-ALA und anschließender Bestrahlung. So wurde ein signifikant ($p < 0,05$) niedrigerer Youngscher Modul für die kombinierte Therapie gemessen, bei einer Abnahme des Medians von 163 Pa zu 119 Pa.

Abbildung 20 zeigt die Veränderungen der Elastizität der Zelllinie TC-71 nach den jeweiligen Behandlungen.

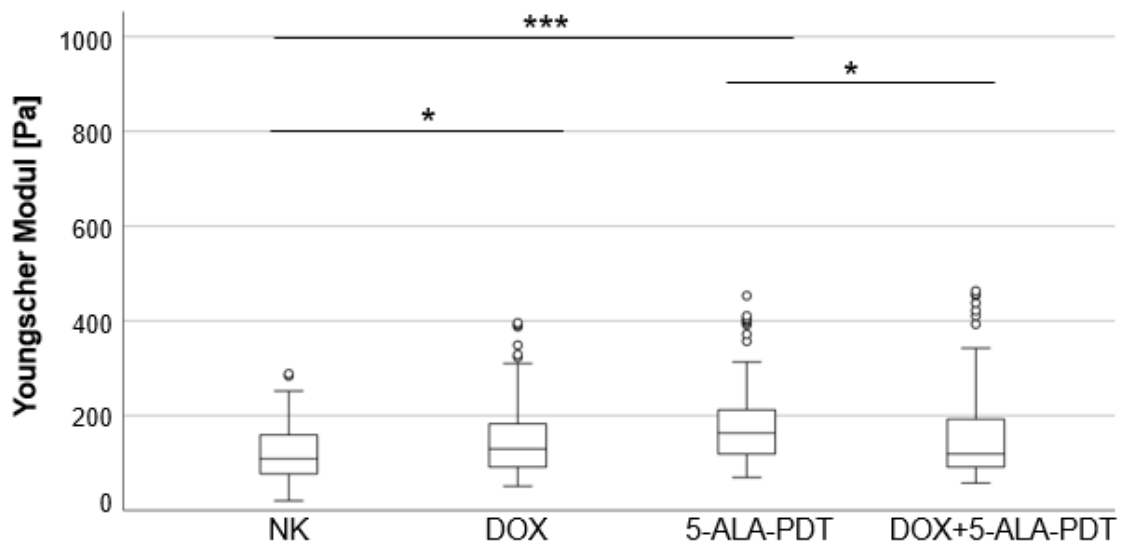


Abbildung 20: Box-Plot-Diagramm der Elastizität von TC-71-Zellen nach verschiedenen Behandlungsansätzen

Dargestellt sind Veränderungen der Elastizität (Youngscher Modul [Pa]) der humanen Ewing-Sarkom-Zelllinie TC-71 nach den jeweiligen Behandlungen:

NK: Negativkontrolle

DOX: Inkubation mit 15 nM Doxorubicin

5-ALA-PDT: Inkubation mit 0,25 mM 5-Aminolävulinsäure, anschließend Photodynamische Therapie

DOX+5-ALA-PDT: Kombination aus Inkubation mit 15 nM Doxorubicin und 0,25 mM 5-Aminolävulinsäure, anschließend Photodynamische Therapie

Das Box-Plot-Diagramm veranschaulicht Median, Minimum und Maximum der jeweiligen Versuchsreihe. Ausreißer sind als Kreise dargestellt. Statistisch signifikante Werte sind durch Sterne über den verglichenen Datensätzen gekennzeichnet (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Modifiziert nach Marocco et al. (2022).

3.3.4 AFM-Ergebnisse der Zelllinie MSC

Im Gegensatz zu den behandelten ES-Zelllinien zeigte die Kontrollgruppe (MSC) keine signifikanten Veränderungen in der Elastizität im Vergleich zwischen den unbehandelten und behandelten Zellen.

Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Zellen verzeichnet werden. Die Median-Werte betragen für die Negativkontrolle (NK) 952 Pa, nach der DOX-Behandlung 905 Pa, nach der 5-ALA-Behandlung mit anschließender Belichtung 953 Pa und als kombinierte Behandlung 976 Pa. Somit wichen die gemessenen Werte der behandelten Versuchsreihen nicht mehr als 5% von der Negativkontrolle ab.

Abbildung 21 zeigt die Veränderungen der Elastizität der Kontrollgruppe MSC nach den jeweiligen Behandlungen.

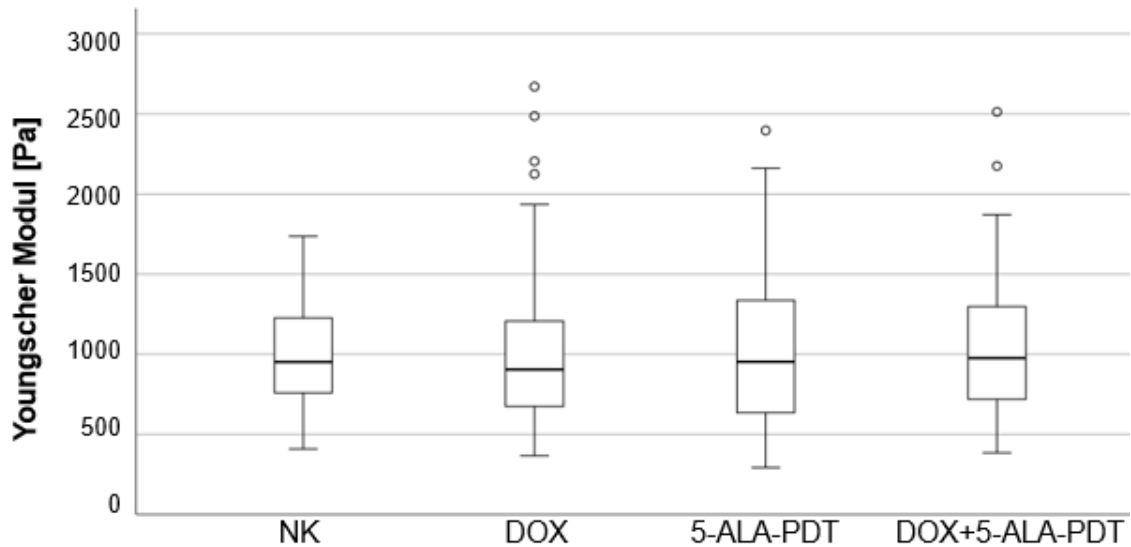


Abbildung 21: Box-Plot-Diagramm der Elastizität von MSC-Zellen nach verschiedenen Behandlungsansätzen

Dargestellt sind Veränderungen der Elastizität (Youngscher Modul [Pa]) der Mesenchymalen Stammzellen (MSCs) nach den jeweiligen Behandlungen:

NK: Negativkontrolle

DOX: Inkubation mit 15 nM Doxorubicin

5-ALA-PDT: Inkubation mit 0,35 mM 5-Aminolävulinsäure, anschließend Photodynamische Therapie

DOX+5-ALA-PDT: Kombination aus Inkubation mit 15 nM Doxorubicin und 0,35 mM 5-Aminolävulinsäure, anschließend Photodynamische Therapie

Das Box-Plot-Diagramm veranschaulicht Median, Minimum und Maximum der jeweiligen Versuchsreihe. Ausreißer sind als Kreise dargestellt.

Modifiziert nach Marocco et al. (2022).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die therapeutischen Wirkungen von Doxorubicin (DOX) sowie der 5-Aminolävulinsäure-vermittelten Photodynamischen Therapie (5-ALA-PDT) auf humane Zelllinien des Ewing-Sarkoms (ES) als Einzelbehandlung und in Kombination untersucht.

Derzeitige Behandlungsansätze für ES umfassen aggressive lokale und systemische Therapien, die eine starke Einschränkung der Lebensqualität von betroffenen Erkrankten zur Folge haben. Als Goldstandard hat sich in Europa eine Chemotherapie für lokalisierte Läsionen als Kombination aus Vincristin, Doxorubicin, Ifosfamid und Etoposid durchgesetzt (Brennan et al., 2022). Zusätzlich umfasst die Therapie von ES chirurgische Interventionen und adjuvante Bestrahlung. Obwohl dieses Vorgehen bei den meisten Erkrankten gut anspricht, bleiben die Prognosen für metastasierte Befunde ernüchternd. Weniger als 30% der Erkrankten überleben mehr als 5 Jahre, ungeachtet des angewandten Therapieregimes (Balamuth and Womer, 2010). Es besteht daher ein ungedeckter Bedarf an innovativen Therapieansätzen, um die konventionelle Therapie für ES zu ergänzen. Während sich die 5-ALA-basierte PDT als praktikable Therapieoption für die Behandlung verschiedener Krebsarten wie T-Zell-Lymphome oder Ösophaguskarzinome erwiesen hat (Kenan et al., 2020, Sando et al., 2020, Chen et al., 2011), ist ihr Einsatz in Sarkomen wie ES nicht hinreichend erforscht. Inwiefern ES sensibel auf eine 5-ALA-vermittelte PDT reagieren und ob die Wirkung durch die Kombination mit dem standardmäßig verwendeten Zytostatikum DOX verstärkt werden kann, galt es in dieser Arbeit zu untersuchen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde eine Vitalitätsbestimmung durchgeführt, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies gemessen und Veränderungen in der Zellelastizität am Rasterkraftmikroskop untersucht.

4.1 Vitalitätsbestimmung

Alle ES-Zelllinien wiesen mit steigender DOX- oder 5-ALA-Dosis eine verminderte Anzahl vitaler Tumorzellen auf. Die Reduktion der Vitalität zeigte sich hierbei zelllinienspezifisch sowie konzentrationsabhängig. Im Gegensatz

hierzu konnten keine signifikanten Abweichungen in der relativen Viabilität der Kontrollgruppe (MSC) beobachtet werden, abgesehen von der Höchstkonzentration von 100 nM DOX. Ausgehend vom bisherigen wissenschaftlichen Kenntnisstand unterstützen diese Ergebnisse die klinisch sichere Anwendung von 5-ALA (Peng et al., 1997, Higashikawa et al., 2025). Dass MSCs eine höhere Resistenz gegenüber Zytostatika wie DOX verglichen mit Tumorzellen aufweisen, geht ebenfalls aus vorigen Arbeiten heraus (Baxter-Holland and Dass, 2018). Diese Sensitivität scheint jedoch durch den Ursprung der MSCs beeinflusst zu werden (Gil-Chinchilla et al., 2024).

Im Vergleich der Monotherapien reagierten die untersuchten ES-Zelllinien insgesamt empfindlicher, aber mit ähnlichen Sensitivitäten untereinander auf die Behandlung mit DOX. Größere zelllinienspezifische Unterschiede wurden hingegen in der Belichtung von ES-Zellen beobachtet. Während die Applikation hoher Konzentrationen des Photosensibilisators 5-ALA bei der Zelllinie RD-ES in einem stark signifikanten Verlust der Lebensfähigkeit resultierte, zeigten sich A-673- und TC-71-Zellen weitaus resistenter gegenüber der 5-ALA-basierten PDT bei gleichen Konzentrationen. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit bestehenden Forschungsarbeiten, die für diese Therapiemodalität heterogene Sensitivitäten innerhalb verschiedener Zelllinien feststellten (Wilson et al., 1997). Dies gilt ebenso für die konzentrationsabhängige Wirksamkeit von 5-ALA, die bspw. für Ösophaguskarzinom-Zellen nachgewiesen wurde (Chen et al., 2011). Die Höhe der PS-Konzentration korreliert hierbei mit dem Ausmaß der Zellschädigung durch die PDT (Bacellar et al., 2015).

Die Kombinationstherapie von DOX und 5-ALA-basierter PDT erzielte insgesamt eine verbesserte zytotoxische Wirkung, insbesondere bei der Zelllinie TC-71. Ursächlich könnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber DOX sein, welche am ehesten durch genetische Faktoren beeinflusst wird (May et al., 2013). Ferner muss zwischen Zelltod und zellulärer Seneszenz differenziert werden, was durch die reine Vitalitätsmessung nicht hinreichend möglich ist. In seneszenten Zellen findet keine effektive Zellteilung mehr statt, wohingegen sich aggressive Tumorzellen durch eine gesteigerte Zellteilung auszeichnen (Wang et al., 2022). Es ist denkbar, dass die Kombinationstherapie vermehrt Zelltod statt Seneszenz

induziert und daher signifikante Vitalitätsreduktionen im Vergleich zu den Monotherapien zu verzeichnen sind. Es ist davon auszugehen, dass der Schweregrad der DNA-Schädigung beeinflusst, welchem Signalweg die Zellteilung folgt (Song et al., 2005). Der verstärkte Ablauf der Apoptose im Rahmen von Kombinationstherapien mit DOX und 5-ALA-basierter PDT zeigte sich bereits in anderen Studien (Kurokawa and Matsui, 2021, Sando et al., 2020).

4.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Abnormal erhöhte ROS-Level können auf Veränderungen im zellulären Stoffwechsel hinweisen, einen gesteigerten oxidativen Stress indizieren und somit die Entstehung und Aufrechterhaltung von Tumoren beeinflussen (Zhao et al., 2023). Während mäßig erhöhte ROS-Spiegel Tumorzellbildung begünstigen, gibt es toxisch-hohe ROS-Konzentrationen, die zur Zerstörung von Tumorzellen führen.

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies spielt eine zentrale Rolle im Wirkmechanismus der PDT. Neben der Beurteilung der Lebensfähigkeit von ES-Zelllinien wurde deshalb der oxidative Stress gemessen, den die Zellen durch die Behandlung mit DOX und/oder der 5-ALA-basierten PDT erfuhren. Analog zu den Ergebnissen der Vitalitätsbestimmung konnte eine verstärkte ROS-Produktion vor allem durch den kombinierten Therapieansatz beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führte die alleinige Applikation von DOX bei der Zelllinie RD-ES zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Abnahme der gemessenen ROS. Diese Tendenz steht konträr zum wissenschaftlichen Kenntnisstand, der eine vermehrte ROS-Produktion unter der Behandlung von DOX erwarten ließe (Meredith and Dass, 2016). Das Zytostatikum wirkt über eine Vielzahl an Mechanismen zytotoxisch, worunter die Bildung hochreaktiver Radikale und stabiler molekularer Oxidantien zu einer Schädigung von Zellkompartimenten führt. Diese Abweichung könnte durch den Zeitpunkt der ROS-Messung bedingt sein, der aufgrund des Versuchsaufbaus auf einen vordefinierten Zeitpunkt nach der Behandlung beschränkt wurde. Da die ROS-Analyse in dieser Studie zu einem festen Zeitpunkt nach der Behandlung erfolgte, könnten transiente ROS-Spitzen übersehen worden sein. In ähnlichen Studien wurde die höchste ROS-

Generierung oft innerhalb von 2–6 Stunden nach DOX-Applikation festgestellt (Du et al., 2025). Zudem legen aktuelle Forschungsergebnisse nahe, dass bestimmte Zelllinien, die durch DOX induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kompensieren können, indem sie antioxidative Adaptationsmechanismen wie eine erhöhte Expression von Superoxiddismutasen oder Glutathion-basierte Schutzsysteme aktivieren (Bharathiraja et al., 2025).

Da ein erhöhter ROS-Spiegel mit einer gravierenderen Zellschädigung einhergeht, wurde vor allem für die 5-ALA-sensitiven RD-ES-Zellen eine vermehrte ROS-Produktion angenommen. Interessanterweise reagierte nur die Zelllinie A-673 mit einer signifikanten ($p < 0,05$) Erhöhung des oxidativen Stresses auf die Belichtung nach 5-ALA-Applikation. Hierfür war aufgrund der abgeschwächten Empfindlichkeit gegenüber 5-ALA die höchste Konzentration verglichen mit den anderen Tumorzelllinien gewählt worden. Diese Ergebnisse könnten auf eine verzögerte Schädigung der A-673-Zellen hinweisen. Je länger Metabolite des PS auf eine Zelle einwirken können, desto höher scheint die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und somit das Ausmaß der Zellschädigung zu sein (Mazurek et al., 2022, Nakamura and Takada, 2021). Die Zeitabstände zwischen der 5-ALA-Inkubation und Messung der Viabilität sowie ROS-Produktion wurden zur besseren Vergleichbarkeit für alle Zelllinien einheitlich gewählt, könnten aber die Ergebnisse über die Wirksamkeit der 5-ALA-basierten PDT auf die einzelnen Zelllinien maßgeblich beeinflussen.

Während alle Tumorzelllinien mit einer signifikant ($p < 0,05$) erhöhten ROS-Produktion auf die kombinierte Therapie reagierten, zeigten TC-71-Zellen die größte Empfindlichkeit gegenüber der Behandlung. Mit einem ROS-Anstieg um etwa ein Fünffaches bei gleichzeitig bemerkenswerter Abnahme der Lebensfähigkeit kann von einer hohen zelllinienspezifischen Wirksamkeit der Therapie ausgegangen werden. Wie sensitiv der Stoffwechsel von Zellen auf externe Schädigung reagiert, hängt hierbei u. a. von zellulären Abwehrmechanismen ab. Ein nennenswertes, ROS-eliminierendes Antioxidans stellt hierbei Glutathion dar, das bei vermehrter Expression die schädigende

Wirkung von ROS durch Neutralisierung der reaktiven Moleküle abschwächt (Ming et al., 2021).

Bei Betrachtung der Kontrollgruppe (MSC) konnte kein vermehrter oxidativer Stress in Form von erhöhter ROS-Bildung festgestellt werden. Es wird vermutet, dass ROS in die Signalkaskaden zur Differenzierung der MSCs eingreifen und in höheren Mengen zu einem Stillstand des Zellzyklus führen können (Atashi et al., 2015). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Literatur, die MSCs eine intrinsisch hohe antioxidative Kapazität zuschreibt, vermittelt unter anderem durch die konstitutive Expression von Enzymen wie Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase (Abd-Rabou et al., 2025). Die Abwesenheit erhöhter ROS-Level in der Kontrollgruppe dient somit als interner Validitätsindikator für das Versuchsdesign, da sie bestätigt, dass die beobachteten Effekte in den Behandlungsgruppen nicht auf unspezifische oder methodenbedingte ROS-Generierung zurückzuführen sind. Diese Veränderungen konnten in Verbindung mit der Viabilitätsbestimmung weder belegt noch widerlegt werden. Dass unter den Behandlungen kein erhöhter oxidativer Stress verzeichnet wurde, deutet jedoch auf die selektive Schädigung der Tumorzellen hin.

4.3 Rasterkraftmikroskopie

Die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung zählt zu den essenziellen pathophysiologischen Veränderungen in der Tumorentwicklung (Hanahan and Weinberg, 2000).

Als wichtigster prognostischer Faktor spielt das Metastasierungsrisiko von ES eine zentrale Rolle in der Therapie und Nachsorge der Tumorerkrankten. Eine tumorfreie Resektion ist daher von essenzieller Bedeutung für die Lebenserwartung der Betroffenen. Nicht immer ist jene möglich. Gründe hierfür sind bspw. die Größe sowie Lokalisation des Tumors, die das chirurgische Eingreifen potenziell erschweren. Um eine Operation zu vereinfachen und das Metastasierungsrisiko zu senken, zählt die Induktionschemotherapie zum Goldstandard in der ES-Behandlung.

Ziel dieser Arbeit ist es, Weiterentwicklungsmöglichkeiten für das bestehende Therapie-Schema zu schaffen, sodass ohne zusätzliche Belastung für Erkrankte eine R0-Resektion gewährleistet werden kann. Hierfür sollten Tumorzellen, die bspw. am Resektionsrand verbleiben, unschädlich oder gar getötet werden.

Als Ergänzung zur Beurteilung der Funktionalität der ES-Zellen wurde mittels Elastizitätsmessungen das von den Tumorzellen ausgehende Metastasierungsrisiko näher untersucht. Da der mechanische Fingerabdruck von Zellen als Biomarker für das metastatische Potenzial angesehen wird, ohne spezifische Markierungen zu benötigen, können durch die Messung von Elastizitätsänderungen Aussagen über Invasivität und Streuverhalten von Tumorzellen getroffen werden (Luo et al., 2016, Kashani and Packirisamy, 2020). Zunehmend rückt die zelluläre Elastizität als sensitiver und „label-free“ nutzbarer Biomarker in den Fokus, der eine differenzierte Unterscheidung muskuloskelettaler Sarkomentitäten ermöglichen könnte, ohne auf externe Markierungsmethoden angewiesen zu sein (Daniel et al., 2023). Diese Erkenntnisse eröffnen neue Perspektiven für die nicht-invasive Tumordiagnostik und funktionelle Zellklassifikation im Rahmen mechanobiologischer Analysen (Xu et al., 2012).

Zellelastizitäten vor und nach der Behandlung mit DOX und/oder 5-ALA-basierter PDT wurden für drei ES-Zelllinien und eine Kontrollgruppe (MSCs) durchgeführt. Diese zeichneten sich im Vergleich zu den Tumorzellen durch eine allgemein niedrigere Elastizität aus, was auf die biomechanischen Eigenschaften von Tumorzellen zurückzuführen ist. Invasivität von Zellen ist unter anderem von der Fähigkeit abhängig, zwischen gesundem Gewebe zu migrieren und bspw. Gefäße zur weiteren Metastasierung zu infiltrieren. Daher ist eine hohe Elastizität charakteristisch für Tumorzellen mit hohem metastatischem Potenzial (Grady et al., 2016). Die Ergebnisse der AFM-Messungen zeigen außerdem einen signifikanten Verlust an Elastizität aller Tumorzelllinien nach der Einzelbehandlung von DOX und 5-ALA-vermittelter PDT sowie als kombinierten Therapieansatz. Dies weist auf eine verminderte Fähigkeit zur Invasivität und Migration der Tumorzellen hin und könnte im Rahmen der ES-Therapie in einer Prognosesteigerung resultieren (Lekka, 2016).

4.4 Einsatz der Photodynamischen Therapie

Die in dieser Arbeit verwendete Methodik zur Belichtung der Tumorzellen sollte sich zum einen an den potenziellen klinischen Gebrauch orientieren, musste zum anderen jedoch an die In-vitro-Bedingungen angepasst werden. Hierbei spielen eine Reihe von Faktoren eine bedeutende Rolle in der Wirksamkeit der PDT, die bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden müssen. So beeinflussen Rahmenbedingungen der Lichtexposition wie die Art der Lichtquelle, die Wellenlänge des Lichts, der Abstand zu den bestrahlten Zellen und die Dauer der Beleuchtung den Effekt der PDT. Beide Abläufe, in vivo und in vitro, können die jeweiligen Faktoren unterschiedlich stark einschränken. Die In-vivo-Anwendung der PDT ist durch die Eindringtiefe in das Tumorgewebe sowie die Anreicherung des jeweiligen PS begrenzt. Diese ist vor allem im hypoxischen Kern des Tumors durch den dort verfügbaren Sauerstoff unzureichend (Li et al., 2021). Eine homogene Beleuchtung aller Zellen stellt weiterhin für In-vivo-Experimente eine große Herausforderung dar. Ansätze wie die Verwendung diffuser Lichtleiter, computergestützte Lichtverteilungssimulationen sowie implantierbare Mikrosysteme bieten vielversprechende Lösungsstrategien zur Verbesserung der Lichtuniformität im Gewebe (Cui et al., 2023, Liu et al., 2024).

Trotz verzeichneter, signifikanter tumorzellschädigender Wirkung der PDT kann abgesehen vom Zelltod keine klare Aussage über den Stoffwechselzustand der Zelle getroffen werden. Die ROS-Produktion sowie Zellvitalität müssten näher zwischen Seneszenz und Apoptose abgrenzen, um die Wirkung der PDT weiter auf Zellebene zu ergründen.

Die Unversehrtheit der Kontrollgruppe (MSCs) bestätigt den sicheren Einsatz der 5-ALA-basierten PDT und zeigt sich im Einklang mit bisherigen Studienergebnissen (Peng et al., 1997, Bhattacharya et al., 2023). Die für die Experimente dieser Arbeit verwendete Lichtquelle findet bereits klinische Anwendung. Sie bietet die Grundlage für weitere Forschungsansätze mit dem Ziel, tumorfreie Operationsränder zu erzeugen, indem man chirurgische Verfahren mit Therapieansätzen wie der PDT kombiniert. Ferner kann durch die verstärkte antitumorale Wirkung mit Chemotherapeutika wie DOX ein insgesamt nebenwirkungsärmerer Therapieansatz verfolgt werden.

4.5 Limitationen der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der 5-ALA-basierten PDT auf verschiedene Ewing-Sarkom-Zelllinien unter In-vitro-Bedingungen untersucht. Hierbei handelt es sich um Monoschichten, also 2D-Zellkulturen. Diese sind nur annähernd mit 3D-Zellkulturen und Tiermodellen vergleichbar, welche den zellulären Interaktionen in soliden Tumoren entsprechen. Daher sind, um weitere Erkenntnisse über den Einsatz von 5-ALA-basierter PDT in Kombination mit DOX zu gewinnen, Experimente in vivo oder mit Hilfe von 3D-Zellkulturen bzw. Tiermodellen von zentraler Bedeutung.

Des Weiteren beeinflusst der Abstand zwischen der Lichtquelle und den Zielzellen sowie die Intensität und Dauer der Beleuchtung die Wirkung der Lichtquelle auf die Zellen. In Anbetracht dieser Variablen müsste der PDT-Aufbau für ES für künftige In-vivo-Experimente zunächst getestet und ggf. angepasst werden. Ebenso muss bei der Kombination verschiedener Therapieansätze beachtet werden, dass sowohl die Reihenfolge als auch die zeitlichen Abstände zueinander die Wirksamkeit beeinflussen können und letztlich die klinische Umsetzbarkeit modulieren. Ferner ist zu berücksichtigen, dass die Wahl des Photosensibilisators maßgeblichen Einfluss auf die Wirksamkeit der PDT haben könnte.

Nichtsdestotrotz stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang mit früheren Veröffentlichungen, die gezeigt haben, dass die PDT allein oder in Kombination mit Medikamenten wie DOX wirksam gegen verschiedene Krebszelllinien eingesetzt werden kann. So konnten einerseits erfolgreich Photosensibilisatoren gegen ES-Zellen angewendet werden (Sun et al., 2016), andererseits ließen sich unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber der PDT beobachten (Barron et al., 2013). Während Yousefi Sadeghloo, A. et al. bereits 2020 synergistische Effekte von PDT und DOX bei Brustkrebszellen nachweisen konnten (Yousefi Sadeghloo et al., 2020), zeigten weitere Untersuchungen von Cacaccio et al. die Überlegenheit einer kombinierten Behandlung von PDT und DOX in der Anwendung gegen Lungenkrebs (Cacaccio et al., 2022).

Trotz der weitverbreiteten Anwendung der Rasterkraftmikroskopie (AFM) zur Bestimmung zellulärer Steifigkeit sind bei der Interpretation der Messergebnisse einige methodische Limitationen zu berücksichtigen. Die absoluten Werte für die Steifigkeitsmessungen hängen von der Versuchsanordnung ab, z. B. von der Form und Größe der Spitze (Tip), der Messnadel (Cantilever), der Eindrückgeschwindigkeit und -tiefe und einer an die Form der Spitze angepassten Analyse in der verwendeten Modellanpassung (Costa and Yin, 1999, Qian and Zhao, 2018). Die gemessene Tendenz innerhalb eines Experiments bleibt von diesen Faktoren jedoch unbeeinflusst.

Die gewählte Methodik liefert grundlegende Erkenntnisse zur Wirksamkeit der untersuchten Therapieansätze. Diese Arbeit verdeutlicht das therapeutische Potenzial und schafft eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen bezüglich zellulärer Stoffwechselprozesse als auch deren Übertragung auf komplexere 3D-Modellsysteme.

4.6 Schlussfolgerung aus der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmalig den Nachweis zu erbringen, dass die 5-ALA-basierte PDT in mehreren Ewing-Sarkom-Zelllinien erfolgreich und sicher mit DOX kombiniert werden kann, um die therapeutische Wirksamkeit des Zytostatikums zu verstärken. Obwohl die untersuchten Zelllinien unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber der PDT zeigten, führte die Kombinationstherapie in allen Fällen zu einer signifikanten antitumoralen Wirkung. Die variierende Responsivität der getesteten Zelllinien auf die PDT spiegelt die biologische Realität wider und ist charakteristisch für die ausgeprägte Heterogenität solider Tumoren. Sowohl als eigenständige Therapie als auch in Kombination mit etablierten Behandlungsmethoden könnte die 5-ALA-vermittelte PDT ein vielversprechender Ansatz zur Tumorthherapie darstellen. Insbesondere erscheint es möglich, dass durch die Kombinationstherapie eine Reduktion der erforderlichen DOX-Dosis erzielt werden kann, was angesichts der bekannten dosisabhängigen Toxizität klinisch relevant wäre. Weitere präklinische und klinische Studien sind erforderlich, um diese Hypothese zu überprüfen und den therapeutischen Nutzen der Kombinationstherapie umfassend zu bewerten.

5 Zusammenfassung

Ewing-Sarkome (ES) stellen eine aggressive Gruppe von Knochentumoren dar, die vor allem im Kindes- und Jugendalter auftreten. Trotz intensiver multimodaler Therapiekonzepte – bestehend aus Chemotherapie, Tumorresektion und Strahlentherapie – gehen sie insbesondere bei metastasierten Verläufen mit einer ungünstigen Prognose einher. In der vorliegenden Arbeit wurde das therapeutische Potenzial der Photodynamischen Therapie (PDT) mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) in Kombination mit Doxorubicin (DOX) bei Ewing-Sarkomen untersucht. Ziel war es, zu analysieren, ob 5-ALA-vermittelte PDT die Wirksamkeit von DOX steigern kann, um potenziell neue Behandlungsstrategien für diese Tumorentität zu entwickeln.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden drei unterschiedliche humane ES-Zelllinien verwendet, an denen verschiedene Behandlungsansätze getestet wurden: DOX als Monotherapie, 5-ALA-basierte PDT sowie die Kombination beider Modalitäten. Die Bewertung der Therapieeffekte erfolgte nach der Behandlung anhand mehrerer Parameter, darunter die Zellviabilität (MTS-Assay), die Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie mechanische Eigenschaften der Zellen, letztere gemessen mithilfe der Rasterkraftmikroskopie (AFM).

Die Ergebnisse zeigten eine zelllinienabhängige Sensitivität gegenüber der PDT. Während einzelne Zelllinien bereits unter der PDT-Monotherapie deutliche Reduktionen der Vitalität zeigten, war die Kombination mit DOX in allen Zelllinien signifikant wirksamer als jede Einzeltherapie. Gleichzeitig wurde eine erhöhte ROS-Produktion sowie eine signifikante Steigerung der Zellsteifigkeit beobachtet, was auf strukturelle und zytoskelettäre Veränderungen der Tumorzellen hindeutet. Die Kombinationstherapie potenzierte die antitumorale Effizienz von DOX auf zellulärer Ebene.

Schlussfolgernd könnte die 5-ALA-basierte PDT eine vielversprechende Ergänzung zur konventionellen Chemotherapie bei ES darstellen. Die Ergebnisse unterstreichen die Relevanz biophysikalischer Parameter wie der Zellsteifigkeit als potenzielle Marker für therapeutisch induzierte Veränderungen. Da es sich um eine rein in vitro-basierte Studie handelt, bedarf es weiterer Untersuchungen in präklinischen Modellen sowie klinischer Studien, um die therapeutische Relevanz dieser Kombination zu validieren und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen näher zu beleuchten.

6 Literaturverzeichnis

- ABD-RABOU, A. A., ZOHEIR, K. M. A., ABDEL-ALEEM, G. A., OSMAN, A., ELSABAGH, D. T. & KISHTA, M. S. 2025. Silymarin/Silybin-functionalized Selenium Nanoparticles Suppress Lipopolysaccharide-induced Inflammation via PI3K/AKT/NF-kappaB Signaling Pathway Inhibition. *Chem Biodivers*, e00990.
- ABDEL-KADER, M. H. 2016. The Journey of PDT Throughout History: PDT from Pharos to Present. *Photodynamic Medicine: From Bench to Clinic*
- ABDI, H. 2007. The Bonferroni and Sidak corrections for multiple comparisons. In: SALKIND, N. J. (ed.) *Encyclopedia of measurement and statistics*. Thousand Oaks: Sage.
- AKTIPIS, C. A., BODDY, A. M., JANSEN, G., HIBNER, U., HOCHBERG, M. E., MALEY, C. C. & WILKINSON, G. S. 2015. Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370.
- ALLISON, R. R. & MOGHISSI, K. 2013. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc*, 46, 24-9.
- ANIOGO, E. C., GEORGE, B. P. A. & ABRAHAMSE, H. 2017. In vitro combined effect of Doxorubicin and sulfonated zinc Phthalocyanine-mediated photodynamic therapy on MCF-7 breast cancer cells. *Tumour Biol*, 39, 1010428317727278.
- ARCAMONE, F., CASSINELLI, G., FANTINI, G., GREIN, A., OREZZI, P., POL, C. & SPALLA, C. 1969. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceitius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*, 11, 1101-10.
- ATASHI, F., MODARRESSI, A. & PEPPER, M. S. 2015. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev*, 24, 1150-63.
- BACCI, G., LONGHI, A., FERRARI, S., MERCURI, M., VERSARI, M. & BERTONI, F. 2006. Prognostic factors in non-metastatic Ewing's sarcoma tumor of bone: an analysis of 579 patients treated at a single institution with adjuvant or neoadjuvant chemotherapy between 1972 and 1998. *Acta Oncol*, 45, 469-75.
- BACCI, G., TONI, A., AVELLA, M., MANFRINI, M., SUDANESE, A., CIARONI, D., BORIANI, S., EMILIANI, E. & CAMPANACCI, M. 1989. Long-term results in 144 localized Ewing's sarcoma patients treated with combined therapy. *Cancer*, 63, 1477-86.
- BACELLAR, I. O., TSUBONE, T. M., PAVANI, C. & BAPTISTA, M. S. 2015. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *Int J Mol Sci*, 16, 20523-59.
- BALAMUTH, N. J. & WOMER, R. B. 2010. Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol*, 11, 184-92.
- BARRON, G. A., MOSELEY, H. & WOODS, J. A. 2013. Differential sensitivity in cell lines to photodynamic therapy in combination with ABCG2 inhibition. *J Photochem Photobiol B*, 126, 87-96.

- BATTULA, V. L., TREML, S., BAREISS, P. M., GIESEKE, F., ROELOFS, H., DE ZWART, P., MULLER, I., SCHEWE, B., SKUTELLA, T., FIBBE, W. E., KANZ, L. & BUHRING, H. J. 2009. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica*, 94, 173-84.
- BAXTER-HOLLAND, M. & DASS, C. R. 2018. Doxorubicin, mesenchymal stem cell toxicity and antitumour activity: implications for clinical use. *J Pharm Pharmacol*, 70, 320-327.
- BERNSTEIN, M., KOVAR, H., PAULUSSEN, M., RANDALL, R. L., SCHUCK, A., TEOT, L. A. & JUERGENS, H. 2006. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist*, 11, 503-19.
- BERNUZZI, F., RECALCATI, S., ALBERGHINI, A. & CAIRO, G. 2009. Reactive oxygen species-independent apoptosis in doxorubicin-treated H9c2 cardiomyocytes: role for heme oxygenase-1 down-modulation. *Chem Biol Interact*, 177, 12-20.
- BHARATHIRAJA, P., BASKAR, S. & PRASAD, N. R. 2025. Solasodine Downregulates ABCB1 Overexpression in Multidrug Resistant Cancer Cells Via Inhibiting Nrf2/Keap1 Signaling Pathway. *J Cell Biochem*, 126, e30674.
- BHATTACHARYA, S., PRAJAPATI, B. G., SINGH, S. & ANJUM, M. M. 2023. Nanoparticles drug delivery for 5-aminolevulinic acid (5-ALA) in photodynamic therapy (PDT) for multiple cancer treatment: a critical review on biosynthesis, detection, and therapeutic applications. *J Cancer Res Clin Oncol*, 149, 17607-17634.
- BINNIG, G., QUATE, C. F. & GERBER, C. 1986. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 56, 930-933.
- BOUTRY, J., TISSOT, S., UJVARI, B., CAPP, J. P., GIRAUDEAU, M., NEDELCO, A. M. & THOMAS, F. 2022. The evolution and ecology of benign tumors. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1877, 188643.
- BRENNAN, B., KIRTON, L., MAREC-BERARD, P., GASPARD, N., LAURENCE, V., MARTIN-BROTO, J., SASTRE, A., GELDERBLUM, H., OWENS, C., FENWICK, N., STRAUSS, S., MOROZ, V., WHELAN, J. & WHEATLEY, K. 2022. Comparison of two chemotherapy regimens in patients with newly diagnosed Ewing sarcoma (EE2012): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet*, 400, 1513-1521.
- CACACCIO, J. C., DURRANI, F. A., MISSERT, J. R. & PANDEY, R. K. 2022. Photodynamic Therapy in Combination with Doxorubicin Is Superior to Monotherapy for the Treatment of Lung Cancer. *Biomedicines*, 10.
- CALIXTO, G. M., BERNEGOSSI, J., DE FREITAS, L. M., FONTANA, C. R. & CHORILLI, M. 2016. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Molecules*, 21, 342.
- CARMICHAEL, J., DEGRAFF, W. G., GAZDAR, A. F., MINNA, J. D. & MITCHELL, J. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 47, 936-42.
- CASSINELLI, G. 2016. The roots of modern oncology: from discovery of new antitumor anthracyclines to their clinical use. *Tumori*, 2016, 226-35.

- CASTANO, A. P., DEMIDOVA, T. N. & HAMBLIN, M. R. 2004. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 1, 279-93.
- CHEN, X., ZHAO, P., CHEN, F., LI, L. & LUO, R. 2011. Effect and mechanism of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in esophageal cancer. *Lasers Med Sci*, 26, 69-78.
- COLDITZ, M. J., LEYEN, K. & JEFFREE, R. L. 2012. Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 2: theoretical, biochemical and practical aspects. *J Clin Neurosci*, 19, 1611-6.
- COLE, S. P. 1986. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol*, 17, 259-63.
- COSTA, K. D. & YIN, F. C. 1999. Analysis of indentation: implications for measuring mechanical properties with atomic force microscopy. *J Biomech Eng*, 121, 462-71.
- CRIFE, T. P. 2011. Ewing sarcoma: an eponym window to history. *Sarcoma*, 2011, 457532.
- CUI, X., LI, X., PENG, C., QIU, Y., SHI, Y., LIU, Y. & FEI, J. F. 2023. Beyond External Light: On-Spot Light Generation or Light Delivery for Highly Penetrated Photodynamic Therapy. *ACS Nano*, 17, 20776-20803.
- DALTON, J. T., YATES, C. R., YIN, D., STRAUGHN, A., MARCUS, S. L., GOLUB, A. L. & MEYER, M. C. 2002. Clinical pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid in healthy volunteers and patients at high risk for recurrent bladder cancer. *J Pharmacol Exp Ther*, 301, 507-12.
- DANALACHE, M. 2020. *Biomechanical assessment of osteoarthritic articular cartilage and jaw periosteal cells-based bone constructs*. Eberhard Karls Universität Tübingen
- DANIEL, C., TRAUB, F., SACHSENMAIER, S., RIESTER, R., MEDERAKE, M., KONRADS, C. & DANALACHE, M. 2023. An exploratory study of cell stiffness as a mechanical label-free biomarker across multiple musculoskeletal sarcoma cells. *BMC Cancer*, 23, 862.
- DELATTRE, O., ZUCMAN, J., MELOT, T., GARAU, X. S., ZUCKER, J. M., LENOIR, G. M., AMBROS, P. F., SHEER, D., TURC-CAREL, C., TRICHE, T. J. & ET AL. 1994. The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med*, 331, 294-9.
- DESAI, S. S. & JAMBHEKAR, N. A. 2010. Pathology of Ewing's sarcoma/PNET: Current opinion and emerging concepts. *Indian J Orthop*, 44, 363-8.
- DIEZ, B., ERNST, G., TEIJO, M. J., BATLLE, A., HAJOS, S. & FUKUDA, H. 2012. Combined chemotherapy and ALA-based photodynamic therapy in leukemic murine cells. *Leuk Res*, 36, 1179-84.
- DIRKSEN, U. 2022. *S1-Leitlinie: Ewing-Sarkom des Kindes- und Jugendalters* [Online]. Available: https://register.awmf.org/assets/guidelines/025-006|_S1_Ewing-Sarkom-Kinder_-Jugendliche_2022-02_01.pdf [Accessed].

- DOUGHERTY, T. J., GOMER, C. J., HENDERSON, B. W., JORI, G., KESSEL, D., KORBELIK, M., MOAN, J. & PENG, Q. 1998. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*, 90, 889-905.
- DU, S., LI, L., KOU, J., ZHU, T., SONG, Z., ZHAN, Y., WU, D. & ZHAN, W. 2025. Blackberry-Like Doxorubicin Loaded Hyaluronic Acid/Zinc Phthalocyanine Loaded Mesoporous Silica Nanocomposites for Long-Term Tumor Photodynamic and Chemotherapy Synergistic Therapy. *Int J Nanomedicine*, 20, 9111-9134.
- ENNEKING, W. F. & DUNHAM, W. K. 1978. Resection and reconstruction for primary neoplasms involving the innominate bone. *J Bone Joint Surg Am*, 60, 731-46.
- ESIASHVILI, N., GOODMAN, M. & MARCUS, R. B., JR. 2008. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol*, 30, 425-30.
- FRANK, J., LORNEJAD-SCHAFER, M. R., SCHOFFL, H., FLACCUS, A., LAMBERT, C. & BIESALSKI, H. K. 2007. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of melanoma cells to ALA-based photodynamic therapy. *Int J Oncol*, 31, 1539-45.
- FREITAS, I. 1990. Lipid accumulation: the common feature to photosensitizer-retaining normal and malignant tissues. *J Photochem Photobiol B*, 7, 359-61.
- GARGALLO, P., YANEZ, Y., JUAN, A., SEGURA, V., BALAGUER, J., TORRES, B., OLTRA, S., CASTEL, V. & CANETE, A. 2020. Review: Ewing Sarcoma Predisposition. *Pathol Oncol Res*, 26, 2057-2066.
- GARTRELL, J. & RODRIGUEZ-GALINDO, C. 2021. Ewing sarcoma: investigational mono- and combination therapies in clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs*, 30, 653-663.
- GASPAR, N., HAWKINS, D. S., DIRKSEN, U., LEWIS, I. J., FERRARI, S., LE DELEY, M. C., KOVAR, H., GRIMER, R., WHELAN, J., CLAUDE, L., DELATTRE, O., PAULUSSEN, M., PICCI, P., SUNDBY HALL, K., VAN DEN BERG, H., LADENSTEIN, R., MICHON, J., HJORTH, L., JUDSON, I., LUKSCH, R., BERNSTEIN, M. L., MAREC-BERARD, P., BRENNAN, B., CRAFT, A. W., WOMER, R. B., JUERGENS, H. & OBERLIN, O. 2015. Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *J Clin Oncol*, 33, 3036-46.
- GAUSEPOHL, T., PENNIG, D., HECK, S., GICK, S., VEGT, P. A. & BLOCK, J. E. 2017. Effective Management of Bone Fractures with the Illuminoss(R) Photodynamic Bone Stabilization System: Initial Clinical Experience from the European Union Registry. *Orthop Rev (Pavia)*, 9, 6988.
- GIESSIBL, F. J. 2021. Probing the Nature of Chemical Bonds by Atomic Force Microscopy. *Molecules*, 26.
- GIL-CHINCHILLA, J. I., ZAPATA, A. G., MORALEDA, J. M. & GARCIA-BERNAL, D. 2024. Bioengineered Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Anti-Cancer Therapy: Current Trends and Future Prospects. *Biomolecules*, 14.
- GIOVANNINI, M., BIEGEL, J. A., SERRA, M., WANG, J. Y., WEI, Y. H., NYCUM, L., EMANUEL, B. S. & EVANS, G. A. 1994. EWS-erg and

- EWS-Flil1 fusion transcripts in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors with variant translocations. *J Clin Invest*, 94, 489-96.
- GRADY, M. E., COMPOSTO, R. J. & ECKMANN, D. M. 2016. Cell elasticity with altered cytoskeletal architectures across multiple cell types. *J Mech Behav Biomed Mater*, 61, 197-207.
- GRANADOS-PRINCIPAL, S., QUILES, J. L., RAMIREZ-TORTOSA, C. L., SANCHEZ-ROVIRA, P. & RAMIREZ-TORTOSA, M. C. 2010. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food Chem Toxicol*, 48, 1425-38.
- GROBNER, S. N., WORST, B. C., WEISCHENFELDT, J., BUCHHALTER, I., KLEINHEINZ, K., RUDNEVA, V. A., JOHANN, P. D., BALASUBRAMANIAN, G. P., SEGURA-WANG, M., BRABETZ, S., BENDER, S., HUTTER, B., STURM, D., PFAFF, E., HUBSCHMANN, D., ZIPPRICH, G., HEINOLD, M., EILS, J., LAWERENZ, C., ERKEK, S., LAMBO, S., WASZAK, S., BLATTMANN, C., BORKHARDT, A., KUHLEN, M., EGGERT, A., FULDA, S., GESSLER, M., WEGERT, J., KAPPLER, R., BAUMHOER, D., BURDACH, S., KIRSCHNER-SCHWABE, R., KONITNY, U., KULOZIK, A. E., LOHMANN, D., HETTNER, S., ECKERT, C., BIELACK, S., NATHRATH, M., NIEMEYER, C., RICHTER, G. H., SCHULTE, J., SIEBERT, R., WESTERMANN, F., MOLENAAR, J. J., VASSAL, G., WITT, H., PROJECT, I. P.-S., PROJECT, I. M.-S., BURKHARDT, B., KRATZ, C. P., WITT, O., VAN TILBURG, C. M., KRAMM, C. M., FLEISCHHACK, G., DIRKSEN, U., RUTKOWSKI, S., FRUHWALD, M., VON HOFF, K., WOLF, S., KLINGEBIEL, T., KOSCIELNIAK, E., LANDGRAF, P., KOSTER, J., RESNICK, A. C., ZHANG, J., LIU, Y., ZHOU, X., WAANDERS, A. J., ZWIJNENBURG, D. A., RAMAN, P., BRORS, B., WEBER, U. D., NORTHCOTT, P. A., PAJTLER, K. W., KOOL, M., PIRO, R. M., KORBEL, J. O., SCHLESNER, M., EILS, R., JONES, D. T. W., LICHTER, P., CHAVEZ, L., ZAPATKA, M. & PFISTER, S. M. 2018. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*, 555, 321-327.
- GRUNEWALD, T. G., BERNARD, V., GILARDI-HEBENSTREIT, P., RAYNAL, V., SURDEZ, D., AYNAUD, M. M., MIRABEAU, O., CIDRE-ARANAZ, F., TIRODE, F., ZAIDI, S., PEROT, G., JONKER, A. H., LUCCHESI, C., LE DELEY, M. C., OBERLIN, O., MAREC-BERARD, P., VERON, A. S., REYNAUD, S., LAPOUBLE, E., BOEVA, V., RIO FRIO, T., ALONSO, J., BHATIA, S., PIERRON, G., CANCEL-TASSIN, G., CUSSENOT, O., COX, D. G., MORTON, L. M., MACHIELA, M. J., CHANOCK, S. J., CHARNAY, P. & DELATTRE, O. 2015. Chimeric EWSR1-FLI1 regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene EGR2 via a GGAA microsatellite. *Nat Genet*, 47, 1073-8.
- HAEUSLER, J., RANFT, A., BOELLING, T., GOSHEGER, G., BRAUN-MUNZINGER, G., VIETH, V., BURDACH, S., VAN DEN BERG, H., JUERGENS, H. & DIRKSEN, U. 2010. The value of local treatment in patients with primary, disseminated, multifocal Ewing sarcoma (PDMES). *Cancer*, 116, 443-50.

- HAN, J., YANG, W., LI, Y., LI, J., JIANG, F., XIE, J. & HUANG, X. 2022. Combining Doxorubicin-Conjugated Polymeric Nanoparticles and 5-Aminolevulinic Acid for Enhancing Radiotherapy against Lung Cancer. *Bioconjug Chem*, 33, 654-665.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HEINEMANN, M., HOFFMANN, C., HARDES, J., GUDER, W., STREITBURGER, A., GOTTE, M., WELZ, T. L., JURGENS, H., RANFT, A., VIETH, V., WECKESSER, M., SCHAFERS, M., STEGGER, L. & DIRKSEN, U. 2021. Pain in survivors of Ewing sarcoma: Prevalence, associated factors and prediction of recurrence. *Pediatr Blood Cancer*, 68, e28801.
- HIENTZ, K., MOHR, A., BHAKTA-GUHA, D. & EFFERTH, T. 2017. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget*, 8, 8921-8946.
- HIGASHIKAWA, F., ITO, H. & TANAKA, T. 2025. Safety of Oral Administration of 5-Aminolevulinic Acid Phosphate Combined with Ferrous Iron in Healthy Subjects: An Open-Label Trial. *Scientia Pharmaceutica*, 93, 5.
- HUANG, H. Y., ILLEI, P. B., ZHAO, Z., MAZUMDAR, M., HUVOS, A. G., HEALEY, J. H., WEXLER, L. H., GORLICK, R., MEYERS, P. & LADANYI, M. 2005. Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol*, 23, 548-58.
- HUANG, Z., XU, H., MEYERS, A. D., MUSANI, A. I., WANG, L., TAGG, R., BARQAWI, A. B. & CHEN, Y. K. 2008. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors--potential and technical challenges. *Technol Cancer Res Treat*, 7, 309-20.
- JOHNSON, K. J., CAROZZA, S. E., CHOW, E. J., FOX, E. E., HOREL, S., MCLAUGHLIN, C. C., MUELLER, B. A., PUUMALA, S. E., REYNOLDS, P., VON BEHREN, J. & SPECTOR, L. G. 2009. Parental age and risk of childhood cancer: a pooled analysis. *Epidemiology*, 20, 475-83.
- JOSHI, D. C. & BAKOWSKA, J. C. 2011. Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons. *J Vis Exp*.
- KAHLE, E. R., PATEL, N., SREENIVASAPPA, H. B., MARCOLONGO, M. S. & HAN, L. 2022. Targeting cell-matrix interface mechanobiology by integrating AFM with fluorescence microscopy. *Prog Biophys Mol Biol*, 176, 67-81.
- KASHANI, A. S. & PACKIRISAMY, M. 2020. Cancer cells optimize elasticity for efficient migration. *R Soc Open Sci*, 7, 200747.
- KENAN, S., LIANG, H., GOODMAN, H. J., JACOBS, A. J., CHAN, A., GRANDE, D. A. & LEVIN, A. S. 2020. 5-Aminolevulinic acid tumor paint and photodynamic therapy for myxofibrosarcoma: an in vitro study. *J Orthop Surg Res*, 15, 94.
- KENNEDY, J. C., POTTIER, R. H. & PROSS, D. C. 1990. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B*, 6, 143-8.

- KESSEL, D. & OLEINICK, N. L. 2018. Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. *Photochem Photobiol*, 94, 213-218.
- KIM, C. H., CHUNG, C. W., CHOI, K. H., YOO, J. J., KIM, D. H., JEONG, Y. I. & KANG, D. H. 2011. Effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy via reactive oxygen species in human cholangiocarcinoma cells. *Int J Nanomedicine*, 6, 1357-63.
- KUROKAWA, H. & MATSUI, H. 2021. The Cytotoxicity of Doxorubicin Can Be Accelerated by a Combination of Hyperthermia and 5-Aminolevulinic Acid. *Antioxidants (Basel)*, 10.
- LADENSTEIN, R., POTSCHEGER, U., LE DELEY, M. C., WHELAN, J., PAULUSSEN, M., OBERLIN, O., VAN DEN BERG, H., DIRKSEN, U., HJORTH, L., MICHON, J., LEWIS, I., CRAFT, A. & JURGENS, H. 2010. Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J Clin Oncol*, 28, 3284-91.
- LE DELEY, M. C., DELATTRE, O., SCHAEFER, K. L., BURCHILL, S. A., KOEHLER, G., HOGENDOORN, P. C., LION, T., POREMBA, C., MARANDET, J., BALLEST, S., PIERRON, G., BROWNHILL, S. C., NESSLBOCK, M., RANFT, A., DIRKSEN, U., OBERLIN, O., LEWIS, I. J., CRAFT, A. W., JURGENS, H. & KOVAR, H. 2010. Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol*, 28, 1982-8.
- LEAVEY, P. J. & COLLIER, A. B. 2008. Ewing sarcoma: prognostic criteria, outcomes and future treatment. *Expert Rev Anticancer Ther*, 8, 617-24.
- LEKKA, M. 2016. Discrimination Between Normal and Cancerous Cells Using AFM. *Bionanoscience*, 6, 65-80.
- LEONARD, R. C., WILLIAMS, S., TULPULE, A., LEVINE, A. M. & OLIVEROS, S. 2009. Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: focus on liposomal doxorubicin (Myocet). *Breast*, 18, 218-24.
- LI, W. P., YEN, C. J., WU, B. S. & WONG, T. W. 2021. Recent Advances in Photodynamic Therapy for Deep-Seated Tumors with the Aid of Nanomedicine. *Biomedicines*, 9.
- LIU, J., SUN, B., LI, W., KIM, H. J., GAN, S. U., HO, J. S., RAHMAT, J. N. B. & ZHANG, Y. 2024. Wireless sequential dual light delivery for programmed PDT in vivo. *Light Sci Appl*, 13, 113.
- LIU, Y., LIU, H., WANG, L., WANG, Y., ZHANG, C., WANG, C., YAN, Y., FAN, J., XU, G. & ZHANG, Q. 2020. Amplification of oxidative stress via intracellular ROS production and antioxidant consumption by two natural drug-encapsulated nanoagents for efficient anticancer therapy. *Nanoscale Adv*, 2, 3872-3881.
- LUO, Q., KUANG, D., ZHANG, B. & SONG, G. 2016. Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility. *Biochim Biophys Acta*, 1860, 1953-60.
- MADI, S., CHOTTA, S. & ZEICHEN, J. 2023. A Novel Technique for Treatment of Peri-Implant Tibial Shaft Fracture with Pre-Existing Bimalleolar Ankle Fracture with a Combination of IlluminOss® Photodynamic Bone Stabilization System and Osteosynthesis. *International Journal of Foot and Ankle*, 7, 5.

- MARTINEZ-RAMIREZ, A., RODRIGUEZ-PERALES, S., MELENDEZ, B., MARTINEZ-DELGADO, B., URIOSTE, M., CIGUDOSA, J. C. & BENITEZ, J. 2003. Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques. *Cancer Genet Cytogenet*, 141, 138-42.
- MAY, W. A., GRIGORYAN, R. S., KESHELAVA, N., CABRAL, D. J., CHRISTENSEN, L. L., JENABI, J., JI, L., TRICHE, T. J., LAWLOR, E. R. & REYNOLDS, C. P. 2013. Characterization and drug resistance patterns of Ewing's sarcoma family tumor cell lines. *PLoS One*, 8, e80060.
- MAZUREK, M., SZCZEPANEK, D., ORZYLOWSKA, A. & ROLA, R. 2022. Analysis of Factors Affecting 5-ALA Fluorescence Intensity in Visualizing Glial Tumor Cells-Literature Review. *Int J Mol Sci*, 23.
- MEREDITH, A. M. & DASS, C. R. 2016. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *J Pharm Pharmacol*, 68, 729-41.
- MING, L., CHENG, K., CHEN, Y., YANG, R. & CHEN, D. 2021. Enhancement of tumor lethality of ROS in photodynamic therapy. *Cancer Med*, 10, 257-268.
- MINOTTI, G., RECALCATI, S., MENNA, P., SALVATORELLI, E., CORNA, G. & CAIRO, G. 2004. Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms. *Methods Enzymol*, 378, 340-61.
- MIRABELLO, L., TROISI, R. J. & SAVAGE, S. A. 2009. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int J Cancer*, 125, 229-34.
- MOAN, J. 1986. Porphyrin photosensitization and phototherapy. *Photochem Photobiol*, 43, 681-90.
- MOEENDARBARY, E. & HARRIS, A. R. 2014. Cell mechanics: principles, practices, and prospects. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 6, 371-88.
- MONTCEL, B., MAHIEU-WILLIAME, L., ARMOIRY, X., MEYRONET, D. & GUYOTAT, J. 2013. Two-peaked 5-ALA-induced PpIX fluorescence emission spectrum distinguishes glioblastomas from low grade gliomas and infiltrative component of glioblastomas. *Biomed Opt Express*, 4, 548-58.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- NAHABEDIAN, M. Y., COHEN, R. A., CONTINO, M. F., TEREM, T. M., WRIGHT, W. H., BERNS, M. W. & WILE, A. G. 1988. Combination cytotoxic chemotherapy with cisplatin or doxorubicin and photodynamic therapy in murine tumors. *J Natl Cancer Inst*, 80, 739-43.
- NAKAMURA, H. & TAKADA, K. 2021. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Sci*, 112, 3945-3952.
- NICOLETTO, R. E. & OFNER, C. M., 3RD 2022. Cytotoxic mechanisms of doxorubicin at clinically relevant concentrations in breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 89, 285-311.

- NOVA, Z., SKOVIEROVA, H., STRNADEL, J., HALASOVA, E. & CALKOVSKA, A. 2020. Short-Term versus Long-Term Culture of A549 Cells for Evaluating the Effects of Lipopolysaccharide on Oxidative Stress, Surfactant Proteins and Cathelicidin LL-37. *Int J Mol Sci*, 21.
- OLIVER, W. C. & PHARR, G. M. 1992. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research*, 7, 1564-1583.
- OZAKI, T. 2015. Diagnosis and treatment of Ewing sarcoma of the bone: a review article. *J Orthop Sci*, 20, 250-63.
- PARKIN, D. M., STILLER, C. A. & NECTOUX, J. 1993. International variations in the incidence of childhood bone tumours. *Int J Cancer*, 53, 371-6.
- PENG, Q., WARLOE, T., BERG, K., MOAN, J., KONGSHAUG, M., GIERCKSKY, K. E. & NESLAND, J. M. 1997. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer*, 79, 2282-308.
- PENG, Q., WARLOE, T., MOAN, J., GODAL, A., APRICENA, F., GIERCKSKY, K. E. & NESLAND, J. M. 2001. Antitumor effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can be enhanced by the use of a low dose of photofrin in human tumor xenografts. *Cancer Res*, 61, 5824-32.
- POTRATZ, J., DIRKSEN, U., JURGENS, H. & CRAFT, A. 2012. Ewing sarcoma: clinical state-of-the-art. *Pediatr Hematol Oncol*, 29, 1-11.
- QIAN, L. & ZHAO, H. 2018. Nanoindentation of Soft Biological Materials. *Micromachines (Basel)*, 9.
- RANDALL, R. L., LESSNICK, S. L., JONES, K. B., GOUW, L. G., CUMMINGS, J. E., CANNON-ALBRIGHT, L. & SCHIFFMAN, J. D. 2010. Is There a Predisposition Gene for Ewing's Sarcoma? *J Oncol*, 2010, 397632.
- RIESTER, R. 2013. Protokoll Kultivierung von MSC Stand 18-04-2013. *Zellbiologisches Forschungslabor der Orthopädischen Klinik Tübingen*.
- RIVANKAR, S. 2014. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther*, 10, 853-8.
- ROSEN, G., WOLLNER, N., TAN, C., WU, S. J., HAJDU, S. I., CHAM, W., D'ANGIO, G. J. & MURPHY, M. L. 1974. Proceedings: Disease-free survival in children with Ewing's sarcoma treated with radiation therapy and adjuvant four-drug sequential chemotherapy. *Cancer*, 33, 384-93.
- ROSS, K. A., SMYTH, N. A., MURAWSKI, C. D. & KENNEDY, J. G. 2013. The biology of ewing sarcoma. *ISRN Oncol*, 2013, 759725.
- SAI, D. L., LEE, J., NGUYEN, D. L. & KIM, Y. P. 2021. Tailoring photosensitive ROS for advanced photodynamic therapy. *Exp Mol Med*, 53, 495-504.
- SANDO, Y., MATSUOKA, K. I., SUMII, Y., KONDO, T., IKEGAWA, S., SUGIURA, H., NAKAMURA, M., IWAMOTO, M., MEGURI, Y., ASADA, N., ENNISHI, D., NISHIMORI, H., FUJII, K., FUJII, N., UTSUNOMIYA, A., OKA, T. & MAEDA, Y. 2020. 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can target aggressive adult T cell leukemia/lymphoma resistant to conventional chemotherapy. *Sci Rep*, 10, 17237.
- SONG, Y. S., LEE, B. Y. & HWANG, E. S. 2005. Distinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis. *Mech Ageing Dev*, 126, 580-90.

- SORENSEN, P. H., LESSNICK, S. L., LOPEZ-TERRADA, D., LIU, X. F., TRICHE, T. J. & DENNY, C. T. 1994. A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet*, 6, 146-51.
- STAHL, M., RANFT, A., PAULUSSEN, M., BOLLING, T., VIETH, V., BIELACK, S., GORTITZ, I., BRAUN-MUNZINGER, G., HARDES, J., JURGENS, H. & DIRKSEN, U. 2011. Risk of recurrence and survival after relapse in patients with Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 57, 549-53.
- SUBBIAH, V., ANDERSON, P., LAZAR, A. J., BURDETT, E., RAYMOND, K. & LUDWIG, J. A. 2009. Ewing's sarcoma: standard and experimental treatment options. *Curr Treat Options Oncol*, 10, 126-40.
- SUN, M., ZHOU, C., ZENG, H., YIN, F., WANG, Z., YAO, J., HUA, Y. & CAI, Z. 2016. Benzochloroporphyrin derivative photosensitizer-mediated photodynamic therapy for Ewing sarcoma. *J Photochem Photobiol B*, 160, 178-84.
- TACAR, O., SRIAMORNSAK, P. & DASS, C. R. 2013. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*, 65, 157-70.
- TEWEY, K. M., ROWE, T. C., YANG, L., HALLIGAN, B. D. & LIU, L. F. 1984. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*, 226, 466-8.
- TURC-CAREL, C., AURIAS, A., MUGNERET, F., LIZARD, S., SIDANER, I., VOLK, C., THIERY, J. P., OLSCHWANG, S., PHILIP, I., BERGER, M. P. & ET AL. 1988. Chromosomes in Ewing's sarcoma. I. An evaluation of 85 cases of remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet*, 32, 229-38.
- VARELA-LOPEZ, A., BATTINO, M., NAVARRO-HORTAL, M. D., GIAMPIERI, F., FORBES-HERNANDEZ, T. Y., ROMERO-MARQUEZ, J. M., COLLADO, R. & QUILES, J. L. 2019. An update on the mechanisms related to cell death and toxicity of doxorubicin and the protective role of nutrients. *Food Chem Toxicol*, 134, 110834.
- VIJI BABU, P. K., RIANNA, C., MIRASTSCHIJSKI, U. & RADMACHER, M. 2019. Nano-mechanical mapping of interdependent cell and ECM mechanics by AFM force spectroscopy. *Sci Rep*, 9, 12317.
- WANG, J. J., CORTES, E., SINKS, L. F. & HOLLAND, J. F. 1971. Therapeutic effect and toxicity of adriamycin in patients with neoplastic disease. *Cancer*, 28, 837-43.
- WANG, L., LANKHORST, L. & BERNARDS, R. 2022. Exploiting senescence for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer*, 22, 340-355.
- WIDHE, B. & WIDHE, T. 2000. Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am*, 82, 667-74.
- WILKINS, R. M., PRITCHARD, D. J., BURGERT, E. O., JR. & UNNI, K. K. 1986. Ewing's sarcoma of bone. Experience with 140 patients. *Cancer*, 58, 2551-5.
- WILSON, B. C., OLIVO, M. & SINGH, G. 1997. Subcellular localization of Photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to

- photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 65, 166-76.
- WOMER, R. B., WEST, D. C., KRAILO, M. D., DICKMAN, P. S., PAWEL, B. R., GRIER, H. E., MARCUS, K., SAILER, S., HEALEY, J. H., DORMANS, J. P. & WEISS, A. R. 2012. Randomized controlled trial of interval-compressed chemotherapy for the treatment of localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*, 30, 4148-54.
- XU, W., MEZENCEV, R., KIM, B., WANG, L., MCDONALD, J. & SULCHEK, T. 2012. Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *PLoS One*, 7, e46609.
- YOUSEFI SADEGHLOO, A., KHORSANDI, K. & KIANMEHR, Z. 2020. Synergistic effect of photodynamic treatment and doxorubicin on triple negative breast cancer cells. *Photochem Photobiol Sci*, 19, 1580-1589.
- ZHAO, N., WOODLE, M. C. & MIXSON, A. J. 2018. Advances in delivery systems for doxorubicin. *J Nanomed Nanotechnol*, 9.
- ZHAO, Y., YE, X., XIONG, Z., IHSAN, A., ARES, I., MARTINEZ, M., LOPEZ-TORRES, B., MARTINEZ-LARRANAGA, M. R., ANADON, A., WANG, X. & MARTINEZ, M. A. 2023. Cancer Metabolism: The Role of ROS in DNA Damage and Induction of Apoptosis in Cancer Cells. *Metabolites*, 13.
- ZOLLNER, S. K., AMATRUDA, J. F., BAUER, S., COLLAUD, S., DE ALAVA, E., DUBOIS, S. G., HARDES, J., HARTMANN, W., KOVAR, H., METZLER, M., SHULMAN, D. S., STREITBURGER, A., TIMMERMANN, B., TORETSKY, J. A., UHLENBRUCH, Y., VIETH, V., GRUNEWALD, T. G. P. & DIRKSEN, U. 2021. Ewing Sarcoma-Diagnosis, Treatment, Clinical Challenges and Future Perspectives. *J Clin Med*, 10.
- ZYSKOWSKI, M., PESCH, S., GREVE, F., VON MATTHEY, F., WURM, M., FELIX, S., CRÖNLEIN, M., BIBERTHALER, P. & KIRCHHOFF, C. 2019. Prospective Randomized Study on the Outcome after Osteosynthesis in AO Technique vs Minimally Invasive Intramedullary Osteosynthesis by "Photodynamic Bone Stabilization" in Distal Fibula Fracture. *Foot Ankle Orthop.*, 4.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Orthopädischen Zellbiologischen Forschungslabor Derendingen unter der wissenschaftlichen Betreuung von Frau Dr. Danalache und unter Frau Prof. Dr. Alexander-Friedrich (Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, UKT) finalisiert.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Marina Danalache, Arbeitsgruppenleitung, Dr. rer. nat. Felix Umrath, Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Rosa Riester, Medizinisch-Technische-Assistentin.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder Frau Rosa Riester und Herrn Dr. Cyril Daniel von mir eigenständig durchgeführt. Die Isolierung und initiale Kultivierung der MSC-Zelllinie erfolgten vor Beginn dieser Arbeit durch Rosa Riester.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. Marina Danalache durch mich.

Teile der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden bereits in einer peer-reviewten Fachzeitschrift veröffentlicht (DOI: 10.3390/biomedicines10112900). Die jeweiligen Beiträge der beteiligten Autorinnen und Autoren – einschließlich meines eigenen, sind im Abschnitt „Authors' Contributions“ der Publikation nachvollziehbar dargelegt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Marocco, L., Umrath, F., Sachsenmaier, S., Rabiner, R., Wülker, N., & Danalache, M., 2022. 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Photodynamic Therapy Potentiates the Effectiveness of Doxorubicin in Ewing Sarcomas. *Biomedicines*, 10 (11), 2900.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich auf meinem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Apl. Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich, die mir ermöglicht hat, dieses Projekt in dieser Weise fertigzustellen.

Von Herzen danke ich meiner Betreuerin Frau Dr. Marina Danalache, die mich während der gesamten Zeit bedingungslos unterstützt hat. Mit ihrer Expertise, Geduld und Motivation hat sie wesentlich dazu beigetragen, dass mir die Forschungsarbeit Freude bereitet hat und ich fachlich wie auch persönlich daran wachsen konnte.

Für die Zusammenarbeit im Labor danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen sowie Doktoranden des Zellbiologischen Forschungslabor der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen, insbesondere Frau Rosa Riester und Herrn Dr. Cyril Daniel.

Ein herzlicher Dank geht außerdem an Robert Rabiner der Firma IlluminOss Medical, Inc. für seine großzügige Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für ihre stetige Rückendeckung bedanken.